



**BAZI NANOMATERYALLERİN ZEBRA BALIĞI
(*Danio rerio*) ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN
MORFOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Feyza İÇOĞLU AKSAKAL

**Doktora Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ
2018**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI NANOMATERYALLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN MORFOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER
KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Feyza İÇOĞLU AKSAKAL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI NANOMETARYALLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) ÜZERİNE
TOKSİK ETKİLERİNİN MORFOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ danışmanlığında, Feyza İÇOĞLU AKSAKAL tarafından hazırlanan bu çalışma 25/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza:

Üye : Prof. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza:

Üye : Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ..05.07.../2018 tarih ve .27./...44..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI NANOMATERYALLERİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN MORFOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Feyza İÇOĞLU AKSAKAL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

Bu tezde, bakır oksit nanopartikülleri (CuO NP) ve karboksil grubu ile fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT-COOH) zebra balığı (*Danio rerio*) gelişimi üzerine toksik etkisi bazı morfolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, döllenmeden 4 saat sonra zebra balığı embriyolarına farklı konsantrasyonlarda CuO NP (0,5, 1 ve 1,5 mg/L) ve MWCNT-COOH (5, 10, 20 mg/L) verilmiş, embriyolar 96 saate kadar büyütülmüştür. Nanomateryallerin uygulama süresince, ölüm oranı, koryondan çıkış oranı, kalp atışı oranı, malformasyon oranı belirlenmiştir. Zebra balığı larvalarının dokularına nanomateryallerin girip girmediğini belirlemek amacıyla Raman spektroskopisi kullanılmıştır. Buna ilaveten, 96 saat boyunca nanomateryallere maruz kalan larvalarda çeşitli antioksidan genlerin ve bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler Real-time-PCR kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, hem CuO NP'in hem de MWCNT-COOH'un zebra balığı embriyo/larvalarının dokularına geçebildiği, ölüm oranını artırdığı, koryondan çıkışı geciktirdiği, kalp atışı oranını düşürdüğü kaydedilmiştir. CuO NP ve MWCNT-COOH'un embriyo/larvalarda vitellüs kesesi ödemi, kalp ödemi, baş ve kuyruk anomalileri, vertebra deformasyonu gibi anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir. CuO NP ve MWCNT-COOH'un oksidatif stresle (*mtf-1*, *hsp70* ve *nfkB*) ve bağışıklık sistemi (*il-1 β* , *tlr4*, *tlr22*, *trf*, *cebp*) ile ilişkili genlerin ifadelerinde değişim meydana getirdiği, özellikle *hsp70* ve *il-1 β* genlerinin ekspresyonlarında artış olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak CuO NP ve MWCNT-COOH'a kısa süreli maruziyetin zebra balığı embriyo/larvalarının gelişimi üzerine toksik etki gösterdiği ortaya konmuştur.

2018, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gen ekspresyonu, Kalp ödemi, Nanopartikül, Nanotüp, Raman spektroskopisi, Toksikite, Zebra balığı

ABSTRACT

PHd Thesis

INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS OF SOME NANOMATERIALS ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*) BY USING MORPHOLOGIC, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS

Feyza ICOGLU AKSAKAL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Faculty of Agriculture

Supervisor: Prof. Dr. Abdulkadir CILTAS

In this study, the toxic effects of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) and multi walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic acid (MWCNT-COOH) on zebrafish were investigated using some morphologic, biochemical and molecular parameters. For this purpose, zebrafish embryos were exposed to different concentrations of CuO NPs (0,5, 1 ve 1,5 mg/L) and MWCNT-COOH (5, 10, 20 mg/L) at 4 h after fertilization and they were grown until 96 hpf. Mortality, hatching, heart beat, malformation rates were examined during the exposure period. In addition, Raman spectroscopy was used to determine whether CuO NPs and MWCNT-COOH entered into the tissues of zebrafish larvae or not. Moreover, the alterations in the expression of genes related to the antioxidant system and innate immune system were examined in larvae that were exposed to CuO NPs and MWCNT-COOH during 96 h. The results showed that both CuO NPs and MWCNT-COOH were able to enter into the zebrafish embryos/larvae tissues and they caused an increased the mortality rate, a delayed hatching, and a decreased heart rate. It was detected that CuO NPs and MWCNT-COOH caused abnormalities such as yolk sac edema, pericardial edema, head and tail malformations and vertebral deformities in the embryo/larvae. Real-time PCR results showed that both NP exposure led to changes in the expression of oxidative stress (*mtf-1*, *hsp70*, and *nfb*) and innate immune system (*il-1 β* , *tlr4*, *tlr22*, *trf*, and *cebp*) related genes especially an increased in the expression of the *hsp70* and *il-1 β* . In conclusion, it was found that short-term exposure to CuO NPs and MWCNT-COOH exposure has toxic effects on the development of zebrafish embryos/larvae.

2018, 87 pages

Keywords: Gene expression, Nanoparticle, Nanotube, Pericardial edema, Raman spectroscopy, Toxicity, Zebrafish

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Öncelikle bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde emeği geçen, çalışmalarında bana yardım ve desteği sağlayan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇILTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esasında yardımlarını esirgemeyen ve deneysel çalışmalarımın bir bölümüne yardım eden Sayın Arş. Gör Dr. Nihal ŞİMŞEK ÖZEK ve Sayın Arş. Gör. Dr. Ferhunde AYSİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tamamlanmasındaki bu önemli süreçte, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, eşim Doç. Dr. Özkan AKSAKAL, kızım Aylin AKSAKAL ve değerli aileme şükranlarımı sunarım.

Feyza İÇOĞLU AKSAKAL

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanopartiküller ve Bakır Oksit (CuO) Nanopartikülü	2
1.2. Karbon Nanotüpler	4
1.3. CuO Nanopartiküllerin ve MWCNT'nin Ekotoksitesitesi	5
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Araştırma Yeri.....	24
3.2. Balık Materyali.....	24
3.3. Nanomateryaller	24
3.4. Nanomateryallerin Karakterizasyonu ve Su İçerisinde Dağılımı.....	24
3.5. Uygulamalar	25
3.6. Ölüm Oranı, Koryondan Çıkış, Malformasyonlar ve Kalp Atış Oranı	26
3.7. Raman Mikrospektroskopisi Analizleri.....	27
3.8. RNA İzolasyonu ve Real-time PCR.....	29
3.8.1. Total RNA izolasyonu.....	29
3.8.2. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması	31
3.8.3. Real-time PCR uygulamaları.....	32
3.9. İstatistiksel analiz	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. Kullanılan Bakır Oksit Nanopartikülü (CuO NP) ve Karboksil Grubu İçeren Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNT-COOH) Karakterizasyonu	34
4.2. Zebra Balığı Embriyo/Larvalarının Gelişimi Üzerine CuO NP ve MWCNT- COOH'un Etkileri	38

4.2.1. Ölüm oranı.....	38
4.2.2. Koryondan çıkış	39
4.2.3. Malformasyon oranı ve malformasyonlar	41
4.2.4. Kalp atışı.....	48
4.3. CuO NP ve MWCNT-COOH Uygulanmış Zebra Balığı	
Embryo/Larvalarında 96. Saatte Toplanan Raman Spektroskopisi Sonuçları	49
4.4. CuO NP ve MWCNT-COOH Uygulanmış Zebra Balığı	
Embryo/Larvalarında Oksidatif Stres ve İmmün Sistemle İlişkili Bazı	
Genlerin Ekspresyonu	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	70
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CuO NP	Bakır oksit nanopartikül
cDNA	Komplementer DNA
CeO ₂	Seryum oksit
CEBP	CCAAT/enhansır bağlayıcı protein β
CuSO ₄	Bakır sülfat
DNA	Deoksiribonükleikasit
HSP70	Isı şok proteini 70
İL-1β	İnterlökin 1 beta
KÖ	Kalp ödemi
MTF-1	Metal traskripsiyon faktör 1
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
NFKB	Nüklear faktör kabba beta
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	Fosfat bafır solüsyonu
PFA	Paraformaldehit
RNA	Ribonükleikasit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TiO ₂	Titanyum dioksit
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TLR22	Toll benzeri reseptör 22
TRF	Transferrin
VA	Vücut anomalisi
VKÖ	Vitellüs kesesi ödemi
VD	Vertebra deformasyonu
ZnO	Çinko oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nanomateryallerin kullanım alanlarının bir bölümü.	2
Şekil 1.2. Farklı koşullarda CuO nanopartikül sentezi	3
Şekil 1.3. MWCNT'nin yapısı	5
Şekil 1.4. Nanomateryallerin çevreye salınım yolları ve transformasyonu	6
Şekil 1.5. Nanomateryallerin toksisitesi	6
Şekil 1.6. Nanomateryallerin sucul organizmalar tarafından alınımı	7
Şekil 1.7. Sucul ekosistemlerde nanomateryallerin sonu.....	7
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan mikro Raman	28
Şekil 3.2. Kesitlerin alınmasında kullanılan kriostat	28
Şekil 3.3. Larvaların parçalanmasında kullanılan doku parçalayıcı	30
Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan otomatik nükleik asit izolasyon robotu	30
Şekil 4.1. CuO NP'e ait SEM görüntüsü	34
Şekil 4.2. CuO NP'e ait TEM görüntüsü	35
Şekil 4.3. MWCNT-COOH'a ait SEM görüntüsü	36
Şekil 4.4. MWCNT-COOH'a ait TEM görüntüsü.....	37
Şekil 4.5. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında ölüm oranı (mortalite).....	39
Şekil 4.6. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında koryondan çıkış oranı	40
Şekil 4.7.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 48. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	41
Şekil 4.7.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 48. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	42
Şekil 4.7.c. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 72. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	43
Şekil 4.7.d. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 72. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	44
Şekil 4.7.e. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 96. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	45

Şekil 4.7.f. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 96. saatte gözlenen bazı malformasyonlar	46
Şekil 4.8. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında malformasyon oranları.....	47
Şekil 4.9. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında kalp atışı.....	48
Şekil 4.10. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kafa bölgesinden alınan raman spektrumları	49
Şekil 4.11. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kuyruk bölgesinden alınan raman spektrumları.....	50
Şekil 4.12. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/ CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının vitellüs kesesinden alınan raman spektrumları	51
Şekil 4.13. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının kafa bölgesinden toplanmış raman spektrumları.....	52
Şekil 4.14. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının vitellüs kesesi bölgesinden toplanmış Raman spektrumları.....	53
Şekil 4.15. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının kuyruk bölgesinden toplanmış raman spektrumları.....	53
Şekil 4.16.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında MTF-1 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi	54
Şekil 4.16.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında MTF-1 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi	55
Şekil 4.17.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi	56
Şekil 4.17.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi	56
Şekil 4.18.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında NFkB mRNA ekspresyonundaki kat değişimi	57

Şekil 4.18.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında NFKB mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	57
Şekil 4.19.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TRF mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	58
Şekil 4.19.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TRF mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	59
Şekil 4.20.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR4 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi).....	59
Şekil 4.20.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR4 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	60
Şekil 4.21.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında CEBP mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	60
Şekil 4.21.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında CEBP mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	61
Şekil 4.22.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında IL-1 β mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	62
Şekil 4.22.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında IL-1 β mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	62
Şekil 4.23.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	63
Şekil 4.23.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi.....	64
Şekil 4.24.a. 0,5 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi	65
Şekil 4.24.b. 1 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi.....	65
Şekil 4.24.c 1,5 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi	66
Şekil 4.25. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında hiyerarşik kümeleme	66
Şekil 4.26.a. 5 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi.....	67
Şekil 4.26.b. 10 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi.....	68
Şekil 4.26.c. 20 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi	68
Şekil 4.27. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında hiyerarşik kümeleme	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Zebra balığının (<i>Danio rerio</i>) sistematikteki yeri.....	11
Çizelge 3.1. Real-time PCR işlemlerinde kullanılan primer çiftlerine ait baz dizilişleri	33

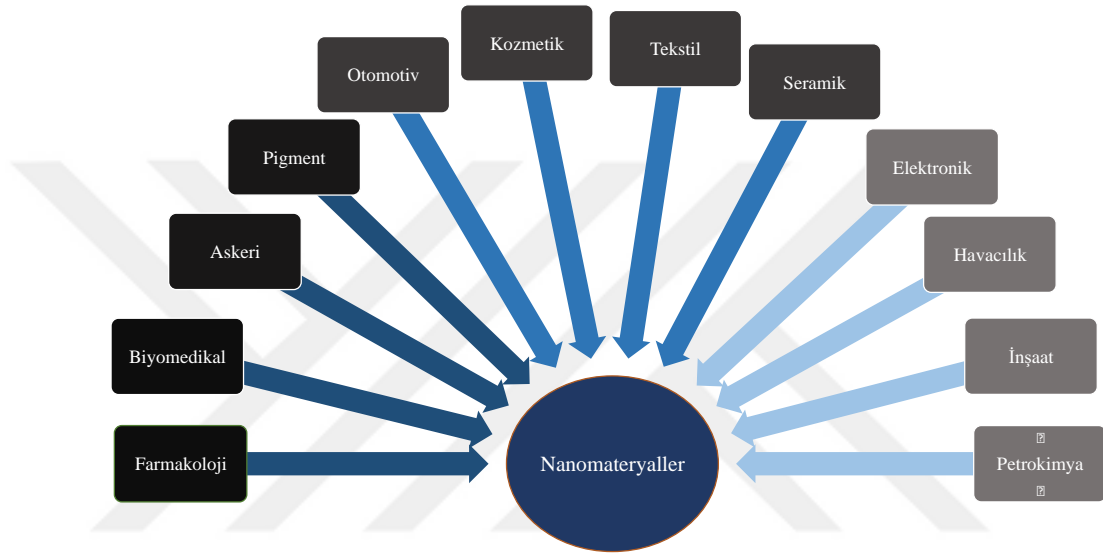


1. GİRİŞ

Nanoteknoloji malzemelerin nanometre ölçeğinde tasarımı, tanımlanması, geliştirilmesi, kontrol edilmesi ve atomal seviyede değiştirilip, işlevsel hale getirilmesini kapsamaktadır. Yine nanoteknoloji mevcut ürünlerin iyileştirilmesi ve yenilerinin geliştirilmesi yoluyla hayatımızı değiştirmek için olağanüstü potansiyele sahip küresel, multidisipliner bir girişimdir (Maynard and Kuempel 2005; Seaton and Donaldson 2005; Donaldson *et al.* 2006). Bir bilim dalı olarak ise nanoteknoloji çeşitli endüstriyel sorunlar karşısında bir çözüm noktası olarak ortaya çıkmış ve biyoteknoloji, bilişim, fizik, iletişim teknolojisi, pozitif bilimler ve diğer bilim dalları arasında bir kavşak görevi üstlenmiştir. Doku mühendisliği, ilaç tasarımı, biyomedikal görüntüleme cihazları, hastalık teşhisleri, biyo-arayüzler de dahil olmak üzere çeşitli endüstriyel sektörler ürünlerinde nanoteknolojiden faydalanmaktadır (Chakraborty *et al.* 2016). 2005 ve 2010 yılları arasında 25 kat büyüyen nanoteknoloji endüstrisinin 2020 yılında 1 trilyon dolarlık bir sektör olacağı tahmin edilmektedir (Bundschuh *et al.* 2016). Bu yüzden, gelişmiş ülkeler nanoteknoloji alanına öncelik vererek bu sahada önemli yatırımların yapılmasına ve projelerin desteklenmesine olanak sağlamaya başlamıştır (Fu *et al.* 2004; Kuzma and Priest 2010). Ülkemizde ise nanoteknolojiyi desteklemek adına nanoteknoloji anabilim dalları ve araştırma merkezleri kurulmuş, TÜBİTAK'ın oluşturduğu Vizyon 2023 Programı'nda öncelikli alanlardan biri olarak nanoteknolojiye yer verilmiştir.

Nanoteknolojinin hızlı gelişimi beraberinde sentezlenen ve kullanılan nanomateryal sayısını da hızla artırmıştır. Bu nanomateryaller kütleyle kıyaslandığında, göreceli olarak artırılmış yüzey alanına sahiptir ve kimyasal/katalitik reaktiviteleri aynı materyalin bulk boyutlu formlarına kıyasla büyük ölçüde artırılmıştır (Ema *et al.* 2016). Karbon nanotüpleri, grafit nanopartikülleri, grafen nanopartikülleri, grafen oksidi ve flurenleri içeren karbon temelli nanomateryaller ve nanopartiküller nanoteknolojinin anahtar elementleri olarak düşünülmektedir. Bu nanomateryaller biyomedikalden, nanoelektronığe, kozmetikten farmakolojiye kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Şekil 1.1). EPA (The US Environmental Protection Agency) nanomateryalleri 4 sınıfta

toplamıştır. Bunlar; i) bakır oksit gibi metal oksitleri, nano gümüşü, nano altını, kuantum noktaları da içeren metal temelli materyaller, ii) hemen hemen tamamı karbondan oluşan karbon nanotüpler ve flurenler, iii) dendrimerler ve nanoboyutlu polimerler, iv) iki veya daha fazla partikül veya bir nanoparçacık ve bir dökme tip malzeme arasında nano-kil veya titanyum-DNA kombinasyonları gibi kompozitler.

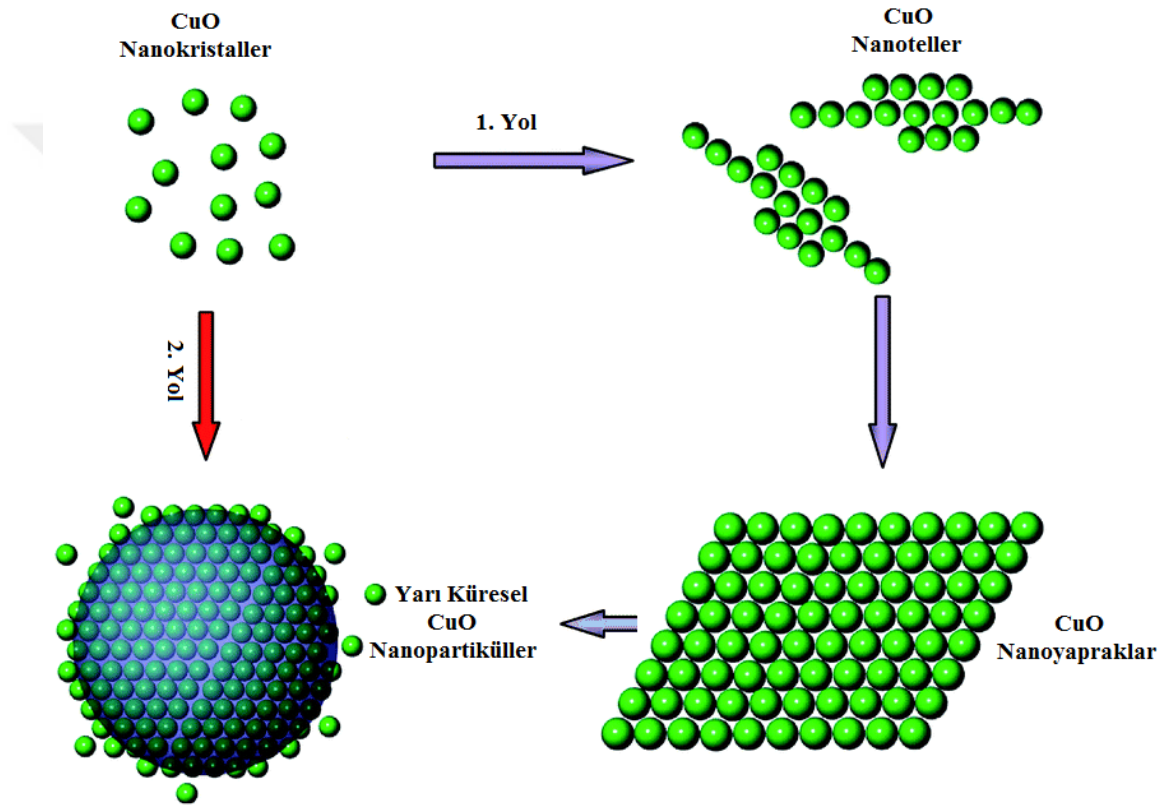


Şekil 1.1. Nanomatyaylların kullanım alanlarının bir bölümü.

1.1. Nanopartiküller ve Bakır Oksit (CuO) Nanopartikülü

Nanopartiküller sentetik veya doğal kökenli (kolloidler, kumlar, tozlar, küller, virüsler, bitkiler) farklı makromoleküllerden fiziksel veya kimyasal yöntemlerle elde edilebilen, farklı şekillere sahip (prizma, çubuk, küp, küre, iğne), 1-100 nm boyutunda olan materyallerdir (Cushing *et al.* 2004). Nanopartiküller yığılmalarını engelleyen koruyucu kabukla çevrelenmiştir. Bu kabuk partiküle hem elektrostatik hemde sterik stabilizasyon sağlamaktadır. Geniş yüzey alanına ve yüksek mekanik mukavemet gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahip nanopartiküller, kimyasal reaktiviteleri, biyolojik etkileri ve fonksiyonellikleri ile bilim, teknoloji, eczacılık, tıp, iletişim, elektronik, biyoteknoloji, çevre, kişisel bakım ürünleri, boyalar, renklendiriciler ve askeri alanlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Colvin 2003). Kuantum noktalar, nanokristaller,

lipopartiküller, manyetik nanopartiküller ve polimer nanopartiküller gibi çeşitleri bulunmakla birlikte nanopartiküller arasında en fazla üretilen ve kullanılan partiküller metal nanopartiküller (Ag, Au, Cu, Zn) ve metal oksit (CuO, TiO₂, CeO₂, ZnO) nanopartiküllerdir. Metal oksit nanopartiküller içerisinde ise en çok kullanılan partiküllerden biri (CuO) nanopartikülleridir (Şekil 1.2).



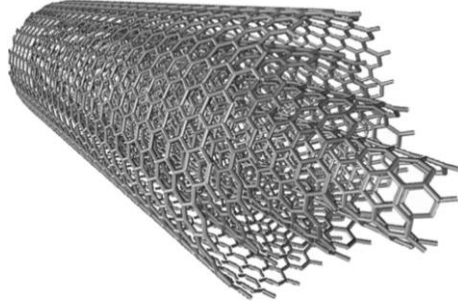
Şekil 1.2. Farklı koşullarda CuO nanopartikül sentezi (Cao *et al.* 2015)

Bakır oksit, bakır bileşikleri ailesinin en basit üyesidir ve spin dinamikleri, elektron korelasyon etkileri, yüksek sıcaklıkta süper iletkenlik gibi bazı potansiyel fiziksel özelliklere sahiptir (Cava 1990; Tranquada *et al.* 1995). CuO kristal yapıları dar bir bant boşluğuna sahip olduğu için kullanışlı fotovoltaik ve fotoiletkenlik özellikler göstermektedir (Xu *et al.* 1999). Bu durum CuO nanopartiküllerine yeni bir takım üstünlükler sağlamaktadır. CuO nanopartikülleri termal iletkenliği ve sıvı vizkozitesini artırabilmektedir. Bu özellikleri ile bu nanopartiküller enerji tasarruflu materyal olarak

kullanışlı bir potansiyel oluşturmaktadır (Namburu *et al.* 2007). CuO nanopartikülleri gaz sensörleri, katalizörler, bataryalar, yüksek sıcaklık süper iletkenleri, solar enerji dönüşümlerini de içeren farklı alanlarda kullanılırlar (Chang *et al.* 2012). Bu nanopartiküller gümüş oksitten daha ucuzdurlar ve eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ile kompozit elde etmek için polimerler ile daha kolay biçimde karışabilirler (Battez *et al.* 2008). Yine bu partiküller yüzey aşınımını ve sürtünmeyi azaltabildikleri için yağlayıcılar, polimer/plastikler ve metalik kaplamalarda kullanılmaktadırlar (Battez *et al.* 2010).

1.2. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler silindir formda olan karbonun bir allotropudurlar. Karbon nanotüplerin yapısını oluşturan karbon molekülleri birlikte bağlanarak bir tüpü oluşturmaktadır. Bu tüpün bir ucu yarım küre veya yarım-bucky küresi formu ile kapalıdır (Donaldson *et al.* 2006). Tamamen karbondan oluşan bu saf karbon nanotüp yapısı sorunsuz bir silindir oluşturacak şekilde tek tabaka halinde katlanmış grafitten oluşmaktadır (Şekil 1.3). Karbon nanotüplerin tek duvarlı (single-walled) karbon nanotüpler (SWCNT) ve çok duvarlı (multi-walled) karbon nanotüpler (MWCNT) olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. MWCNT'ler daha büyüktür ve iç içe yığılmış birçok tek duvarlı borudan oluşmaktadır (Walters *et al.* 1999; Yu *et al.* 2000). Karbon nanotüplerin uzunluğu ve çapı sentetik prosedüre bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. SWCNT'lerin çapları 0,7-3 nm arasında değişirken (Jorio *et al.* 2001), MWCNT'lerin çapları genellikle 10 ila 200 nm arasında değişmektedir (Hou *et al.* 2003). Karbon nanotüplerin çok yüksek dayanıklılık ve eşsiz elektriksel özellikleri (yüksek iletkenlik, düşük direnç) vardır ve bu özellikleri ile elektronik, kozmetik, endüstriyel ve biyomedikal alanlarda büyük bir potansiyele sahiptirler (Lam *et al.* 2004; Donaldson *et al.* 2006). Bir karbon nanotüp içerisine DNA molekülünü sokmak mümkündür. DNA-nanotüp kombinasyonundan oluşan yapılar DNA sekans cihazları, moleküler sensörler ve çeşitli elektronik cihazlarda kullanılmaya başlanmıştır.

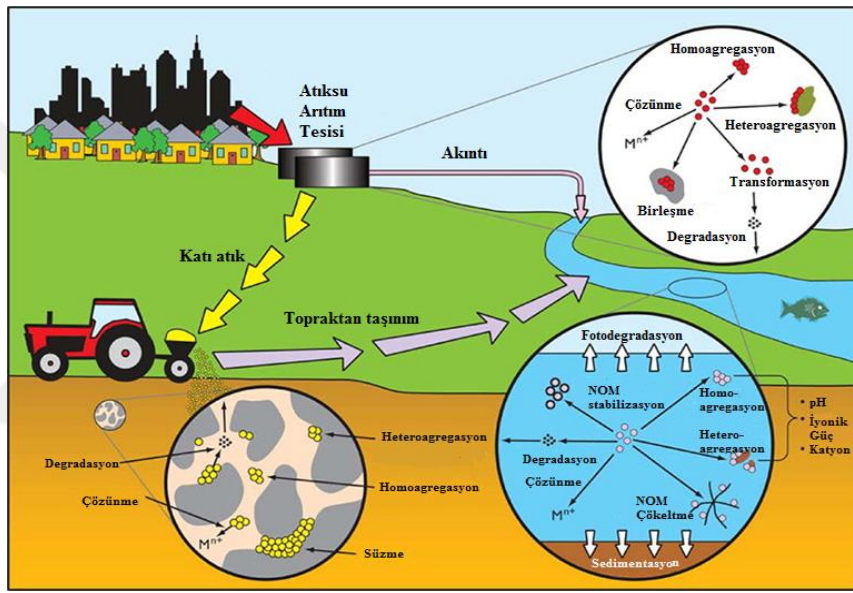


Şekil 1.3. MWCNT'nin yapısı (Zannotti *et al.* 2016).

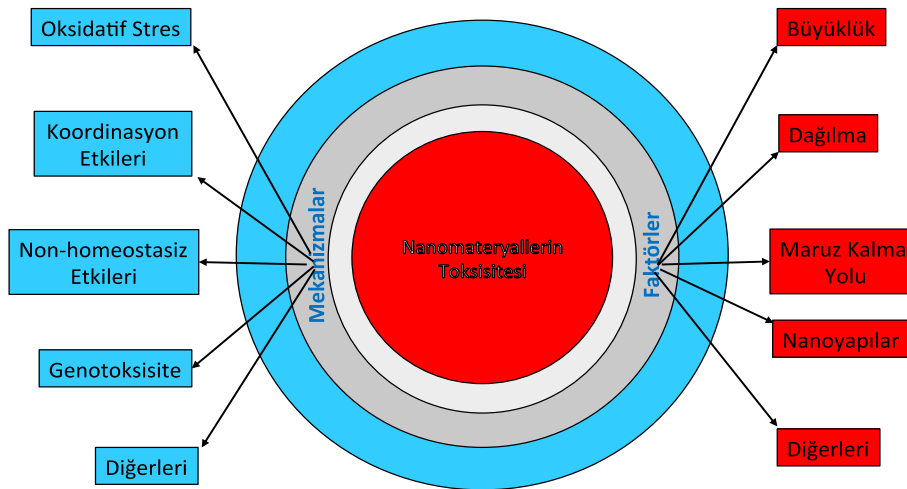
1.3. CuO Nanopartiküllerin ve MWCNT'nin Ekotoksitesitesi

Nanopartiküllerin ve karbon nanotüplerin endüstrinin bir çok alanında kullanımı ve ekonomik önemleri göz önüne alındığında bu materyallerin güvenli kullanımı, depolanması, taşınımı, çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri son derece önem arz etmektedir. Nanomateryallerin kullanımındaki artışa bağlı olarak hem karasal hemde sucul ekosistemlerin nanopartiküllere ve karbon nanotüplere maruziyeti artmıştır. Sucul ekosistemler ve su sedimenti bu nanomateryaller için birikme alanlarıdır (Chakraborty *et al.* 2016; Ema *et al.* 2016; Callaghan and MacCormack 2017). Bu nanomateryaller su ortamına özellikle atıksu arıtma tesislerinden gelen atıklarla ya da depolanma esnasındaki kaçaıklardan veya topraktan taşınma yoluyla girerler (Şekil 1.4) (Batley *et al.* 2013). Yüzey sularında nanomateryallerin konsantrasyonu düşük olmasına rağmen ekotoksitesiteye neden olabildikleri için nanomateryallerin akuatik organizmalar üzerindeki etkileri oldukça önemlidir. Bu nanomateryaller absorpsiyon, beslenme veya deri yoluyla sucul organizmaların vücuduna girip doğrudan hücreye ve çekirdeğe geçebilmekte, kana karışmakta ve pek çok organı etkileyebilmektedir (Callaghan and MacCormack 2017). Yine DNA'ya bağlanarak veya DNA ile ilişkili proteinlerle etkileşime girerek genetik hasara yol açabilmekte, diğer hücresel proteinlere bağlanarak hücre bölünmesini etkileyebilmekte, oksidatif strese neden olmaktadır (Gonzalez *et al.* 2008; Xie *et al.* 2011) (Şekil 1.5). Suların pH'sı, tuzluluğu, sulardaki doğal organik maddelerin varlığı ve divalent iyonlar gibi bazı çevresel faktörler nanomateryallerin ekotoksitesitesini değiştirebilmektedir. Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışmada CuO nanopartikülü ve MWNCT gibi nanomateryallerin akuatik organizmalar üzerindeki

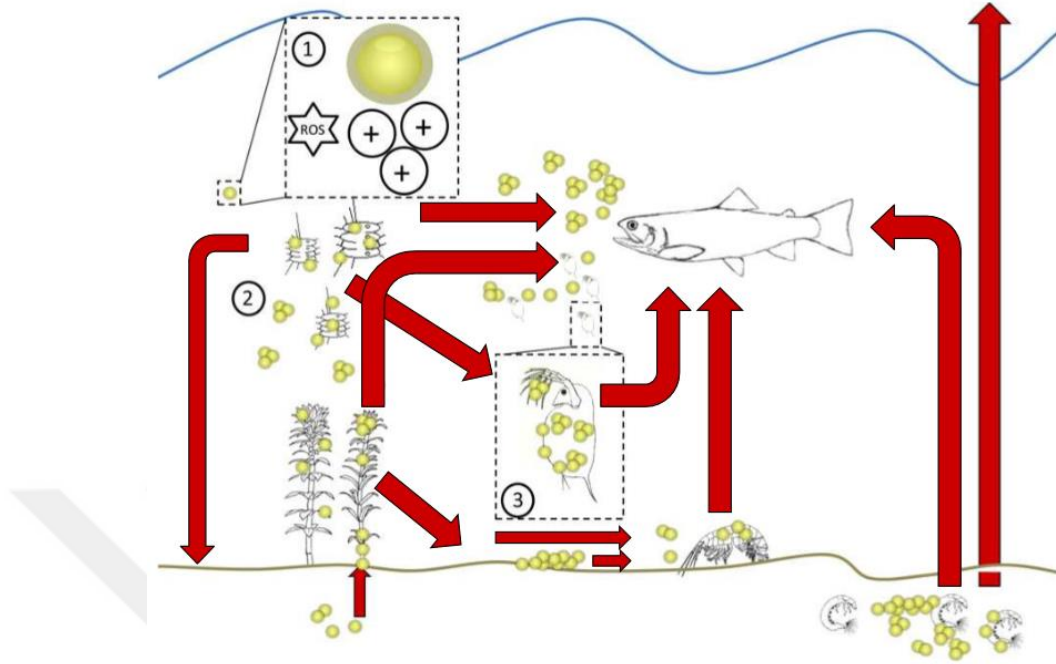
ekotoksik etkileri ortaya konmuştur (Jovanovic and Palic 2012; Adam *et al.* 2015; Chakraborty *et al.* 2016; Callaghan and MacCormack 2017; Wu *et al.* 2017). Bu çalışmalarda nanomateryallerin toksisitesinin nanomateryalin çapı, şekli, su içerisindeki dağılımı, yüzeyinin aktifleştirilip aktifleştirilmediğine bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir. CuO nanopartikülleri ve MWCNT toksisitesi üzerine yapılan çevresel çalışmalar çoğunlukla sucul organizmalara bu nanomateryallerin etkileri üzerine odaklanmıştır (Şekil 1.6, Şekil 1.7).



Şekil 1.4. Nanomateryallerin çevreye salınım yolları ve transformasyonu

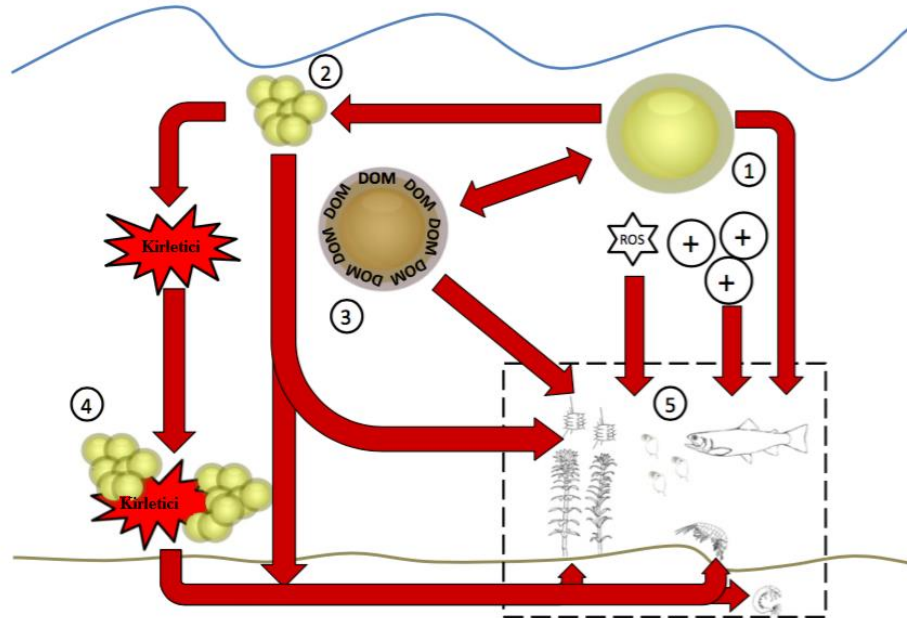


Şekil 1.5. Nanomateryallerin toksisitesi



Şekil 1.6. Nanomateriyallerin sucul organizmalar tarafından alınımı

(1: Toksik özellikler, 2: Asimilasyona yol açan adsorpsiyon ile oluşan biyo-manyetikleşme potansiyeli, 3: Nanomateriyallerin balık ve alg gibi sucul organizmalar tarafından alınımı)



Şekil 1.7. Sucul ekosistemlerde nanomateriyallerin sonu

(1: Reaktif oksijen türleri ve iyonların salınımı, 2: agregasyon, 3: çözülmüş organik madde ile etkileşim, 4: kirleticiler, 5: Akuatik ekosistemi etkileme) (Bundschuh *et al.* 2016).

Bu bağlamda en yaygın kullanılan model organizmalar arasında *Daphnia magna*, algler ve zebra balığı yer almaktadır. Aruoja *et al.* (2009) CuO nanopartiküllerinin *Pseudokirchneriella subcapitata* üzerine toksisitesini araştırmış, bu nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda bile yüksek oranda toksisite gösterdiğini belirtmiştir. CuO nanopartiküllerinin balıkların solungaç hücrelerinde hasar oluşturduğu, plazmadaki metal seviyesini değiştirmek yoluyla epitel hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği, solungaçlardaki klorid hücrelerinin çapını ve sayısını azalttığı rapor edilmiştir (Song *et al.* 2015). Yine nanobakır solüsyonu ve çözünebilir bakıra maruz bırakılan balıkların solungaç morfolojisinde değişim olduğu bildirilmiştir (Griffitt *et al.* 2007). Sun *et al.* (2016) 6,25-50 mg/L konsantrasyonda zebra balığı larvalarına uygulanan CuO nanopartikülünün zebra balığında embriyonik gelişimi geciktirdiğini, çeşitli anormalliklere neden olduğunu rapor etmiştir. Liu *et al.* (2014b) CuO nanopartiküllerinin zebra balığı larvalarında vücut uzunluğunu ve koryondan çıkış oranını azalttığını göstermiştir. CuO nanopartiküllerinin bakterilerde DNA hasarı oluşturmak ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretmek yoluyla toksik etki gösterdiği Bondarenko *et al.* (2012) tarafından kaydedilmiştir. Yokohira *et al.* (2009) trake içerisine uygulanan CuO nanopartiküllerinin uygulama sıklığına, doza veya uygulama süresine bağlı olarak sıçan akciğerlerinde ciddi akut inflamatuvar değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Karlsson *et al.* (2008), CuO nanopartiküllerinin insan karaciğer epitelial hücre hattı 549'da DNA hasarına ve sitotoksositeye neden olduğunu rapor etmiştir. Bir başka çalışmada CuO nanopartikülü uygulanmış epitelial hücrelerde 2,7 diklorofloresan diasetat ile reaktif oksijen türevlerinin hücre içi miktarı ölçülmüş ve hücrelerde oksidatif lezyonlar belirlenmiştir (Wang *et al.* 2012). Nanopartikül uygulanmış hücrelerde ROS üretimi ve DNA hasarı arasındaki ilişki mukayese edilmiş ve oksidatif stresin asıl toksik etkiye neden olduğunu kaydedilmiştir (Wang *et al.* 2012). CuO nanopartikülüne maruz bırakılan hücrelerde katalaz ve glutatyon redüktaz aktivitesinin azaldığı, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Chang *et al.* 2012). Total glutatyon oksidasyonu oranında gözlemlenen artış CuO nanopartiküllerinin sadece ROS üretmediğini aynı zamanda hücresel antioksidan savunmayı blokladığını göstermiştir (Chang *et al.* 2012).

Öte yandan, MWCNT'lerin su içerisinde dağılım yoluyla zebra balığı embriyolarının koryondan çıkma süresini geciktirdiği, gelişimsel anormallikler oluşturduğu, reaktif oksijen türleri üreterek DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Gilbertson *et al.* 2016). Liu *et al.* (2014b) MWCNT'in doza bağlı olarak zebra balığı embriyolarında akut toksisiteye neden olduğu ve koryondan çıkışı geciktirdiğini belirtmiştir. Yine MWCNT'in gökkuşağı alabalığı fibroblast benzeri gonadal hücre hattında sitotoksisiteye neden olduğu Bermejo-Nogales *et al.* (2017) tarafından rapor edilmiştir. Farkas and Booth (2017) MWCNT'in bir alg türü olan *Raphidocelis subcapitata*'da klorofil miktarını azaltarak büyümeyi yavaşlattığını bildirmiştir. Carrillo *et al.* (2015) karboksil grubu ile fonksiyonelleştirilmiş MWCNT'nin ergin zebra balıklarının ovaryum, testis ve beyinlerinde doza bağlı olarak lipid peroksidasyonunu artırdığını, protein oksidasyonuna neden olduğunu ancak oksidatif stresle ilişkili genlerin ekspresyonunun uygulamadan 48 saat sonra kontrole oranla fazla değişmediğini bildirmiştir. Yine, Chen *et al.* (2012) 25 mg/L konsantrasyonda uygulanan MWCNT'nin zebra balığında koryondan çıkışı geciktirdiğini ve önemli morfolojik hasarlara neden olduğunu rapor etmiştir.

Sucul organizmalar CuO NP ve MWCNT gibi nanomateryallere maruz kaldıklarında antioksidan sistem genleri ve immun sistem genleri gibi çeşitli genlerinin transkripsiyon seviyelerinde değişim meydana gelmektedir (Adam *et al.* 2015). Bu genlerin transkripsiyon seviyelerinde meydana gelen değişimler ise mikroarray veya Real-time PCR tekniği kullanılarak araştırılmaktadır. Bu genlerden en çok çalışılanlar arasında *mtf-1*, *hsp70*, *nfkb*, *il-1 β* , *tlr4*, *tlr22*, *trf*, *cebpb* genleri yer almaktadır (Jin *et al.* 2010; Banerjee and Leptin 2014; Jin *et al.* 2015; Krishnaraj *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016). Isı şok proteini 70 (*Hsp70*) geni molekül ağırlıkları 100 kilo daltondan daha az olan temel olarak hücrelerin ısıya maruz kalmasıyla üretimi artan bir grup proteini kodlamaktadır. Enfeksiyonlar, etanol, arsenik, ağır metaller ve toksinler, ultraviyole ışık, hücrelerin susuz kalması ve nanomateryallere maruziyet gibi bir çok durumda bu proteinlerin ve bu proteinlerden sorumlu genlerin transkripsiyonu artış göstermektedir (Krishnaraj *et al.* 2016). Yine bu genlerden metal transkripsiyon faktör 1 (*Mtf-1*) bakır, çinko, kadmiyum, gümüş gibi ağır metallerin hücrelere girişine cevap olarak

metalotiyoneinler (sistein bakımından zengin düşük moleküler ağırlıklı proteinler olup, golgi ayıtının membranında yerleşirler bitkiler, hayvanlar bakteri ve mantarlarda bulunurlar) ve metal homeostazının da içinde yer aldığı diğer genlerin ekspresyonlarını indükleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlayan genlerdir (Murphy *et al.* 1999; Smirnova *et al.* 2000; Lichtlen and Schaffner 2001). *Mtf-1* çinko parmak protein grubundadır ve hücrelerde ağır metal dengesi ve detoksifikasyonunda merkezi rol oynamaktadır. Toll benzeri reseptörler (*tlr4* ve *tlr22*) ağır metaller ve bir çok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 membran proteini kodlayan genlerdir (Rauta *et al.* 2014). Bu reseptörler başta makrofajlar olmak üzere eozinofiller, nötrofiller gibi hücrelerde bulunurlar ve patojenlerin tanınmasında ve yangının tetiklenmesinde rol alırlar (Rauta *et al.* 2014). İnterlökin 1 beta (*il-1 β*) lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere bir çok hücreden sentezlenen ve diğer hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde mesaj alıp-verici olarak rol oynayan protein yapısındaki maddeleri kodlar. Enfeksiyon durumunda, ağır metal stresi gibi olaylarda immün cevabın düzenlenmesinde, embriyogenez ve organ farklılaşmasında, immün yanıtın oluşturulmasında önemli rolü vardır (Banerjee and Leptin 2014; Jin *et al.* 2015; Krishnaraj *et al.* 2016). Transferrin (*trf*) kanda demirin bağlanması, taşınmasında sorumlu önemli bir proteindir. Transferrin karaciğerde sentezlenir ve kana verilir. Ancak beyin ve böbrek gibi dokulardada bu protein ait genin ekspresyonu oldukça yüksektir. Omurgalılarda doğal immün cevabın oluşturulmasında önemli rol oynar. CCAAT/enhancer binding protein (*cebp*) yüksek oranda korunmuş bazik lösin fermuar proteinleri ailesine ait bir proteindir. En az 6 üyesi bulunmaktadır (Yuan *et al.* 2015). Enflamasyon, hücre göçü (proliferasyonu) ve farklılaşması, metabolizmanın düzeni ve kontrolünde hayati rol oynamaktadır. Bu proteini kodlayan genin ekspresyonu stres koşullarında değişmektedir (Yuan *et al.* 2015). Nükleer faktör kappa B (*nfkB*) interlökin 1, tumor nekrozis faktör alfa (*tnf- α*) gibi sitokinler ve kemokinlerin de dahil olduğu proenflamatuar genlerin ekspresyonunda rol oynayan protein kompleksidir (da Silva *et al.* 2014; Krishnaraj *et al.* 2016). Tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. İmmün ve enflamatuar yanıtların oluşturulmasında ve koordine edilmesinde rol oynamaktadır.

Yukarıda değinildiği gibi nanomateryallerin toksisitesini değerlendirmek için en fazla kullanılan model organizmalardan biri zebra balığıdır (Chakraborty *et al.* 2016).

Zebra balığı (*Danio rerio*) Cyprinidae familyasına ait tropikal bir türdür (Çizelge 1.1). Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balığı en fazla Pakistan ve Hindistan sularında bulunur. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür. Vücutta boydan boya 7-9 adet mavi çizgi bulunmaktadır. Zebra balığı gelişimi için optimum sıcaklık 28 °C dir. Bununla birlikte 20-32 °C aralığındaki sulara sorun olmadan yaşayabilmektedirler (White *et al.* 2008; Goldshmit *et al.* 2012).

Çizelge 1.1. Zebra balığının (*Danio rerio*) sistematikteki yeri

Alem	Ökaryotlar
Alt alem	Hayvanlar
Üst Şube	Metazoalar
Şube	Kordalılar
Alt Şube	Omurgalılar
Üst Sınıf	Çeneli ağızlılar
Sınıf	Balıklar
Alt Sınıf	Kemikli Balıklar
Üst Takım	Işınlı Yüzgeçliler
Aile	Sazangiller
Cins	<i>Danio</i>
Tür	<i>Danio rerio</i>

Hızlı gelişebilen ve deneysel olarak kolay denetlenebilen bir model organizmadır. Genomu yaklaşık 1.4 milyar DNA baz çifti uzunluğundadır ve tahminen 22.000 protein-kodlayıcı gen içermektedir. Ergin bireylerin boyları 4,5-5 cm'i bulmaktadır. Tipik olarak 3-4 ayda cinsel olgunluğa ulaşmaktadır ve bir balık çifti yaklaşık olarak 200 döllenmiş yumurta üretebilmektedir. Döllenme dışsaldır ve yumurtaları transparandır. Fertilizasyondan 24 saat sonra (24 hpf) tüm ana organ sistemleri oluşmakta ve spontan kas esnekliği başlamaktadır. 48 hpf'den önce, ilk davranışsal

tepkiler gözlemlenebilmektedir ve çoğu organ sistemi, fertilizasyondan 5 gün sonra tamamen gelişmiştir (Parichy 2006; Meeker and Trede 2007; Fadool and Dowling 2008).

Zebra balığı ekotoksikolojik çalışmalarda uzun yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Lele and Krone 1996; Hallare *et al.* 2005; Shaukat *et al.* 2011; Liu *et al.* 2016; Le Qian *et al.* 2018). Yine, gelişim biyolojisi, toksikoloji, transgenik çalışmalar, genetik mekanizmaların aydınlatılması, ilaç testleri, doğuştan gelen bağışıklığın incelenmesi için önemli bir model organizmadır (Brenner 1974; Lele and Krone 1996; Fadool and Dowling 2008). Diğer taraftan embriyo deneyleri, kimyasalların gelişimsel toksisite üzerine etkilerinin incelenmesi için önemli bir araçtır (Birge *et al.* 2010; Braunbeck *et al.* 2005; Kluver *et al.* 2015; Rial *et al.* 2013; Le Qian *et al.* 2018). Embriyogenez toksik maruziyete karşı oldukça hassas olduğundan zebra balığı embriyoları erken yaşam evresi çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Miranda-Rodriguez *et al.* 2017; Sant *et al.* 2017; Le Qian *et al.* 2018).

Zebra balığı diğer hayvan modelleri ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir.

Zebra balığı

- Genetik olarak insana benzerlik göstermektedir ve çeşitli toksik maddelerin insanlar üzerindeki potansiyel etkilerinin anlaşılmasında önemlidir.
- Zebra balığı, özellikle embriyonik gelişim esnasında diğer omurgalılarla moleküler ve fizyolojik olarak dikkate değer derecede benzerlik göstermektedir.
- Embriyonik dönemdeki eksojen bileşiklere maruziyet, zebra balığında, farklılaşma, organogenez, apoptoz, proliferasyon, iyon düzenlenmesi ve nörogenez gibi anahtar gelişim süreçlerini bozabilir. Bu yüzden zebra balığı çok sayıda toksik maddenin akut ve kronik toksisitesinin çalışılması için oldukça elverişli bir organizmadır.
- Küçük boyutları sayesinde büyük stoklar şeklinde muhafaza kolaylığı vardır.
- Yüksek doğurganlığa sahip bir organizmadır.

- Embriyonun hızlı gelişimi ve koryon şeffaflığı ile gerçek zamanlı gözlemler yapma olanağı verir.
- Kısa jenerasyon aralığından (döllenmeden cinsel olgunluğa kadar yaklaşık 90 gün) dolayı biyolojik testler için hem hızlı sonuç verir hem de maliyeti düşüktür.
- Zebra balığı larvaları, toksiste testleri için mikrokuyucuk plakaların kullanımına uygundur.

CuO nanopartiküllerin ve MWCNT'nin kullanım ve uygulama alanları genişlerken canlılar ve çevre üzerinde ortaya çıkarabileceği riskler ve belirsizliklerin azaltılması, bu materyallerin biyoyumluluklarının sağlanabilmesi ve genişletilebilmesi için farklı canlı türleri ve farklı doz ve uygulama sürelerini kapsayan detaylı *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların yapılması gerekmektedir (Jovanovic and Palic 2012; Chakraborty *et al.* 2016; Ema *et al.* 2016). Bu amaçla bu tezde, CuO nanopartiküllerin ve COOH-MWCNT'nin zebra balığı embriyo/larvaları üzerine gelişimsel toksisitesi morfolojik, biyokimyasal, ve moleküler parametreler kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar bir bütün olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Xiao *et al.* (2018) su kimyasının CuO nanopartiküllerinin toksisitesini nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla *Daphnia magna* türüne 5-50 mg/L CuO nanopartikülü uygulamış, pH, çözünmüş organik karbon ve divalent katyonların konsantrasyonlarının CuO nanopartikülünün toksisitesine etkisini araştırmıştır. Çalışmada pH, çözünmüş organik karbon ve divalent katyonların konsantrasyonlarının artışına paralel olarak CuO nanopartikülü toksisitesinin azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak özellikle sudaki çözünmüş organik karbon miktarının CuO nanopartiküllerinin toksisitesini etkilediği ve su kimyasının nanopartikül toksisitesi üzerindeki etkisinin görmezden gelinemeyeceği rapor edilmiştir.

Bohme *et al.* (2017) CuO, ZnO, Ag ve Au nanopartiküllerin zebra balığı embriyonik gelişiminde yumurta, embriyo, koryon ve vitellüs kesesinde birikimini araştırmıştır. ICP-MS, elektron mikroskobu gibi yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlara göre zebra balığı yumurtasında en fazla altın, en az CuO nanopartiküllerin biriktiği, koryonda sırasıyla gümüş, altın ve bakır nanopartiküllerinin birikiminin en fazla olduğu, embriyoda ise çinko nanopartiküllerinin birikiminin fazla olduğu tespit edilmiştir.

Thit *et al.* (2017) *Daphnia magna* türü üzerine 6 nm tek dağılmış ve <100 nm çok dağılmış CuO nanopartiküllerin akut toksisitesini 48 saatlik immobilizasyon testi kullanarak araştırmıştır. Referans olarak CuSO₄ kullanılmıştır. Çalışmada ISO standart test koşulları, hafif asidik (pH=6) ortam, sitrik asit veya humik asit kullanılarak dört farklı koşulda testler yapılmıştır. CuO nanopartiküllerin toksisitesinin en fazla pH=6 da olduğu pH arttıkça toksisitenin azaldığı, sitrik asit ve humik asidin ise partiküllerin toksisitesini azalttığı kaydedilmiştir. CuO nanopartiküllerin toksisitesinin test suyu kompozisyonu tarafından etkilendiği bildirilmiştir.

Wu *et al.* (2017) CuO nanopartiküllerine doğrudan ve dolaylı olarak maruz kalmanın *Daphnia magna* türü üzerindeki toksik etkisini araştırmıştır. Dolaylı etkiyi belirlemek

amacıyla CuO nanopartikülleri bir alg türü olan *Chlorella vulgaris*'e uygulanmış, daha sonra *Daphnia magna* bu alg ile beslenmiştir. Doğrudan etkiyi belirlemek için ise aynı konsantrasyonda CuO nanopartikülleri doğrudan *Daphnia magna* türününün bulunduğu çözeltiliye uygulanmıştır. Çalışmada doğrudan uygulamanın daphnia üzerinde daha fazla toksik etkiye neden olduğu, Chlorella'yı yiyen daphnialarda CuO nanopartikülü konsantrasyonlarının çok düşük olduğu ve bu durumun toksik etkiye yol açmadığı tespit edilmiştir.

Krishnaraj *et al.* (2016) ergin zebra balığı solungaç ve karaciğeri üzerine biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerinin etkisini araştırmıştır. Çalışmada *Malva crispa* türünün yaprak ekstraktlarından gümüş nanopartiküller sentez edilmiş ve bu nanopartiküllerin ergin zebra balığı üzerine LC₅₀ değeri 142,2 µg/L olarak belirlenmiştir. Araştırmada ergin zebra balıkları 14 gün boyunca 71,1 µg/L konsantrasyonda gümüş nanopartiküllerine maruz bırakılmıştır. Araştırma sonucunda gümüş nanopartiküllerin zebra balığı karaciğer ve solungaç hücrelerinde oksidatif hasara yol açtığı, hücrelerde mikronükleus ve nükleer anormalliklere neden olduğu, MTF-1 ve HSP70 gibi stresle ilişkili ve TLR4, NFKB TLR22 gibi immün sistemle ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişime neden olduğu rapor edilmiştir.

Sun *et al.* (2016) CuO nanopartiküllerin zebra balığı üzerine toksik etkisini araştırmak amacıyla 6,25-50 mg/L konsantrasyonda nanopartikülü zebra balığı embriyolarına uygulamış ve 3 gün sonra çeşitli morfolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler yapmıştır. Çalışmada partikül karakterizasyonu için FTIR, SEM ve TEM kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda yüksek konsantrasyonlarda embriyo/larvalara uygulanan CuO nanopartiküllerin gelişimsel anormalliklere neden olduğu, hepatotoksisiteye ve nörotoksisiteye yol açtığı, tümör nekrosis faktör alfa ve süperoksit dismutaz 1 genlerinin ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu belirlenmiştir.

Adam *et al.* (2015) *Daphnia magna* türünün glikojen, lipid ve protein konsantrasyonu ve bazı genlerin ekspresyonları üzerine CuO ve ZnO nanopartiküllerinin etkisini araştırmıştır. 96 saat boyunca *Daphnia magna* türü CuO ve ZnO nanopartiküllerin

%10'lük immobilize konsantrasyonuna maruz bırakılmış, ZnO nanopartiküllerin solüsyon içerisinde büyük oranda çözündüğü CuO nanopartiküllerin ise hızlıca agregatlar oluşturduğu belirlenmiştir. CuO nanopartikül uygulanan daphnialarda glikojen, lipid ve protein konsantrasyonunun azaldığı, elde edilen mikroarray sonuçlarına göre genlerin transkripsiyonunda önemli değişimler olmadığı bildirilmiştir.

Carrillo *et al.* (2015) beş farklı nanopartikülün zebra balığının farklı dokularında protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu belirlemiştir. Çalışmada, beş nanopartikülün 1 ppm konsantrasyonda kontrol gruplarına göre daha yüksek protein oksidasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bizmut germanat (BGO) ve MWCNT-COOH'un kontrol grubuyla kıyaslandığında, uygulama gruplarındaki balıkların tüm dokulardaki lipid peroksidasyonunu iki kattan daha fazla artırdığı ifade edilmiştir. Kontrolle mukayese edildiğinde evropiyum katkılı itriyum oksit ($Y_2O_3:Eu$) ve MWCNT-COOH'un yumurtalıklar, testisler ve beyinde proteinlerdeki karbonil içeriğini 4 kat artırdığı gösterilmiştir. Kontrol balıklarındaki değerlere göre 3 kat daha yüksek protein oksidasyonu gerçekleşmesine rağmen BGO ve gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) düşük oksidatif etki gösterdiği saptanmıştır. Bazı nanopartiküller için 1 ppm konsantrasyondaki protein oksidasyonu $100 \mu M H_2O_2$ ile yapılan deneylerde elde edilen değerlere ulaşmıştır. Diğer taraftan 48 saatlik muamelenin ardından oksidatif stres markırlarının gen ekspresyonunda önemli değişiklikler bulunmamıştır. Bu nanopartiküllere maruz kalmanın protein ve lipidlerde önemli oksidatif hasara neden olabileceğini işaret edilmiştir.

Li *et al.* (2015) canlılar için önemli riskler oluşturabilen karbon nanopartiküllerin zebra balığı üzerine etkilerini değerlendirmek için bir biyospektroskopi araştırması yapmıştır. Çalışmada zebra balığı 21 gün boyunca $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ve $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ olmak üzere iki konsantrasyonda fulleren (C_{60}), uzun veya kısa çok yüzeyli karbon nanotüpler (MWCNTs), ve tek yüzeyli karbon nanotüpler (SWCNTs)'e maruz bırakılmıştır. Uygulamayı takiben zebra balığının beyin, solungaç, yumurtalık ve karaciğer dokularında Fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) ve Raman spektroskopisi ile araştırmalar yapılmıştır. Öte yandan dört dokudaki lipid protein oranları IR spektrumu

ile hesaplanmış, yumurtalık ve beyindeki doymamış lipid seviyesi Raman spektroskopisi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda işaretli lipidlerde belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Araştırmada biyospektroskopik yaklaşımların zebra balığındaki CNP kaynaklı biyokimyasal değişiklikleri tespit etmek için kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir.

Maisano *et al.* (2015) CuO nanopartiküllerin bir Karadeniz deniz kestanesi türü olan *Arbacia lixula* embriyoları üzerine embriyotoksitesini incelemiştir. Deniz suyuna 5 farklı konsantrasyonda ilave edilen CuO nanopartiküllerin gelişimsel gecikmeye, morfolojik anormalliklere neden olduğu, kolinerjik ve seratonerjik sinir sisteminde hasara yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışmada CuO nanopartiküllerin normal nörotransmisyon yoluna girerek larval morfogenezisi etkilediği ortaya konmuştur.

Song *et al.* (2015) *Pimephales promelas*, *Oncorhyncus mykiss* (gökkuşluğu alabalığı), *Danio rerio* (zebra balığı) üzerine 50 nm çaplı küresel şekilli Cu nanopartiküllerin toksik etkisini araştırmıştır. Çalışmada CuNP için LC₅₀ değeri sırasıyla 0,68, 0,28 ve 0,22 mg Cu/L olarak belirlenmiştir. Cu nanopartiküllerin balıkların solungaç hücrelerinde ve solungaçlarında hasara yol açtığı kaydedilmiştir.

Vasyukova *et al.* (2015) *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların derlemesini yaparak karbon karası, grafit nanoplakaları, grafen ve tek-çok duvarlı karbon nanotüplerinde dahil olduğu karbon nanomateryallerin üreme ve gelişmeye olumsuz etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada karbon nanomateryallerin karbon kristal yapısına bağlı olarak belli bir dereceye kadar hayvanlarda üreme ve gelişme üzerine toksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Yine karbon nanomateryallerin erkek ve dişi üremesindeki potansiyel toksisitesi hakkında başlıca bilgi sunulmuş olmasına rağmen, gelecekte yapılacak çalışmalarda nanopartiküllerin karakterizasyonu ve uygulanma yönteminin belirlenmesi gerektiği vurgulanmıştır.

de Souza *et al.* (2014) model organizma olarak zebra balığını kullanarak karbon nanotüplere verilen biyolojik yanıtın detaylı bir *in vivo* çalışmasını yapmıştır. Çalışmada

öncelikle Mn ve Co'ın katalizörlüğünde metanol kimyasal buhar biriktirme yöntemi kullanılarak saf karbon nanotüpleri (CNTs) hazırlanmış, daha sonra çapları 10 nm ile 130 nm arasında değişen kıvrımlı tüpler ile döşenerek asit içinde saflaştırma işlemi yapılmıştır. Araştırmada bir karbon nanotüp ağının, bir yüzey aktif madde varlığında su içinde dağılmış saf CNT'lerden oluştuğu ifade edilmiştir. CNT ağı çökeleklerinin ortalama 500 nm çaplı çok yüzeyli karbon nanotüplerin yığılması ile sonuçlandığı belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda saf CNT'lerin genotoksik etkilerinin olduğu önceden bulunmasına rağmen, *in vivo* ortamda CNT ağının genotoksik olmadığı çalışmada doğrulanmıştır. Araştırma sonucunda zebra balığı solungaçlarında iyileştirilebilir iltahaplanma, hiperemi ve anevrizma gibi minimal bozukluklar tespit edilmiştir. Öte yandan Raman spektroskopisi ve mikroskopi çalışmaları CNT ağının zebra balığının ince bağırsağında etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

Liu *et al.* (2014a) CuO nanopartiküllerin *Daphnia magna* üzerine ve zebra balığının erken gelişim dönemi üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada küçük çaplı partiküllerin daha yüksek toksisiteye neden olduğu, zebra balığının koryondan çıkışını geciktirdiği belirtilmiştir. Nanopartiküllerin zebra balığı larvalarında glutasyon içeriğini düşürdüğü, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Liu *et al.* (2014b) zebra balığı embriyoları üzerine çok yüzeyli karbonnanotüpler (MWCNTs), grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) gibi 3 nanomateryalin toksik etkilerini araştırmıştır. Döllenen 2 saat sonra, zebra balığı embriyoları 96 saat farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 50, 100 mg/L) MWCNTs, GO ve RGO'ya maruz bırakılmıştır. Araştırmada bu üç nanomateryalin hareket, kalp hızı, kuluçka oranı, larva uzunluğu, ölüm ve anomaliler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Uygulanan RGO'nun zebra balığı embriyolarının kuluçkadan çıkma süresini önemli ölçüde artırdığı, RGO ve MWCNTs'nin 96. saatteki yumurta larvasının uzunluğunu azalttığı belirlenmiştir. Öte yandan uygulanan nanomateryallerin zebra balığı embriyolarını öldürmediği ve belirgin bir morfolojik anomali oluşturmadığı kaydedilmiştir. Çalışmada MWCNTs, GO ve RGO'nun zebra balığı embriyosu, kuluçka evresindeki embriyolar ve larva uzunluğu üzerine kısmen toksik etki gösterdiği tespit

edilmiştir. Araştırma sonucunda bu nanomateryallere maruz kalan zebra balığı embriyolarında belirgin bir morfolojik anomali veya ölüm gözlenmemesine rağmen bu üç nanomateryalin toksisitesi üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu rapor edilmiştir.

Adenuga *et al.* (2013) iki tek duvarlı, bir çift duvarlı ve 4 çok duvarlı karbon nanotüpün olası toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla zebra balığı embriyoları kullanmıştır. Çalışmada asit karışımları kullanılarak çözünebilir karbon nanotüpler hazırlanmış, TEM ve diğer teknikler kullanılarak nanotüpler karakterize edilmiştir. Araştırma sonucunda sentezlenen karbon nanotüplerin hiçbirinin zebra balığı embriyolarında önemli gelişimsel anormalliklere neden olmadığı, sentezlenen nanotüplerin ilaç dağıtım araçlarının ve medikal aletlerin yapımında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Jackson *et al.* (2013) yaptıkları derleme çalışmasında karbon nanotüplerin çeşitli endüstriyel uygulamalar ile çevreye salınabildiğini, sulu ortamda bozunmamış veya fonksiyonelleştirilmiş CNT'lerin farklı dağılım davranışı sergilediğini, potansiyel olarak su sütunu boyunca CNT'lere maruziyetin farklı risklere yol açabileceğini ifade etmiştir. Araştırmacılar CNT'lerin biyolojik bariyerleri kolayca geçmediğine işaret etmiş, içselleştirildiğinde CNT'lerin sadece küçük bir bölümünün organizmanın vücut parçalarına girebildiğine değinmiştir. CNT toksisitesinin maruz kalma şartlarına, model organizmaya, CNT tipine, dağılım durumuna ve konsantrasyona bağlı olduğu rapor edilmiştir. Ekotoksikolojik testlerde genel olarak sucul organizmaların karasal organizmalardan, omurgasızların omurgalılarından çok daha hassas olduğu belirlenmiştir. Derlemede tek duvarlı karbon nanotüplerin çok duvarlı karbon nanotüplerden daha toksik olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada çevre üzerine etkisi olmayan konsantrasyonların belirlenmesinin gerekli olduğu vurgulanmış, karşılaştırmalı sonuçlar elde etmek için gelecekte kriter malzemeler ile çalışmanın önemi belirtilmiştir. Yine gelecekte yapılacak çalışmaların maruziyet/ etki ilişkisini daha iyi anlamak için biyolojik son, dağılım gibi başlangıç materyalinin daha iyi karakterizasyonunu içermesi gerektiği önerilmiştir.

Chen *et al.* (2012) zebra balığı ve insan hücreleri üzerine grafen oksit ve çok duvarlı karbon nanaotüplerinin toksik etkisini karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Çalışmada 50 mg/L dozdaki grafen oksidin zebra balığı embriyolarının kuluçkadan çıkmasını çok az geciktirdiği, emriyo apoptozisini önemli oranda artırmadığı, hücre büyümesini çok az oranda inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırmada grafen oksidin organizmalarda orta düzeyde toksisiteye sahip olduğunu önerilmiştir. Öte yandan araştırmada çok duvarlı karbon nanotüplerin 25 mg/L gibi nispeten düşük konsantrasyonda hücre farklılaşmasında güçlü bir inhibisyona yol açtığı ve gelişen embriyolarda ciddi morfolojik kusurlara neden olduğu kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda sonucunda grafen oksit ve MWCNT'nin farklı oranda toksisite göstermesinin organizmalar ve nanomateriyaller arasındaki bağlantının farklı modellerinden ve nanomateriyallerin farklı geometrik yapılarından kaynaklanabileceği önerilmiştir. Yine araştırma sonucunda MWCNT toksisitesinin organizmalar üzerinde potansiyel çevresel risk oluşturduğu ve carbon nanomateriyallerin toksisitesinin geometrik yapısına bağlı olduğu belirtilmiştir.

Karbon nanotüpler eşsiz elektronik ve mekanik özelliklerinden dolayı çok sayıda yeni endüstriyel ve biyomedikal uygulamalar için ilgi çekmektedir. Bu materyallerin kullanım alanı ve üretim miktarı arttığından dolayı insan sağlığı için potansiyel risk oluşturmaktadırlar. Aschberger *et al.* (2010) karbon nanotüplerin insan sağlığı üzerine oluşturduğu riski değerlendirmek için literatür taraması yapmıştır. Çalışmada insanlar için esas riskin kontrol edilmeyen maruziyet ve yüksek CNT salınımının yer aldığı aktiviteler esnasındaki kronik mesleki solunumdan kaynaklandığına işaret edilmiştir. Karbon nanotüplerin genotoksik potansiyelinin araştırma aşamasında olduğu henüz tam anlamıyla ispat edilmediği belirtilmiştir. Çalışmada karbon nanotüplerin sistemik etkilerinin ya karbon nanotüplerin hassas organlardaki dağılımı ve absorpsiyonuna ya da inflamatuara araçların dağılımına bağlı olabildiği rapor edilmiştir.

Yeo and Kim (2010) zebra balığı embriyoları üzerine TiO₂ nanopartiküllerin toksik etkilerini araştırmıştır. Çalışmada 3 farklı boyutta TiO₂ nanopartikülü zebra balığı embriyoları üzerine uygulanmış, partikül boyutuna göre zebra balığı embriyonik hücrelerinde meydana gelen değişimler kaydedilmiştir. Yine zebra balığı larvalarında

uygulanan nanopartikül boyutuna bağlı olarak tümör nekrozis faktör (TNF), interferon (IFN), interlökin (IL1B) gibi immün sistem genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Çalışmada özellikle 12-14 nm boyutunda olan TiO₂ nanopartiküllerin toksik etkiye neden olduğu ve immün sistem genlerinin ekspresyonlarını değiştirdiği bildirilmiştir.

Aillon *et al.* (2009) materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin nanoskopik seviyede dramatik olarak değişebildiğini, nanoteknolojinin kullanımının artışının beklenmeyen toksisite ve biyolojik ilişkileri dikkatlice değerlendirmeyi gerektirdiğini, ancak *in vivo* toksisite çalışmalarının çoğunun nanopartiküllerin akciğer, oral veya dermal maruziyet üzerine başlıca odaklandığını rapor etmiştir. Derlemede nanomateryallerin tanı ve tedavi araçları olarak yaygınlaşmakla birlikte, mühendislik olarak geliştirilen nanomateryallerin toksik açıdan değerlendirilmesinin oldukça kritik olduğuna da değinilmiştir. Yine yapılan derlemede nanomateryallerin karmaşık doğasından dolayı, çelişkili çalışmaların onların güvenilirliği konusunda farklılıklara neden olduğuna işaret edilmiştir. Aillon *et al.* (2009) sistemik maruziyetten sonra nanomateryallerin toksisitesi ile ilişkili olarak dört örnek (dendrimerler, karbon nanotüpler, quantum noktalar ve altın nanopartiküller) nanomateryalin fizikokimyasal özelliklerini tartışmıştır.

Karbon nanotüpler biyomedikal uygulamalarda oldukça fazla kullanılmasına rağmen *in vivo* biyodağılımı ve biyoyumluluğu üzerine bilgimiz oldukça azdır. Cheng *et al.* (2009) fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüplerin *in vivo* dağılımını ve gelişmekte olan zebra balığına uzun süreli etkisini araştırmıştır. Çalışmada flöresan işaretli MWCNTs döllenen 72 saat sonra ve 1 hücreli evredeki zebra balığı embriolarına mikroenjeksiyon yoluyla verilmiş, tek enjeksiyondan sonra fonksiyonelleştirilmiş MWCNTs ve zebra balığı arasında hem akut hem de kronik etkileşim çalışılmıştır. Enjekte edilen FITCH-BSA-MWCNTs (1 hücreli evrede) proliferasyon boyunca embriyonun bütün blastoderm hücrelerine girmiştir. Dolaşım sistemine geçtiğinde FITCH-BSA-MWCNTs bölmeler içinden hızlıca geçmiş ve verilmesinden 96 saat sonra vücudu terk etmiştir. Uygulama yapılan zebra balığı

embriyoları erken evrede trunk bölgesinden beyaz kan hücrelerini dolaşıma vermek suretiyle immun yanıt oluşturmuştur. Transmisyon elektron mikroskopu altında uygulama yapılan embriyoların blastoderm hücrelerinde çok sayıda lizozom benzeri veziküller gözlenmiştir. MWCNTs verilen zebra balıklarında erken evrede daha sonra ikinci jenerasyon oluşturan normal primordiyal üreme hücreleri belirlenmiştir. Ancak, kontrol ile kıyaslandığında ikinci jenerasyon larvalarda hayatta kalma oranının düştüğü, MWCNT'lerin üreme potansiyeli üzerine negatif etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak uzun süreli temizleme ve fonksiyonelleştirme işlerinin karbon nanotüplerin biyoyumluluğunun gelişmesine yardım edebileceği önerilmiştir. Yine vücuda verilen karbon nanotüplerin uzun vadede toksik etkiye neden olacağına işaret edilmiştir.

Fako and Furgeson (2009) akut ve kronik toksisiteyi değerlendirmek için ilişkili ve tahmini modellerin eksikliğinin yeni tedavilerin klinik öncesi aşamalarını sınırlandığını belirtmiştir. Araştırmacılar bu engelin kesin ve sağlam tarama ölçümleri ve kabul edilebilir standartların eksikliği ile birleştiğinde nanoteknoloji ve nanoterapötiklerin hızlı gelişimini kısmen sınırlandığına da kaydetmişlerdir. Araştırmacılar *in vitro* hücre kültürleri kullanılarak bir nanomateriyalin toksisitesini tarama işleminin kısmen basit ve ucuz bir yöntem olduğunu, bununla birlikte zahmetsiz bir *in vivo* sistemi hayal etmenin nerdeyse imkansız olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar insanda nanomateriyallerin biyodağılımı ve mümkün toksisitesini değerlendirmek için küçük hayvansal model organizmalar kullanmanın yaygın metot olduğunu, alternatif olarak zebra balığının nanomateriyallerin toksisitesini değerlendirmek için hızlı, ucuz, kısmen kolay bir model olduğunu rapor etmişlerdir.

Griffitt *et al.* (2007) 1,5 mg/L konsantrasyonda zebra balığı embriyolarına uygulanan Cu nanopartiküllerin larvalarda akut toksisiteye yol açtığını, solungaçlara hasar verdiğini rapor etmiştir. Çalışmada Cu nanopartiküllerin su içerisinde dağılımının hemen ardından hızlıca agrega olduğu kaydedilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlara bağlı olarak solungaç hücrelerinde çeşitli genlerin ekspresyonlarında değişim olduğu tespit edilmiştir.

Smith *et al.* (2007) gökkuşağı alabalığında tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT) toksisitesini detaylı olarak ilk tanımlayan araştırmacılarıdır. Çalışmada SWCNT stok solüsyonu bir sonikatör ve bir çözücü (sodyum dedosil sülfat, SDS) kombinasyonu kullanılarak hazırlanmıştır. Ya yalnızca su (kontrol) ve çözücü ya da 0,1, 0,25 ve 0,5 mg^l⁻¹ SWCNT uygulanmış gökkuşağı alabalıkları bir yarı statik test sistemi kullanılarak 10 gün boyunca yetiştirilmiştir. SWCNT uygulaması doza bağımlı olarak ventilasyon oranında, solungaç patolojisinde ve mukus salgılanmasında artışa neden olmuştur. Kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin sayısında, hematokrit, kan hemoglobini, plazma sodyum veya potasyumunda anormallikler ve majör hematolojik veya kan bozuklukları gözlenmemiştir. Dokudaki metal seviyeleri genel olarak etkilenmemiştir. Ancak beyin ve solungaç çinko ve bakır oranlarında doza bağlı değişiklikler kaydedilmiştir bu durum çözücü uygulamalarında da tespit edildiği için çözücüye atfedilmiştir. SWCNT uygulaması solungaç ve bağırsak Na⁺K⁺-ATPase aktivitesinde istatistiki olarak önemli artışa neden olmuştur. Kontrol ile kıyaslandığında SWCNT uygulaması solungaç, beyin ve karaciğerde TBARS seviyesini doza bağlı olarak önemli oranda azaltmıştır. Çözücü kontrol ile mukayese edildiğinde SWCNT uygulaması total glutatyon seviyesini karaciğer ve solungaçta önemli oranda artırmıştır. Ancak beyin ve barsak glutatyon seviyesini değiştirmemiştir. Beyin serebellumunun ventral yüzeyinde şişmeler ve anevrizmalar temel patolojik bulgulardandır. SWCNT uygulanan balıkların karaciğerinde anormal nükleus bölünmesi geçiren hücreler ve kondanse nükleer bölgeler gözlenmiştir. SWCTT uygulanan balıklarda deney sonucunda bazı balıklarda agresif davranışlar, muhtemel beyin hasarlarından veya solungaç kaşıntıları ile ilişkili ölümler kaydedilmiştir. Dahası SWCNT'lerin oksidatif strese neden olduğu, su alınımında dengesizliklere yol açtığı, solunum sisteminde toksisiteye neden olduğu belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri

Çalışmalar Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akvaryum Balığı Üretim ve Araştırma Merkezi, Atatürk Üniversitesi DAYTAM Laboratuvarları ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2. Balık Materyali

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akvaryum Balığı Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen zebra balığı (*Danio rerio*) yumurta ve larvaları kullanılmıştır.

3.3. Nanomateryaller

Deneyleerde kullanılan bakır oksit nanopartikülü (CuO NP) Sigma-Aldrich firmasından (Lot: MKBN9141V), karboksil grubu ile fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-COOH) Nanoamor firmasından (Lot:1268-040815) temin edilmiştir.

3.4. Nanomateryallerin Karakterizasyonu ve Su İçerisinde Dağılımı

Nanomateryallerin boyutunun belirlenmesi ve karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss Sigma 300) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM, Hitachi HT7700) kullanılmıştır. Kullanılan nanomateryallerden stok çözelti hazırlamak amacıyla 2,5 g CuO NP yada MWCNT-COOH 10 ml ultra saf su içinde süspansiyon edilerek 30 dakika sonikatörde sonikasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu stok çözeltilerden CuO NP için 0,5, 1 ve 1,5 mg/L, MWCNT-COOH için 5, 10 ve 20 mg/L çözeltiler hazırlamak amacıyla stok çözeltilerden uygun konsantrasyonda nanomateryal alınarak ultra saf su ile hazırlanmış 1 litrelik E3 çözeltilisine ilave edilmiş ve 30 dakika

sonikatörde sonikasyon yapıldıktan sonra kullanılmıştır. Deneylede kullanılan konsantrasyonlar daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir (Cheng *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014; Maes *et al.* 2014; Song *et al.* 2015; Sun *et al.* 2016).

500 ml E3 stok solüsyonunun hazırlanışı;

- 8,6 gr NaCl tartılır, 300 ml saf su ilave edilir ve manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
- Ardından sırasıyla 0,38 gr KCl, 1,1 gr CaCl₂ ve 2,45 gr MgSO₄ tartılır ve karıştırıcıda karışmakta olan karışıma ilave edilir. Tamamen çözüldükten sonra 200 ml saf su ilave edilir.

1000 ml E3 çözeltisinin hazırlanışı;

- Stok E3 solüsyonundan 16 ml alınır ve 981 ml saf su ilave edilir.
- 3 µL metilen mavisi eklenir.

Metilen mavisi çözeltisinin hazırlanışı;

0,01 gr metilen mavisi tartılır ve üzerine 100ml saf su ilave edilir.

3.5. Uygulamalar

Zebra balığı embryo/larvalarına nanomateryallerin uygulanması Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. 25×30×18,5 cm (yükseklik, en, boy) ebadında stok akvaryumlarda erkek ve dişi birbirlerinden ayrı olarak stoklanmış 5 aylık sağlıklı zebra balıkları alınarak 14:10 saat ışık karanlık periyodu ve 28°C sıcaklığı olan cam akvaryumlarda 7 gün boyunca ortam koşullarına adapte edilmiştir. Bu esnada balıklar günde 2 kez *Artemia salina* ile beslenmiştir.

Çiftleşme akvaryumu olarak 15,5×30×25 cm (yükseklik, en, boy) ebadında 4 akvaryum alınarak sağlıklı zebra balıklardan 10 dişi ve 20 erkek birey (Toplamda 40 dişi ve 80 erkek) çiftleşmeye bırakılmıştır. Balıkların yumurtaları yemesini engellemek amacıyla akvaryumların tabanlarına 2 sıra cam bilye ve cam bilyelerin altına cam ızgara yerleştirilmiştir. Ertesi sabah yumurtalar cam bilyeler arasında gözlenmiş, ebeveynler uzaklaştırıldıktan sonra yumurtalar sifonlanarak akvaryumdan steril beher içerisine alınmıştır. Döllenen ve döllenmemiş yumurtalar stereo mikroskop altında steril pasteur pipetler kullanılarak seçilmiştir. Yumurtalar önceden dinlendirilmiş musluk suyu ile birkaç kez yıkandıktan sonra içerisinde E3 solüsyonu bulunan steril beherlere alınarak önceden steril edilmiş ve 28°C sıcaklığa ayarlanmış etüvde inkübe edilmiştir. Döllenen 4 saat sonra embriyolar stereo mikroskop altında incelenerek normal gelişen ve blastula evresine ulaşan embriyolar deneylerde kullanılmıştır. Bu amaçla, önceden steril edilmiş petri kaplarına kontrol için yalnızca 50 ml E3 çözeltisi (her bir petri için), nanomateryal uygulamaları için sonike edilmiş nanomateryal süspansiyonundan 50 ml (her bir petri için) konulmuş ve her bir petriye 50 zebra balığı embriyosu bırakılmıştır. Deney grupları 5 petri×50 embriyo=250 embriyo olacak şekilde ayarlanmış ve deneyler 3 paralel yapılmıştır. Embriyolar 28°C sıcaklığa ayarlanmış etüvde 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Solüsyonlar 24 saatte bir değiştirilmiş ve ölü embriyo/larvalar toplanmıştır. 96. saatte her bir uygulama grubundan 120'şer larva kuru buz üzerinde alınmış ultra saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra RNA izolasyonu için 60'ar adet larva RNA later eklenerek gen ekspresyonu analizleri için -80°C'de saklanmıştır. Geriye kalan larvalar ise Raman mikrospektroskopisi analizlerinde kullanılmıştır.

3.6. Ölüm Oranı, Koryondan Çıkış, Malformasyonlar ve Kalp Atış Oranı

Zebra balığı embriyo/larvalarının ölüm oranı, koryondan çıkış oranı ve malformasyonları standart bir stereo mikroskop (Imager. A2 Zeiss, Germany) kullanılarak 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kaydedilmiştir. Uygulamalar esnasında ölü embriyo/larvalar derhal petrilere alınmıştır. Mortalite kriteri olarak embriyo koagülasyonu, kalp atışının olmayışı, somit gelişmede başarısızlık kabul edilmiştir.

Mortalite oranı ölen birey sayısının toplam birey sayısına oranlanması ile belirlenmiştir. Koryondan çıkış oranı ise, koryondan çıkan bireylerin canlı kalan bireylere oranlanması ile tespit edilmiştir. Kalp ödemi, vitellüs kesesi ödemi, vertebra deformasyonu ve vücut anomalilerini (kuyruk anomalisi, kuyruğun olmayışı, aksiyal malformasyonlar vb.) içeren malformasyonlar incelenerek malformasyon gösteren birey sayısının tüm birey sayısına oranlanması ile malformasyon oranları belirlenmiştir. Zebra balığı embriyo/larvalarına ait kalp atışı oranları 48. ve 72. saatte kaydedilmiştir. Kalp atışı sayımı için her bir uygulama grubundan rastgele 24 embriyo/larva seçilmiş, embriyo/larvaların kalp atışlarının sabit olması için embriyo/larvalar 10 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra video kaydı altında 20 saniye boyunca kalp atışları sayılmıştır.

3.7. Raman Mikrospektroskopisi Analizleri

Saf CuO NP, saf MWCNT-COOH, kontrol, CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarına ait Raman spektrumları Atatürk Üniversitesi-DAYTAM bünyesinde yer alan WITech alpha 300R Raman mikrospektroskopisi kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.1). Saf CuO NP ve MWCNT-COOH'a ait spektrumları toplamak için, 20 mg toz nanomateryal cam üzerine düz bir katman oluşturacak şekilde yayıldıktan sonra, 100 X objektif altında, 532 nm lazer dalga boyu, 50 mW lazer gücü, 600 gr/mm grating ve 25 saniyelik toplama zamanında spektrumlar toplanmıştır. Öte yandan, 96 saatlik kontrol, CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvaları kuru buz üzerinde %4'lük paraformaldehit (PFA) çözeltisine alındıktan sonra 1 gece buzdolabında (+4°C) bekletilmiş, daha sonra fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile 15 dakika boyunca 2 kez yıkandıktan sonra Leica marka OCT gömme medyumunda örnek tutucuya gömülmüş, -30°C'de medyum donuncaya kadar beklenmiştir. Leica CM1950 marka kriostat (Şekil 3.2) kullanılarak örneklerden 30 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Her bir uygulama grubundan 3 (3×3 paralel=9 örnek) örnekten kesit alınmıştır. Kesitlerin baş, vitellüs kesesi ve kuyruk olmak üzere 3 farklı bölgesinden Raman mikrospektroskopisi ile 3'er defa spektrumlar toplanmıştır. Spektrumlar yine 100 X objektif altında, 532 nm lazer dalga boyu, 50 mW lazer gücü,

600gr/mm grating ve 25 saniyelik toplama zamanında toplanmıştır. Elde edilen spektrumlarda kozmik ışınlardan kaynaklanan bantlar Witec Project 4 programı kullanılarak, spektrumlardaki gürültüler ise Savitzky-Golay metodu kullanılarak kaldırılmıştır. Kontrol, CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının dokulardan elde edilen spektrumlar saf nanomateryal spektrumlarıyla karşılaştırılıp grafik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan mikro Raman



Şekil 3.2. Kesitlerin alınmasında kullanılan kriostat

3.8. RNA İzolasyonu ve Real-time PCR

3.8.1. Total RNA izolasyonu

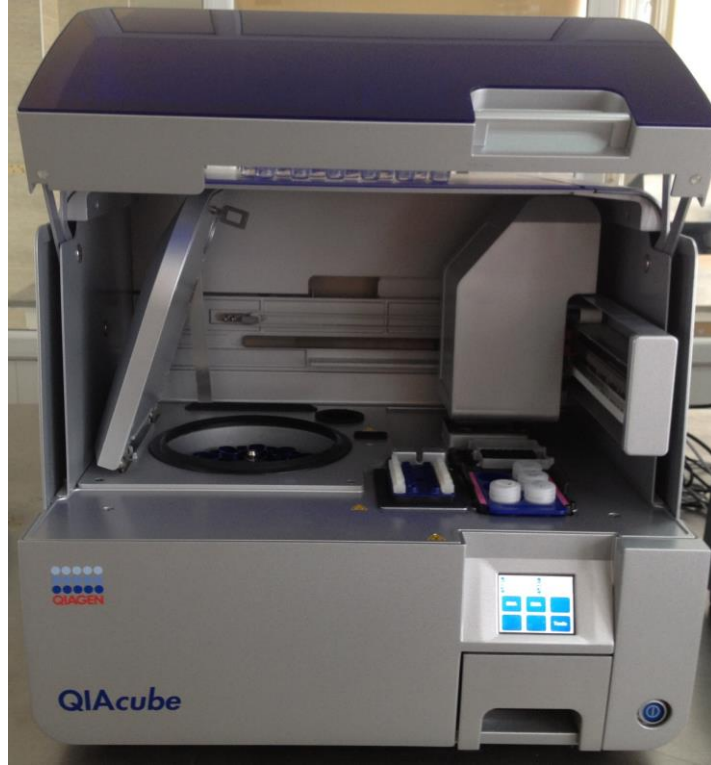
Real time PCR’da kalıp olarak kullanılacak cDNA elde etmek için 96 saatlik zebra balığı larvalarından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla her bir deney grubundan 60’ar larva kullanılmıştır. Zebra balığı larvaları doku parçalayıcısında (Şekil 3.3) iyice parçalandıktan sonra total RNA üretici firmanın protokolü doğrultusunda hayvan dokuları için RNeasy mini kit (Qiagen, Basel, Switzerland) kullanılarak nükleik asit izolasyon robotunda (Şekil 3.4) izole edilmiştir. Elde edilen RNA’nın konsantrasyonu ve saflığı bir Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

RNA izolasyonunda otomatik sisteme yükleme aşamasına kadar aşağıda belirtilen aşamalar takip edilmiştir.

1. RNA later solüsyonundan arındırıldıktan sonra 60 adet larva steril 2 ml’lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 350 µL RLT ve β-merkaptoetanol karışımından ilave edilmiştir. Tüpün içerisine 5 mm’lik 1 adet çelik boncuk (Qiagen Cat No:69989) atılmıştır. Tissuelyser LT’ de 30 Hz’de 6 dakika süreyle parçalanmıştır.
2. İyice parçalanan doku örneklerinin içinden çelik boncuklar çıkartılıp ardından örnekler 18000 rpm’de 4°C’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüjlenen örneklerde oluşan 2 tabakadan üste olan fazdan yaklaşık 350 µL alınarak yeni steril 2 ml’ lik tüp içerisine aktarılmıştır.
4. Alınan fazlar QIAGEN- QIACUBE DNA-RNA izolasyon robotuna koyulmuştur.
5. Cihazdan alınan izole olmuş RNA’lar -80°C’de çalışmaya kadar saklanmıştır.



Şekil 3.3. Larvaların parçalanmasında kullanılan doku parçalayıcı



Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan otomatik nükleik asit izolasyon robotu

3.8.2. RT-PCR ile cDNA kütüphanesinin oluşturulması

cDNA'nın sentezi üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda RT² First Strand cDNA Synthesis Kit (Qiagen, Basel, Switzerland) kullanılarak yapılmıştır. Analizler süresince Thermo model RT-PCR kullanılmıştır. cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümlerle cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılacak konsantrasyonları hesaplanmıştır. Konsantrasyonlar 1 µg/µL olacak şekilde ayarlanmıştır.
2. 0,2 ml'lik steril PCR tüplerine her RNA örneği için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanmıştır. 2 µL Buffer GE koyulmuş ve sonra toplam hacmi 10 µL'ye tamamlamak için üzerine total RNA'dan hesaplanan miktarda (x) eklenmiştir. Üzerine 8-x µL RNase-free water ilave edilmiştir.
3. Daha sonra kısaca santrifüjlenmiştir.
4. Sonra genomik DNA eliminasyon karışımı 42 °C'de 5 dak. inkübe edilmiştir. Ardından en az 1 dak. buz üzerinde bekletilmiştir.
5. Sonra 4 µL 5x Buffer BC3, 1 µL Kontrol P2, 2 µL RE3 Reverse Transkriptaz mix, 3 µL RNase-free water ile ters transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır.
6. Genomik DNA eliminasyonu içeren her tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı ilave edilmiştir ve yavaşça pipetlenmiştir.
7. 42°C'de 15 dak ve 95°C'de 5 dak. PCR'da tutulmuştur.
8. Ardından cDNA'ları optimize etmek için her bir tüpe 40 µl RNase-free water eklenmiş ve yavaşça pipetlenmiştir.
9. Böylece cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve örnekler çalışılincaya kadar -20 °C'de stoklanmıştır.

3.8.3. Real-time PCR uygulamaları

Real-time PCR ise gene spesifik primerler (Tablo 3.1) ve cDNA ile birlikte SYBR Green (RT² SYBR Green master mix, Qiagen, Cat. No: 330500) kullanılarak Rotor-gene Q (Qiagen) cihazında yapılmıştır. PCR işlemleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Referans (housekeeping) gen (aktin) kullanılarak her bir genin mRNA ekspresyon seviyesi normalize edilmiş, genlerde meydana gelen değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak hesaplanmış ve kontrole göre kat değişimi (fold change) olarak verilmiştir. PCR özgünlüğünü doğrulamak için erime eğrisi analizi yapılmıştır. Rölatif gen ekspresyonu analizleri ve genler arasındaki hiyerarşik kümeleme analizleri GenGlobe veri analiz yazılımı (Qiagen- <https://www.qiagen.com/tr/geneglobe>) kullanılarak yapılmıştır. RT² SYBR Green master mix kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR karışımı ve sıcaklık protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde 12,5 µl RT² SYBR Green master mix, 1 µl cDNA synthesis reaction, 1 µl RT² qPCR Primer Assay, 10,5 µl RNase free water eklenmiştir.
2. 95°C'de 10 dakika ve 40 döngü şeklinde 95°C 15 saniye, 60°C 1dakika olacak şekilde sıcaklık döngüsü kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Real-time PCR işlemlerinde kullanılan primer çiftlerine ait baz dizilişleri

Gen	Kısa ismi	Primer (5'-3')	Kaynaklar
Metal transcription factor 1	<i>mtf-1</i>	Forward: GATTGAGCTTCTCCGTCAGG Reverse: TCCTCGTCTTCTCTTCTCG	(Griffitt <i>et al.</i> 2007)
Heat shock protein70	<i>hsp70</i>	Forward: GGAAAAGAGGGAAGCTTTGG Reverse: ACGTTCCATGTTCCAGACC	(Griffitt <i>et al.</i> 2007)
Nuclear factor $\kappa\beta$	<i>nfk\beta</i>	Forward: AGAGAGCGCTTGCCTCCTT Reverse: TTGCCTTTGGTTTTTCGGTAA	(Oyarbide <i>et al.</i> 2015)
Interleukin-1	<i>Il-1\beta</i>	Forward: CATTTCAGGCCGTCACA Reverse: GGACATGCTGAAGCGCACTT	(Oyarbide <i>et al.</i> 2015)
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β	<i>cebp</i>	Forward: GCGACGCGAGAGGAACA Reverse: TGCGCATTTTGGCTTTGTC	(Krishnaraj <i>et al.</i> 2016)
Transferrin	<i>trf</i>	Forward: TGGACGGCAGCAGGAAAA Reverse: GCAGGCTCTTGCGGAAGT	Oyarbide <i>et al.</i> 2015)
Toll like receptor4	<i>tlr4</i>	Forward: GGGAAGTCAATCGCCTCCA Reverse: ACGGCTGCCATTATTCTT	(Krishnaraj <i>et al.</i> 2016)
Toll like receptor22	<i>tlr22</i>	Forward: CCAGCTCTCGCCGTACCA Reverse: TTGGGCCAGCGGATGT	Oyarbide <i>et al.</i> 2015)
Actin	<i>actb</i>	Forward: TGCTGTTTTCCCTCCATTG Reverse: TTCTGTCCCATGCCAACCA	Oyarbide <i>et al.</i> 2015)

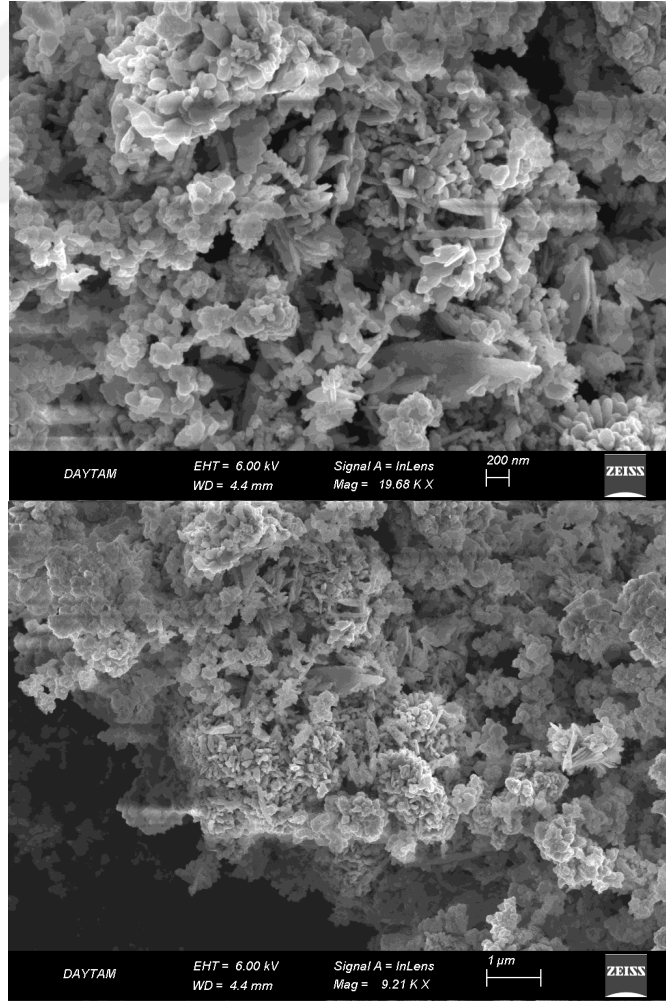
3.9. İstatistiksel analiz

Ölüm oranı, koryondan çıkış oranı, malformasyon oranı ve kalp atışı oranı ortalama standart hata (SEM) olarak verilmiştir. Sonuçların hesaplanmasında SPSS 20.0 paket programı kullanılmış ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İstatistik anlamlar, $*p < 0.05$ hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir. Gen ekspresyonu sonuçları ise ortalama standart sapma (SDM) olarak verilmiştir. Kontrol grupları ve uygulama grupları arasında çalışılan genlerin ekspresyonunun kat değişiminin istatistiksel önemini değerlendirmek için GenGlobe veri analiz yazılımı (Qiagen- <https://www.qiagen.com/tr/geneglobe>) tarafından sağlanan Student's t-test kullanılmıştır. İstatistik anlamlar $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ hata seviyesinde verilmiştir.

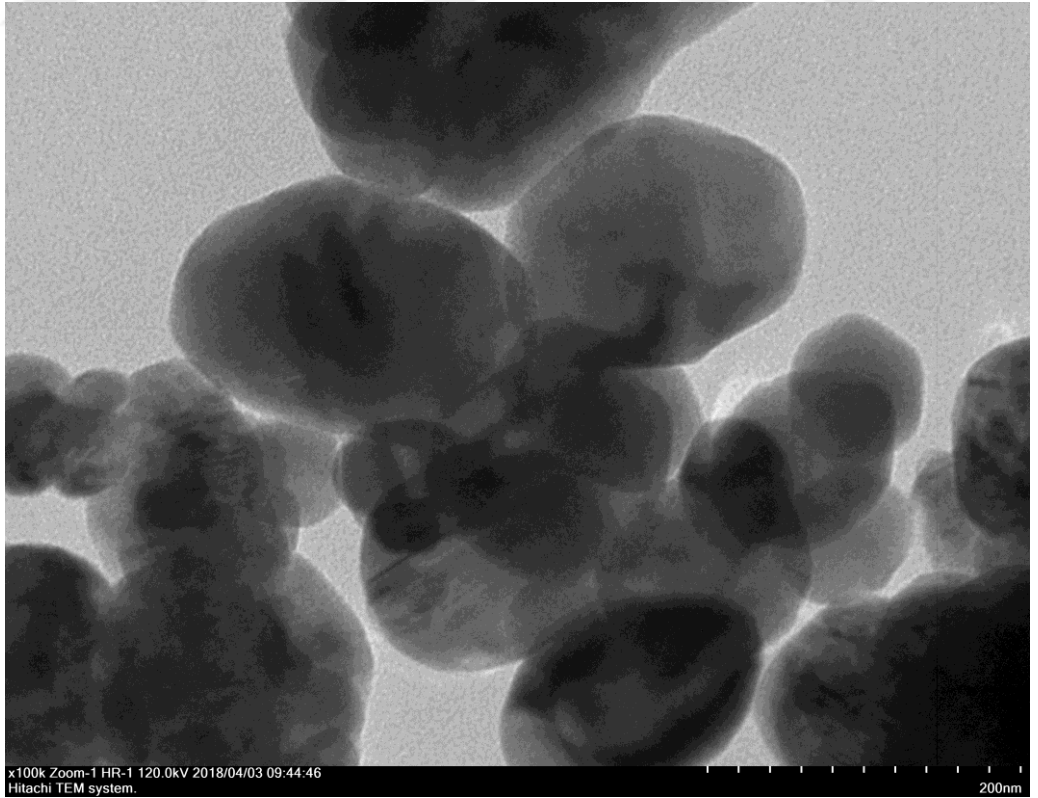
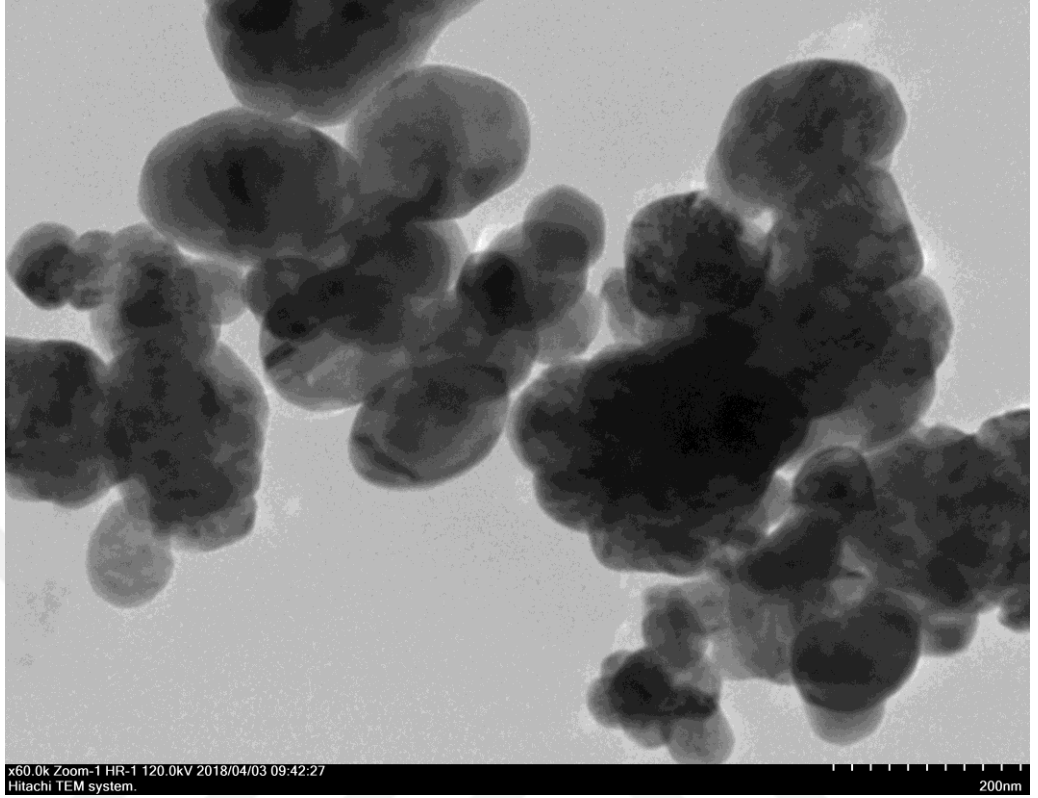
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kullanılan Bakır Oksit Nanopartikülü (CuO NP) ve Karboksil Grubu İçeren Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNT-COOH) Karakterizasyonu

Araştırmamızda kullanılan CuO NP'e ait SEM ve TEM görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. SEM ve TEM görüntülerinden partiküllerin farklı şekil ve çaplarda oldukları görülmektedir. Küçük partiküllerin daha çok yuvarlak biçimli, daha büyük olanların ise şekillerinin düzensiz olduğu kaydedilmiştir. Kullanılan CuO NP'in boyutu <50 nm'dir.

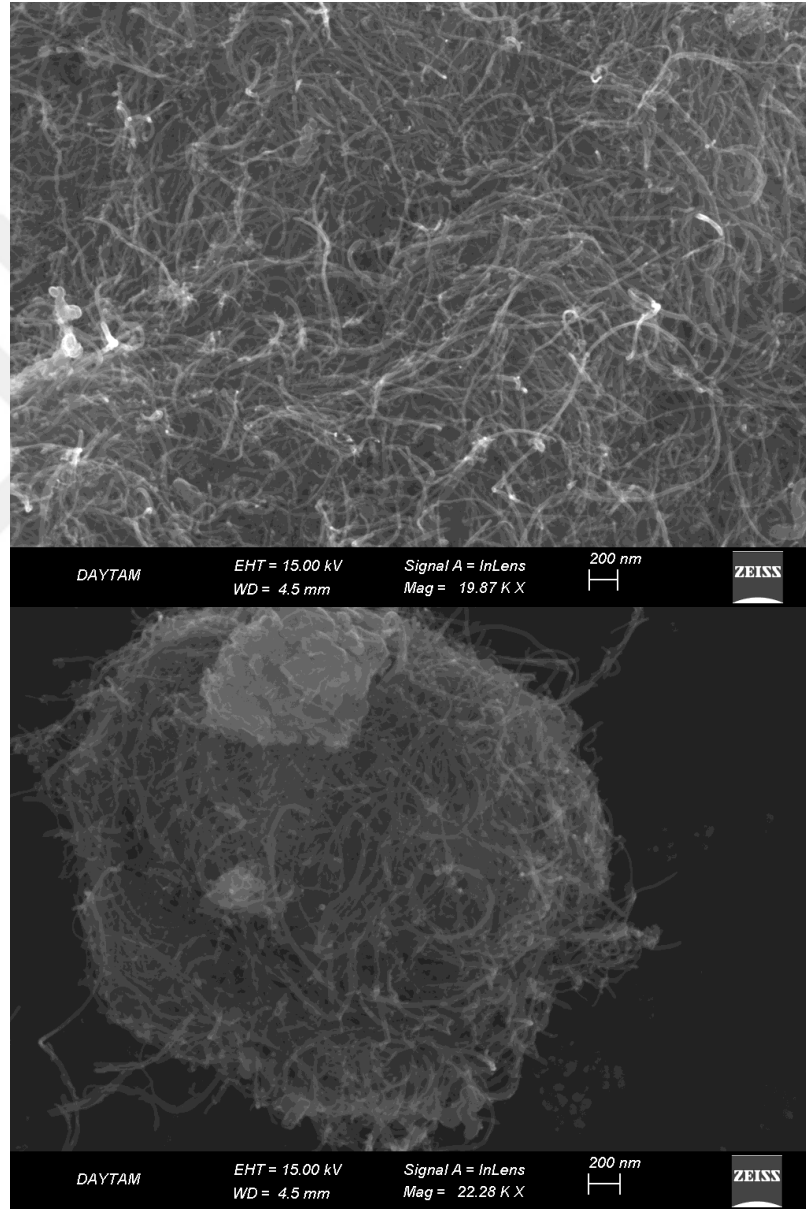


Şekil 4.1. CuO NP'e ait SEM görüntüsü

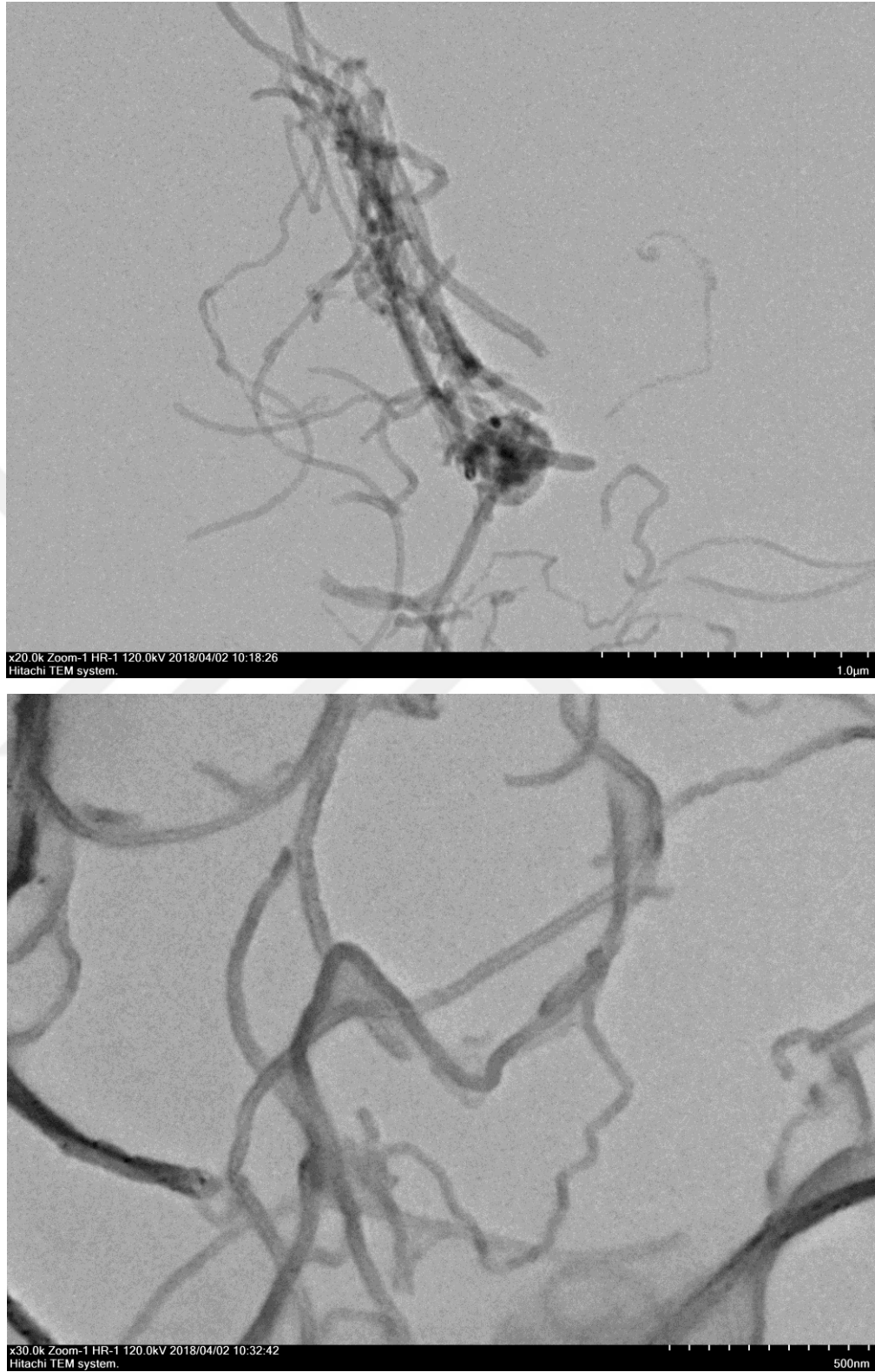


Şekil 4.2. CuO NP'e ait TEM görüntüsü

Çalışmamızda kullanılan MWCNT-COOH'a ait SEM ve TEM görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Elde edilen SEM ve TEM görüntüsünde nanotüplerin demetler halinde dağıldığı görülmektedir. Kullanılan MWCNT-COOH'un çapı 8-15 nm ve boyu 10-50 μm 'dir.



Şekil 4.3. MWCNT-COOH'a ait SEM görüntüsü

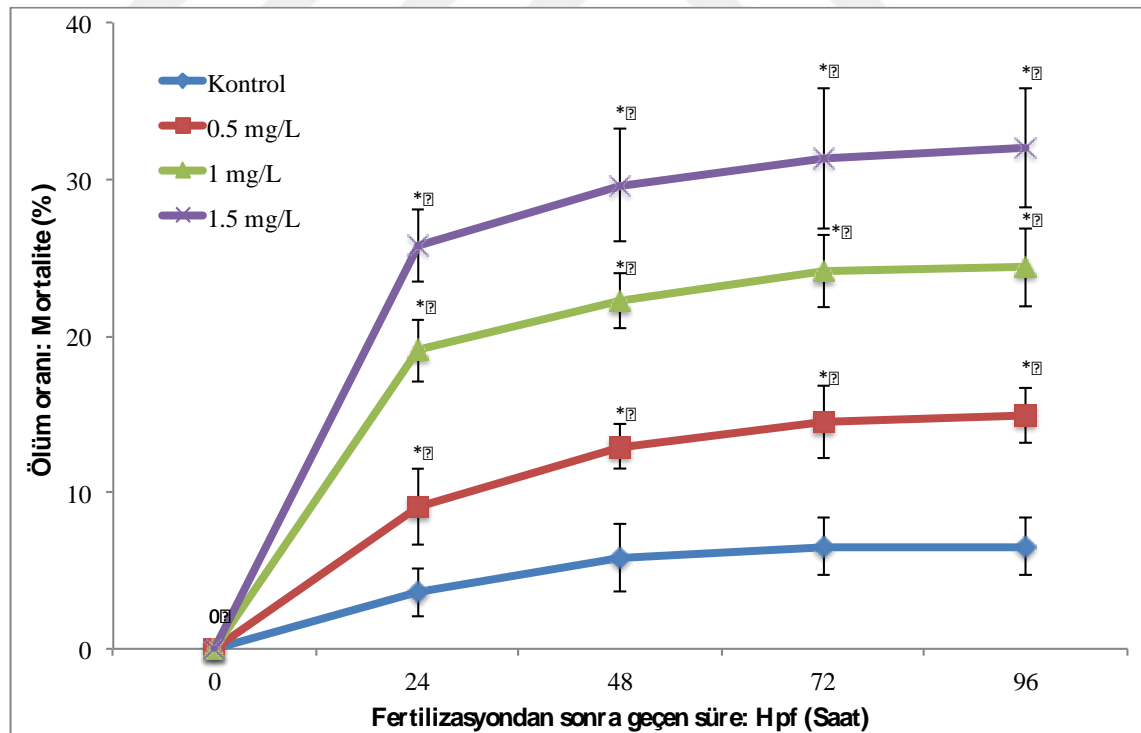


Şekil 4.4. MWCNT-COOH'a ait TEM görüntüsü

4.2. Zebra Balığı Embriyo/Larvalarının Gelişimi Üzerine CuO NP ve MWCNT-COOH'un Etkileri

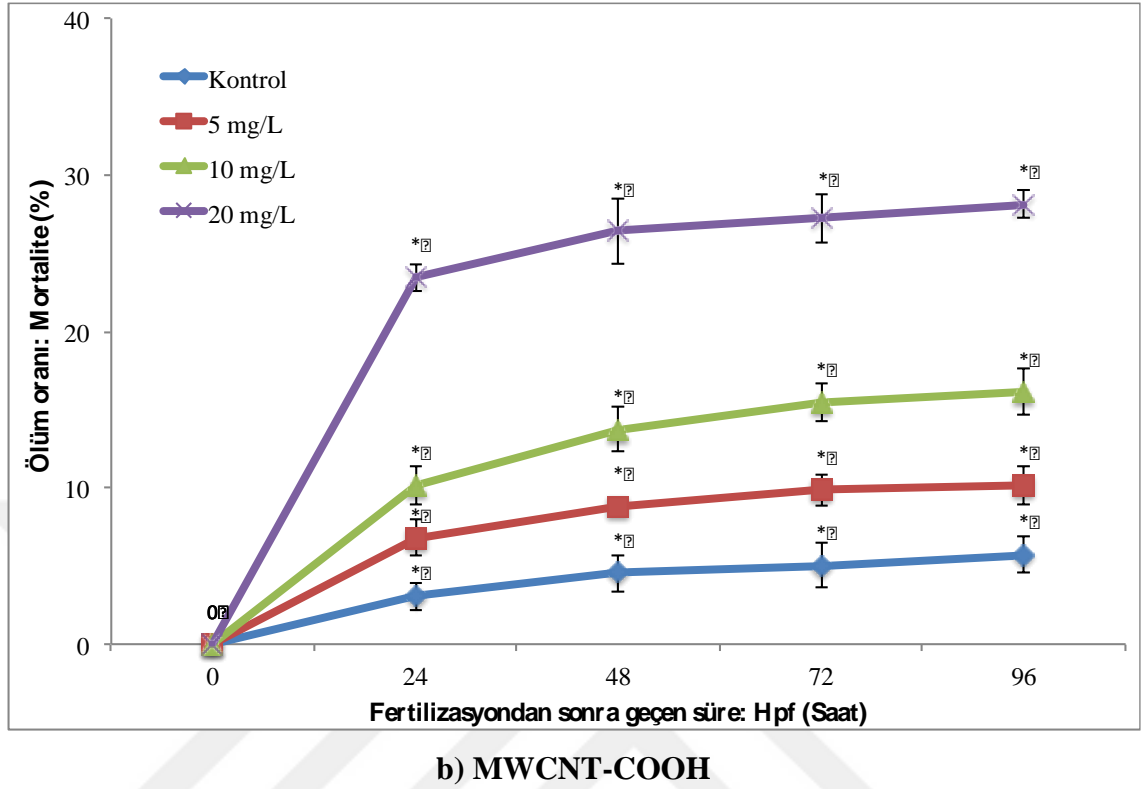
4.2.1. Ölüm oranı

CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarındaki ölüm oranları Şekil 4.5 a ve b'de verilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde uygulanan her iki maddenin doz artışına bağlı olarak zebra balığı embriyo/larvalarında ölüm oranını önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Embriyo/larva ölümleri en fazla ilk 24 saat içinde kaydedilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında balıklara uygulanan 1,5 mg/L CuO NP'nin ve 20 mg/L MWCNT-COOH'un ölüm oranını 96. saatte yaklaşık 5 kat artırdığı belirlenmiştir. Embriyo/larvalara uygulanan 10 mg/L MWCNT-COOH 96. saatte larvaların %16,13'ünü öldürürken, 20 mg/L MWCNT-COOH %28,13'ünü öldürmüştür.



a) CuO NP

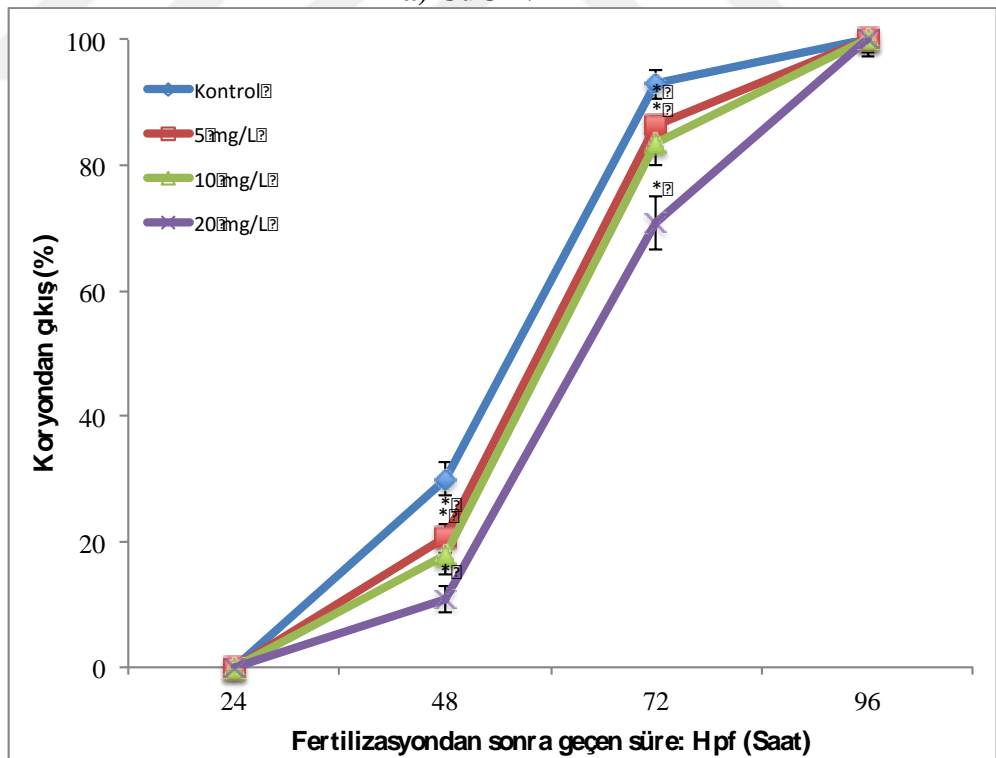
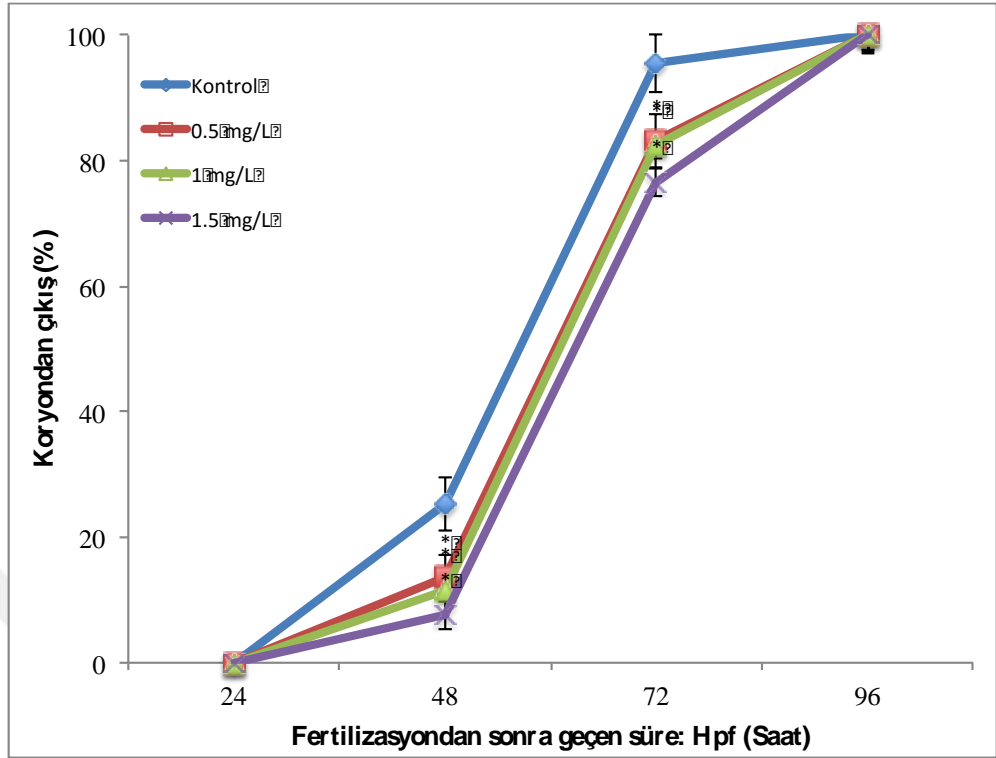
Şekil 4.5. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında ölüm oranı (Mortalite) (*p<0,05)



Şekil 4.5. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında ölüm oranı (mortalite) (* $p < 0,05$)

4.2.2. Koryondan çıkış

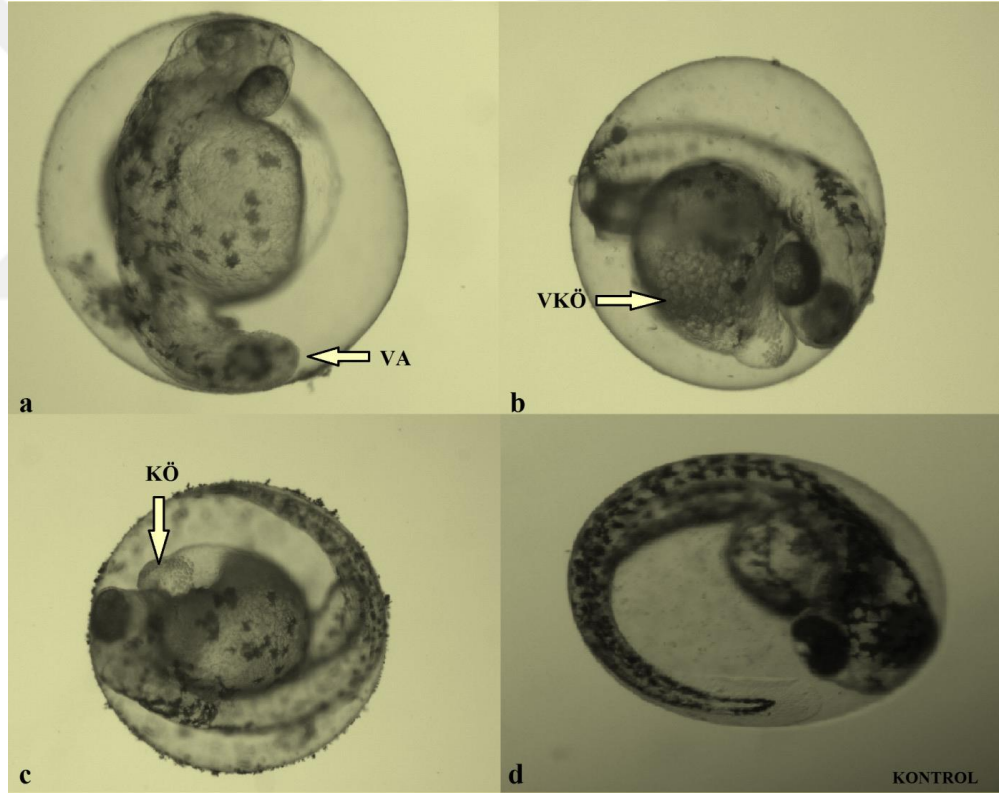
Koryondan çıkış zebra balığı embriyogenezisinde kritik periyot olarak bilinmektedir. Hem kontrol grubunda hem de çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan CuO NP ve MWCNT-COOH gruplarında embriyolar 48. saatte koryondan çıkmaya başlamış ve 96. saatte tüm yaşayan embriyolar koryondan çıkmıştır (Şekil 4.6a, b). Uygulanan her iki maddenin doz artışına bağlı olarak 48-72. saatler arasında koryondan çıkış oranını azalttığı tespit edilmiştir. Örneğin, 72. saatte 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış larvaların %76,68'i koryondan çıkmışken bu oran kontrol grubunda %95,56 olarak kaydedilmiştir. Yine 72. Saatte 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvaların %70,92'si koryondan çıkmışken bu oran kontrol grubunda %92,94 olarak belirlenmiştir.



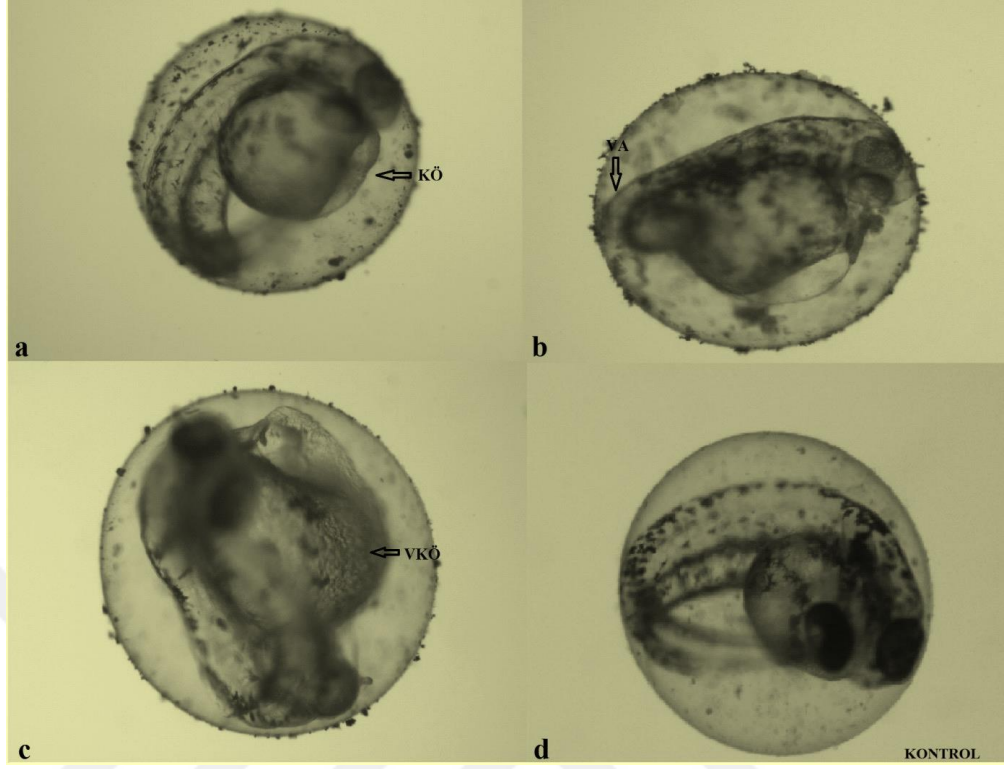
Şekil 4.6. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında koryondan çıkış oranı (*p<0,05)

4.2.3. Malformasyon oranı ve malformasyonlar

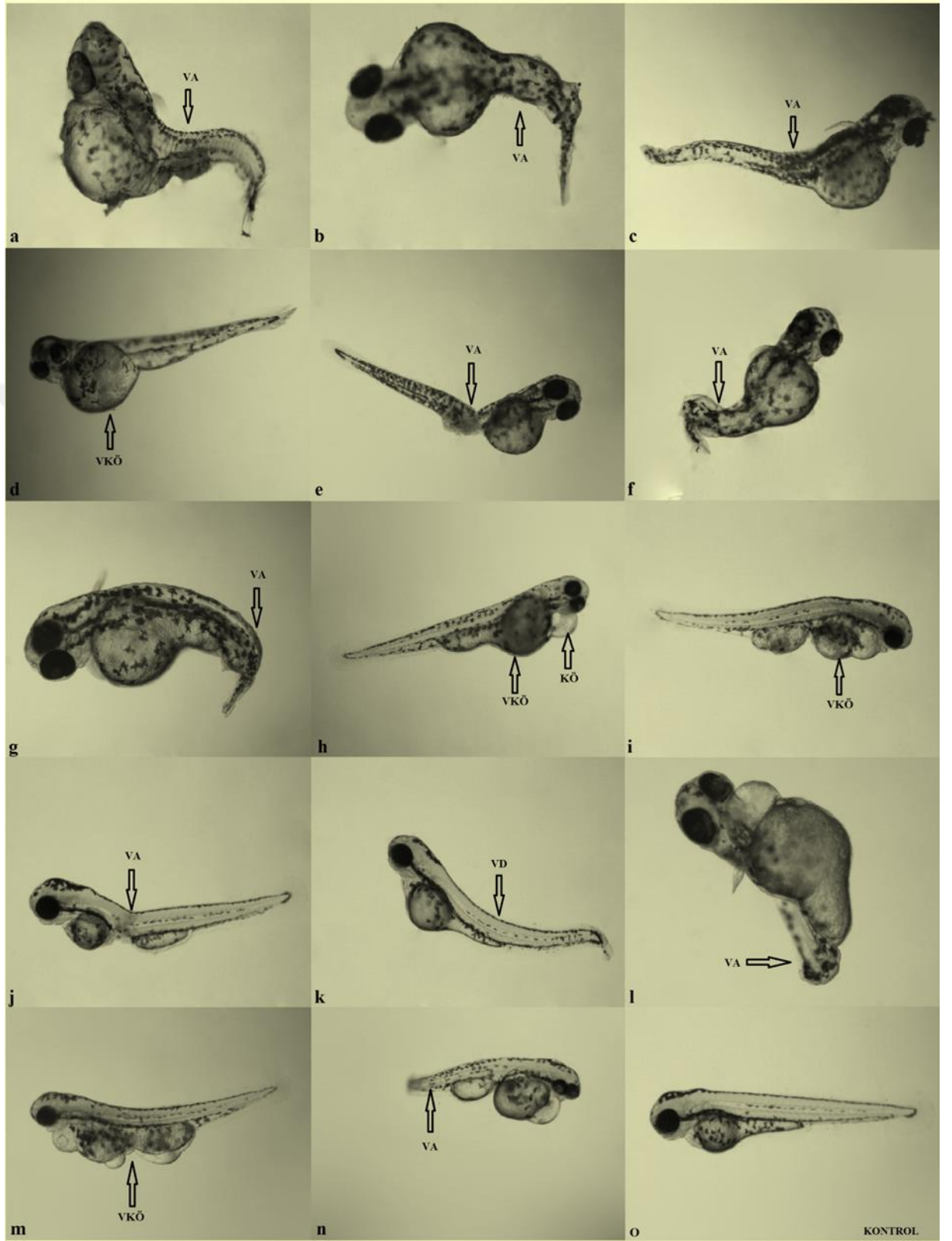
CuO NP ve MWCNT-COOH'a maruz bırakılan zebra balığı embriyo/larvalarında 48, 72 ve 96. saatlerde vertebra deformasyonları, vitellüs kesesi ödemi, kalp ödemi, baş ve kuyruk anomalileri, aksiyal deformasyonlar gibi bir takım malformasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.7a-4.7f). Malformasyon oranlarının doz artışına bağlı olarak arttığı, yüksek konsantrasyonda (1,5 mg/L) uygulanan CuO NP en fazla vücut anomalisine, yüksek konsantrasyonda uygulanan MWCNT-COOH'un ise kalp ödemine yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8a, b).



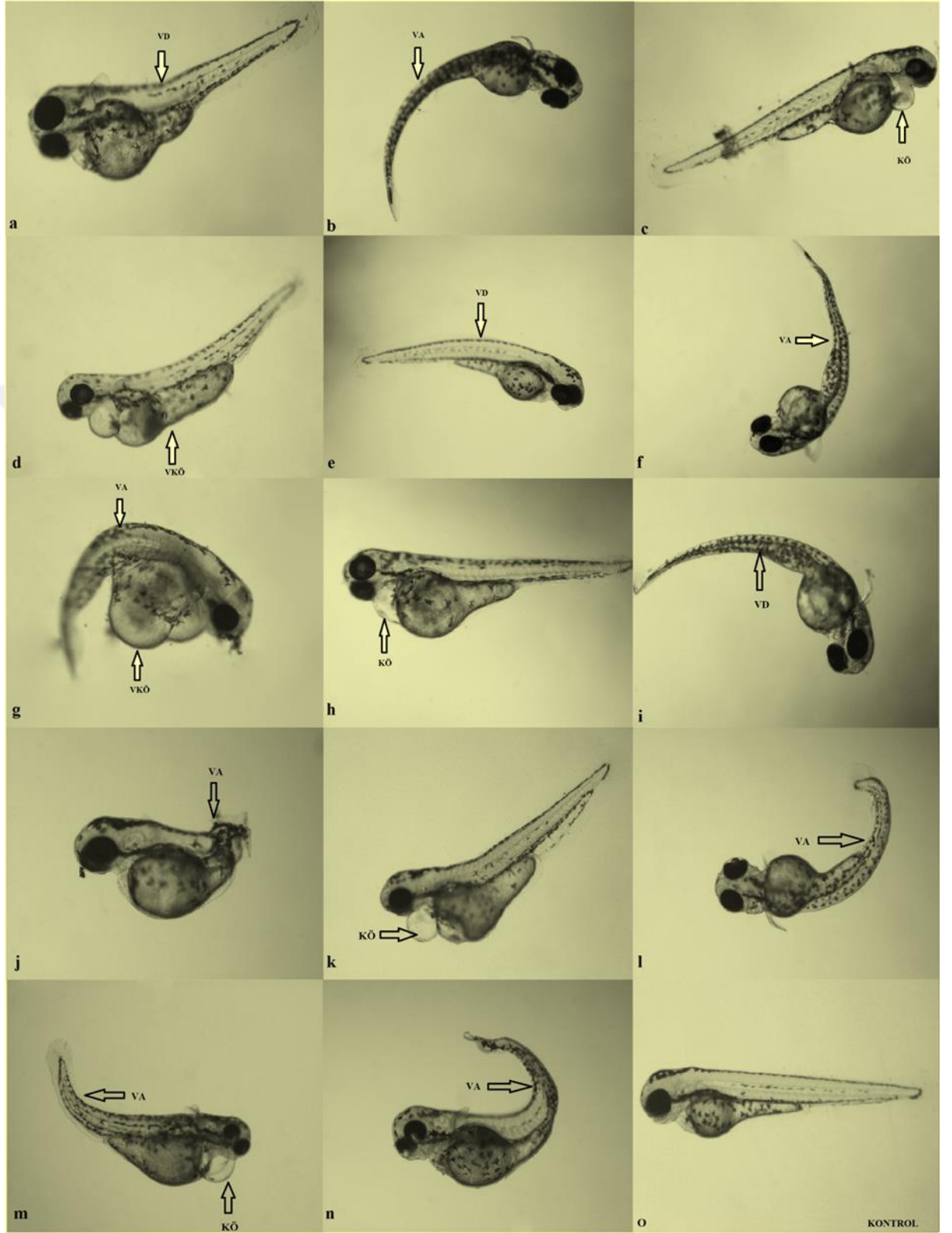
Şekil 4.7.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 48. saatte gözlenen bazı malformasyonlar
(KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi)



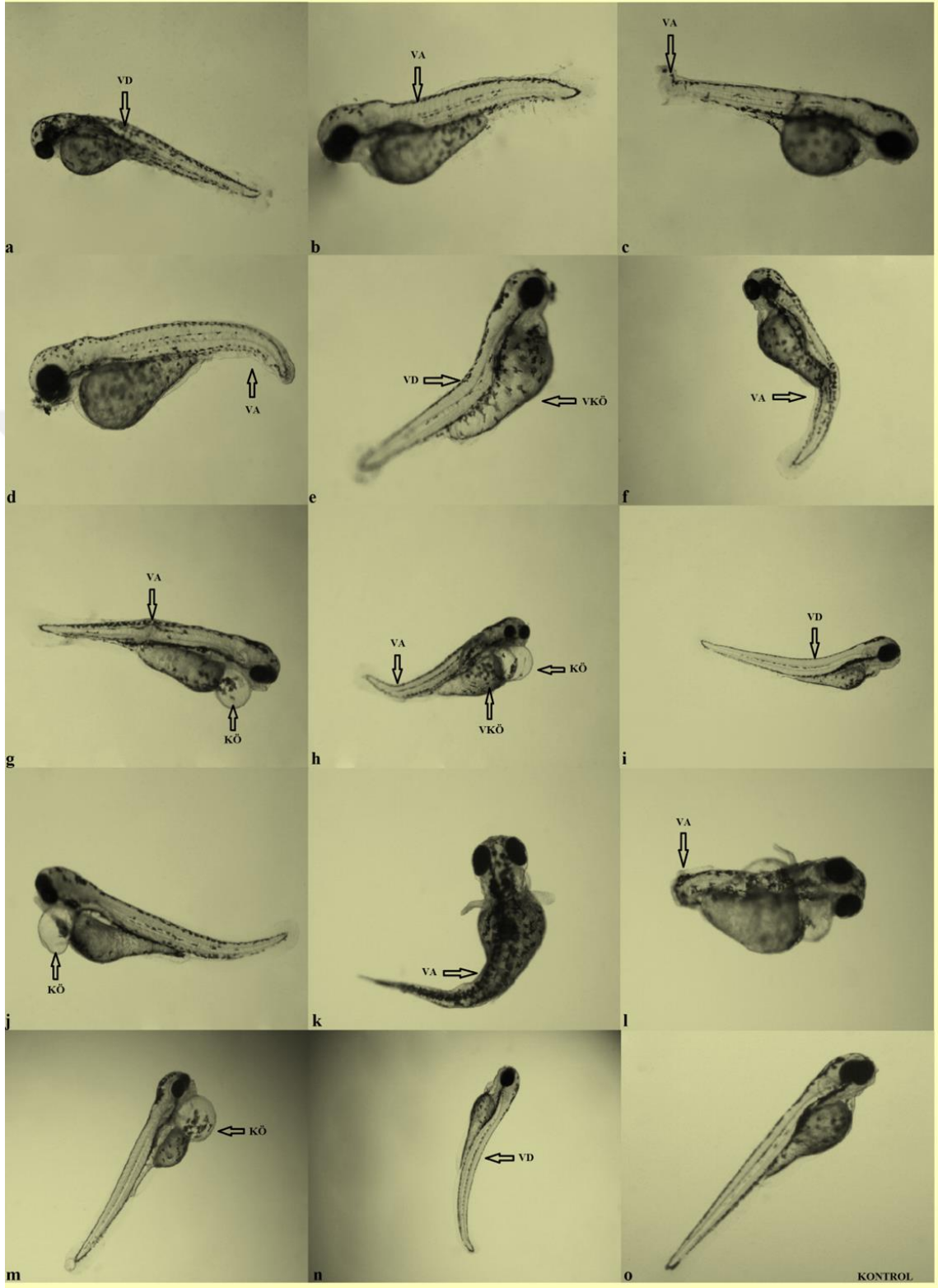
Şekil 4.7.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 48. saatte gözlenen bazı malformasyonlar
(KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi)



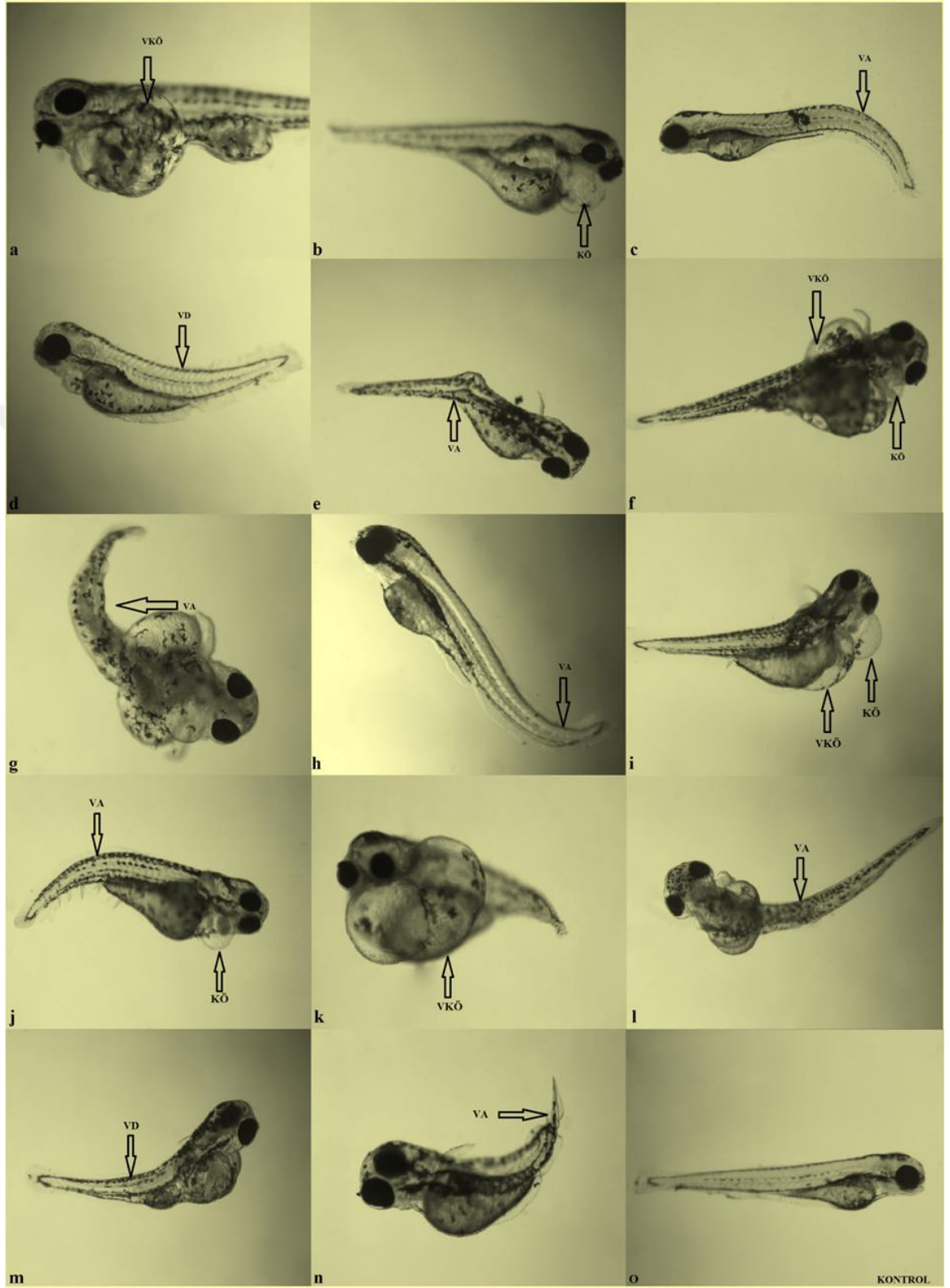
Şekil 4.7.c. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 72. saatte gözlenen bazı malformasyonlar (KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VD: Vertebra deformasyonu, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi).



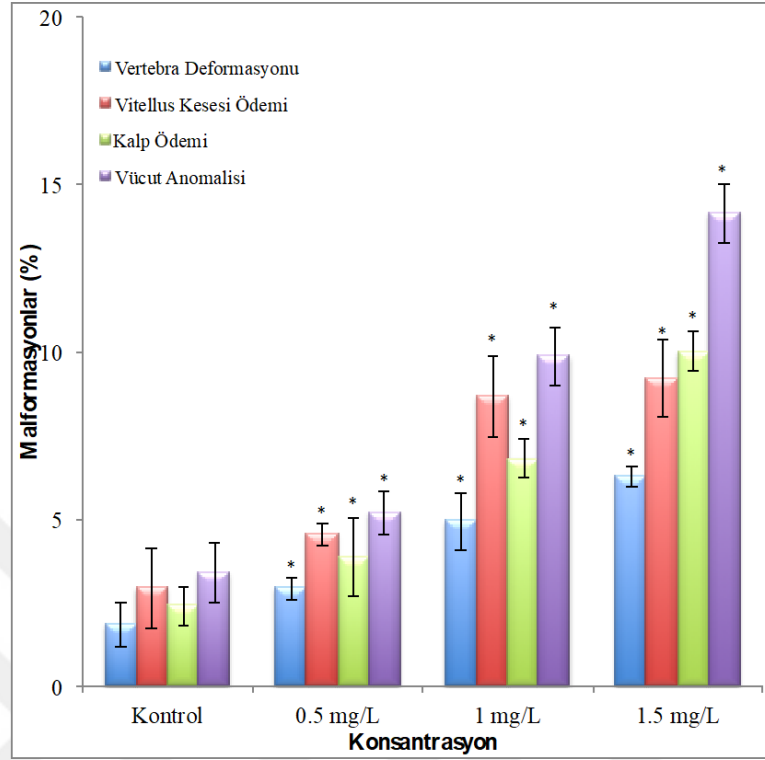
Şekil 4.7.d. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 72. saatte gözlenen bazı malformasyonlar
(KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VD: Vertebra deformasyonu, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi)



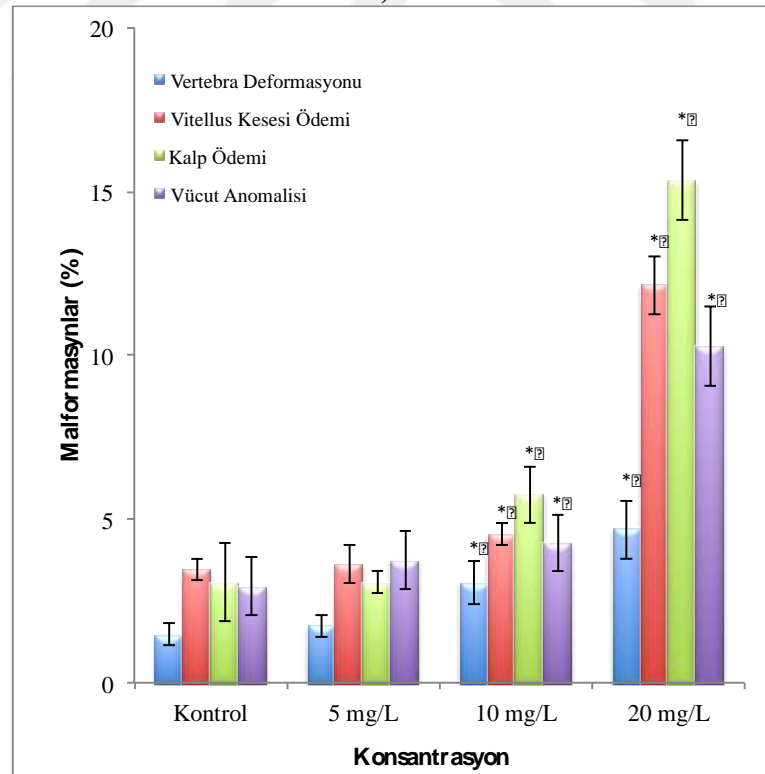
Şekil 4.7.e. CuO NP uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 96. saatte gözlenen bazı malformasyonlar (KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VD: Vertebra deformasyonu, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi).



Şekil 4.7.f. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında 96. saatte gözlenen bazı malformasyonlar (KÖ: Kalp ödemi, VA: Vücut anomalisi, VD: Vertebra deformasyonu, VKÖ: Vitellüs kesesi ödemi)



a) CuO NP

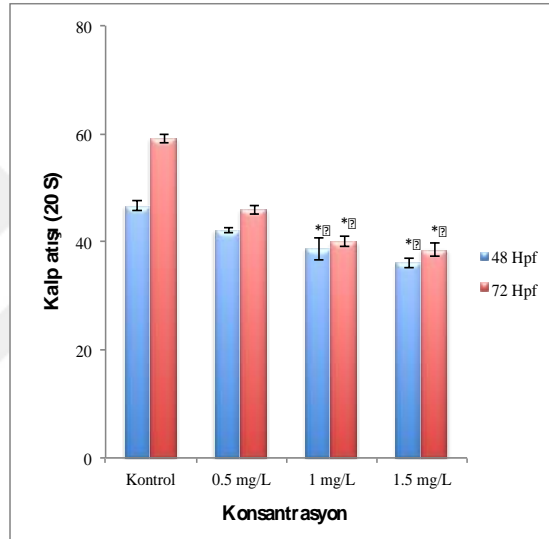


b) MWCNT-COOH

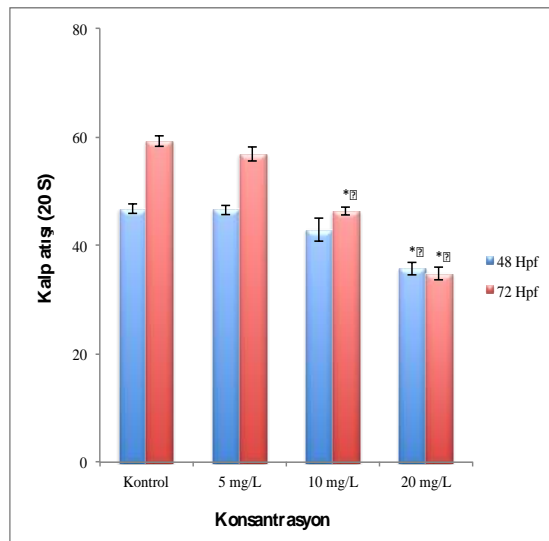
Şekil 4.8. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında malformasyon oranları (*p<0,05)

4.2.4. Kalp atışı

CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarındaki 20 saniyedeki kalp atışı Şekil 4.9a ve b'de verilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde uygulanan her iki maddenin doz artışına bağlı olarak zebra balığı embriyo/larvalarında kalp atış hızını azalttığı tespit edilmiştir. Bu azalış 1 mg/L ve 1,5 mg/L CuO NP ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulama gruplarında istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$).



a) CuO NP

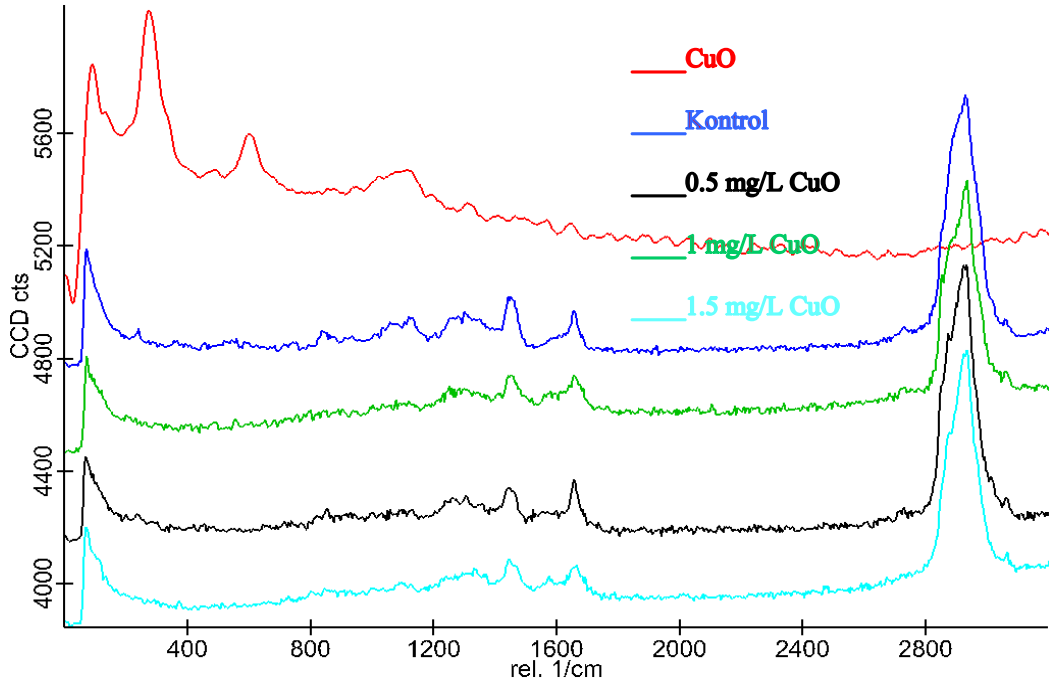


b) MWCNT-COOH

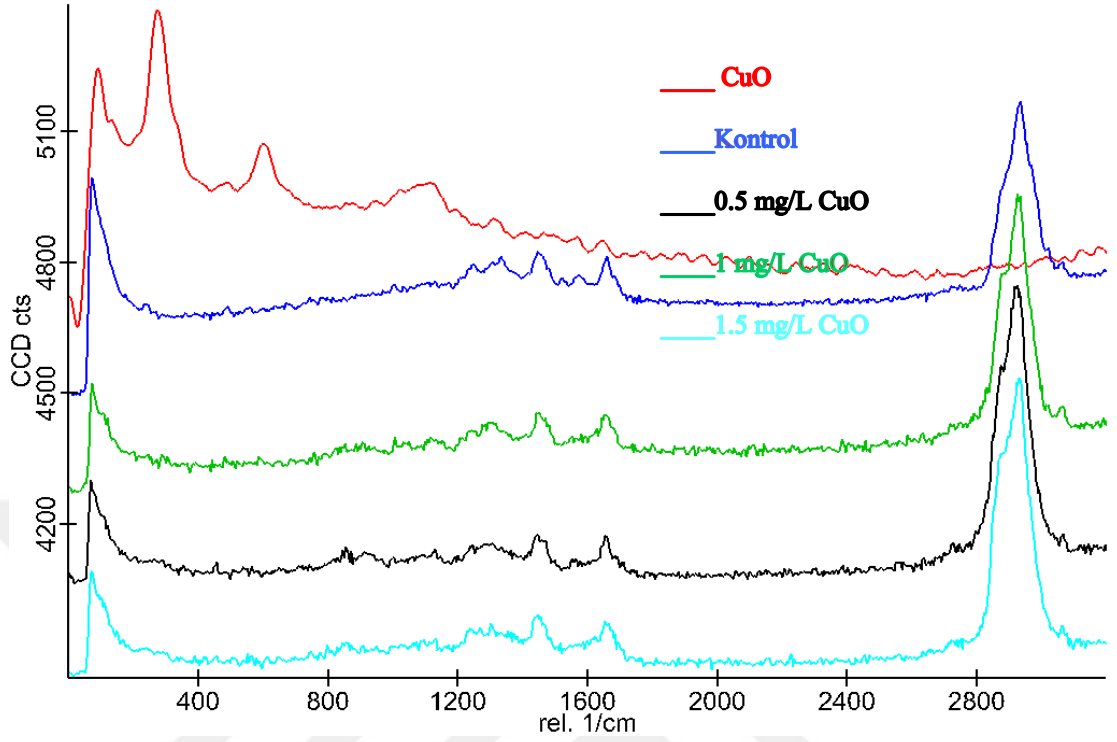
Şekil 4.9. CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında kalp atışı (* $p<0,05$)

4.3. CuO NP ve MWCNT-COOH Uygulanmış Zebra Balığı Embryo/Larvalarında 96. Saatte Toplanan Raman Spektroskopisi Sonuçları

CuO NP'ün balık dokularına girip girmediğini belirlemek amacıyla, kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/L bakıroksit nanopartikülü uygulanmış 96 saatlik balık larvalarına ait kesitlerin kafa, kuyruk ve vitellüs keselerine ait bölgelerinden raman spektroskopisi ile spektrumlar toplanmıştır. Bu amaçla öncelikle CuO NP'e özgü karakteristik raman sinyallerini belirlemek üzere saf nanopartiküle ait Raman spektrumu toplanmıştır. CuO NP'e ait raman spektrumu grafiklerde kırmızı renkli spektrum olarak verilmiştir (Şekil 4.10-4.12). Şekilden de görüldüğü gibi yaklaşık 280, 330 ve 616 cm^{-1} dalga sayılarında CuO NP'e özgü karakteristik raman bantları elde edilmiştir. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de kontrol, 0,5 mg/L, 1 mg/L ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kafa ve kuyruk bölgelerinden toplanmış raman spektrumları verilmiştir. Grafiklerden görüldüğü gibi CuO NP'e ait karakteristik bantlar larvaların kafa ve kuyruk bölgelerinden elde edilen spektrumlarda gözlenmemiştir. Bu durum nanopartikülün larvaların kafa ve kuyruk bölgelerine girmediğini göstermektedir.

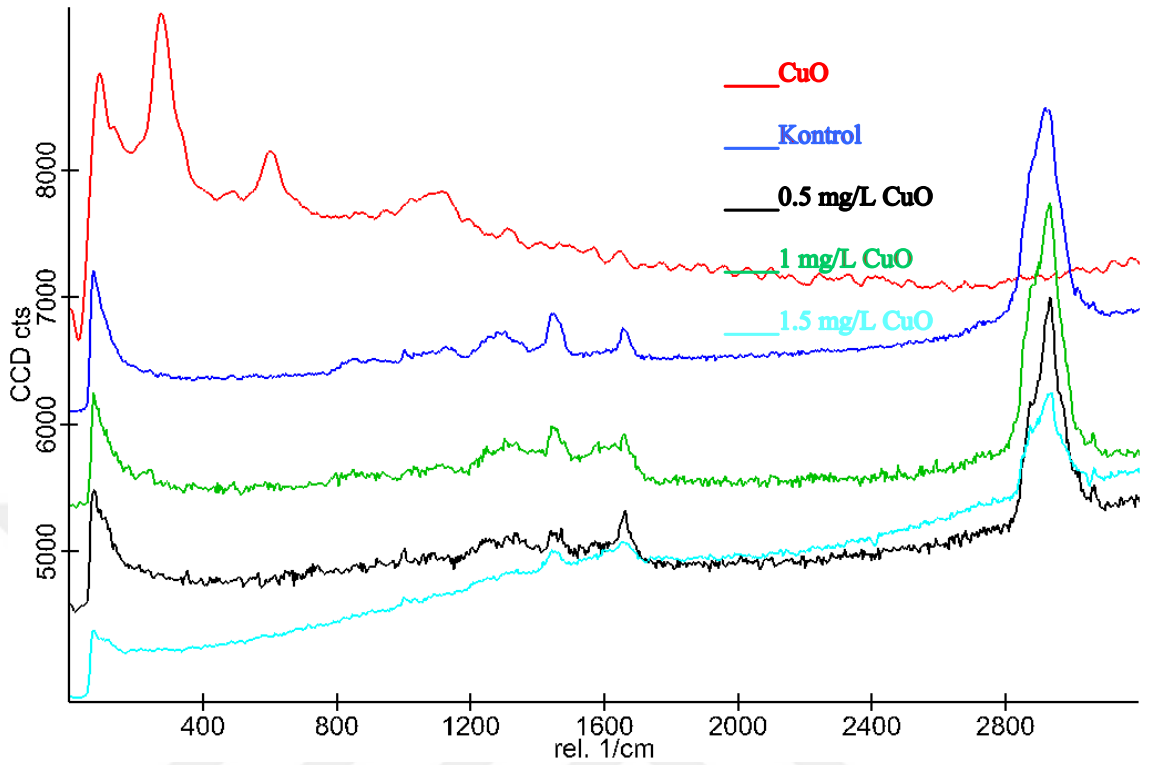


Şekil 4.10. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kafa bölgesinden alınan raman spektrumları



Şekil 4.11. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kuyruk bölgesinden alınan raman spektrumları.

Şekil 4.12’de kontrol, 0,5 mg/L, 1mg/L ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarına ait vitellüs keselerinden toplanmış raman spektrumları verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi CuO NP’e ait karakteristik bantlar, 1 mg/L ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış embrioların vitellüs keselerine ait spektrumlarda gözlenmemiştir. Bu durum 1 mg/L ve 1,5 mg/L konsantrasyonlarda uygulanan nanopartikülün vitellüs kesesine girmediğini göstermektedir. Ancak, 0,5 mg/L CuO NP uygulanmış larvalara ait vitellüs keselerinde yaklaşık 275-280 cm^{-1} de yer alan, nanopartiküle karakteristik raman sinyali gözlenmiştir. Buda 0,5 mg/L dozda uygulanan nanopartikülün vitellüs kesesi içine girdiğine işaret etmektedir.

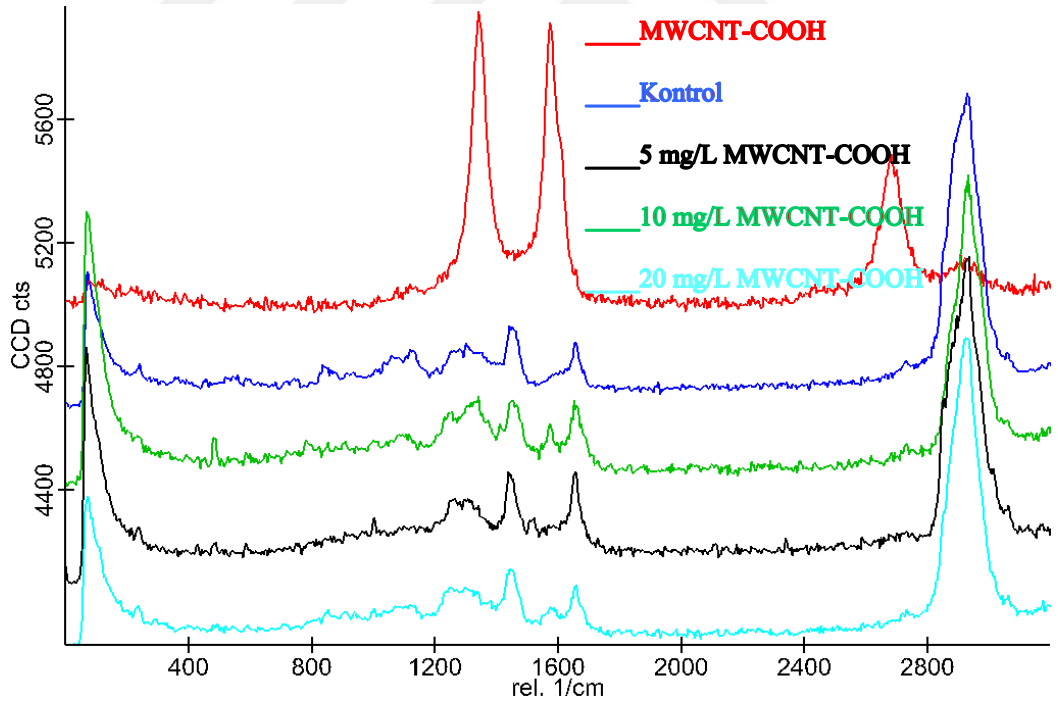


Şekil 4.12. CuO NP ile kontrol, 0,5, 1 ve 1,5 mg/ CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının vitellüs kesesinden alınan raman spektrumları

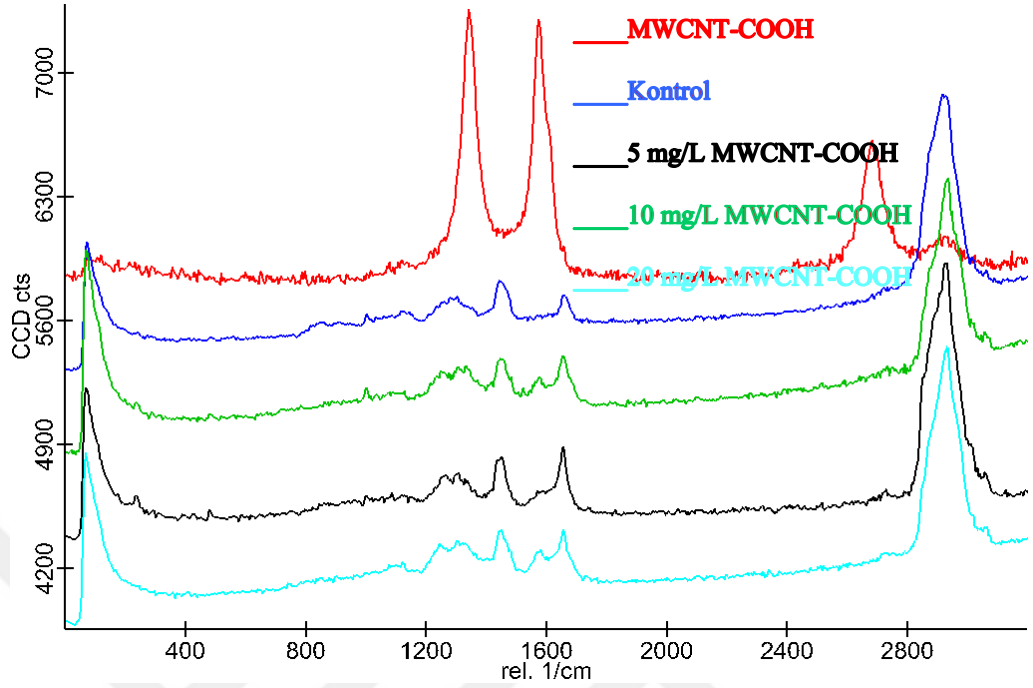
MWCNT-COOH'un balık dokularına girip girmediğini belirlemek amacıyla, kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış 96 saatlik larvaların kafa, kuyruk ve vitellüs keselerine ait bölgelerinden raman spektroskopisi ile spektrumlar toplanmıştır. Bu amaçla, öncelikle MWCNT-COOH'a özgü karakteristik raman sinyallerini belirlemek üzere saf nanotüpe ait raman spektrumu toplanmıştır. MWCNT-COOH'a ait raman spektrumu grafiklerde kırmızı renkli spektrum olarak verilmiştir (Şekil 4.13-4.15). Grafiklerde nanotüpe özgü 3 tane keskin bant bulunmaktadır. Bu bantlar yaklaşık 1340 cm^{-1} dalgasayısında yer alan D (disorder) bandı, 1580 ve 2700 cm^{-1} dalgasayılarında bulunan G (graphite) bantlarıdır (*Studies of Multiwall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy* (PDF Download Available). Available from:

https://www.researchgate.net/publication/243760581_Studies_of_Multiwall_Carbon_Nanotubes_Using_Raman_Spectroscopy_and_Atomic_Force_Microscopy [accessed Feb 10 2018].). Şekil 4.13 ve 4.14 de saf MWCNT-COOH, kontrol, 5, 10 ve 20 mg /L

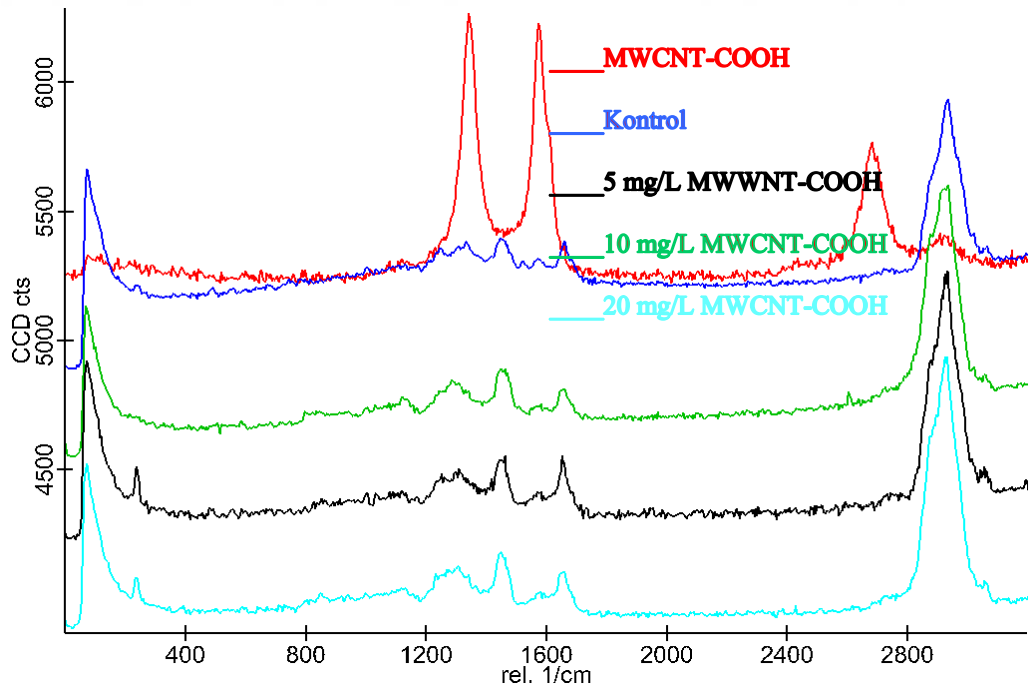
MWCNT-COOH uygulanmış 96 saatlik zebra balığı larvalarının kafa ve vitellüs kesesi bölgelerinden toplanan spektrumlar görülmektedir. Elde edilen grafiklerden görüldüğü gibi, kontrol grubuna ait kafa ve vitellüs kesesi spektrumlarında MWCNT-COOH'a ait karakteristik bantlar görülmezken, özellikle 5 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvaların kafa ve vitellüs kesesi spektrumlarında 1580 cm^{-1} dalgasında yer alan nanotüpe özgü G bandı görülmüştür. Bu durum 5 ve 20 mg/L konsantrasyonlara uygulanan MWCNT-COOH'un larvaların kafa ve vitellüs kesesi bölgelerine girdiğini göstermektedir. Şekil 4.15'de ise larvaların kuyruk bölgesinden toplanmış raman spektrumları görülmektedir. Elde edilen grafikte 1580 cm^{-1} dalga sayısında yer alan nanotüpe özgü G bandı kontrol grubunda da gözlemlendiğinden dolayı uygulanan doza bağlı olarak kuyruk bölgesine karbon nanotüpün girip girmediği konusunda yorum yapmak mümkün değildir.



Şekil 4.13. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının kafa bölgesinden toplanmış raman spektrumları



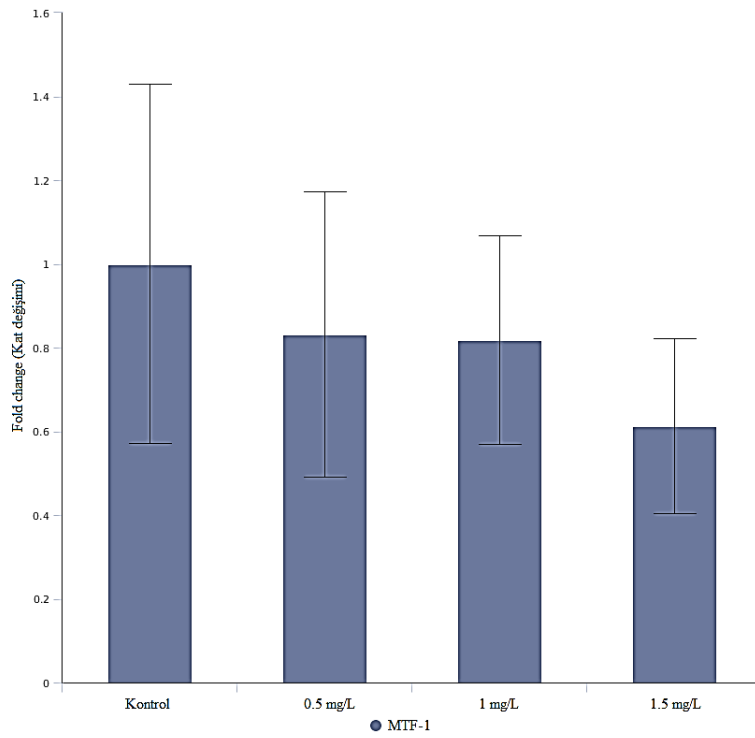
Şekil 4.14. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının vitellüs kesesi bölgesinden toplanmış Raman spektrumları



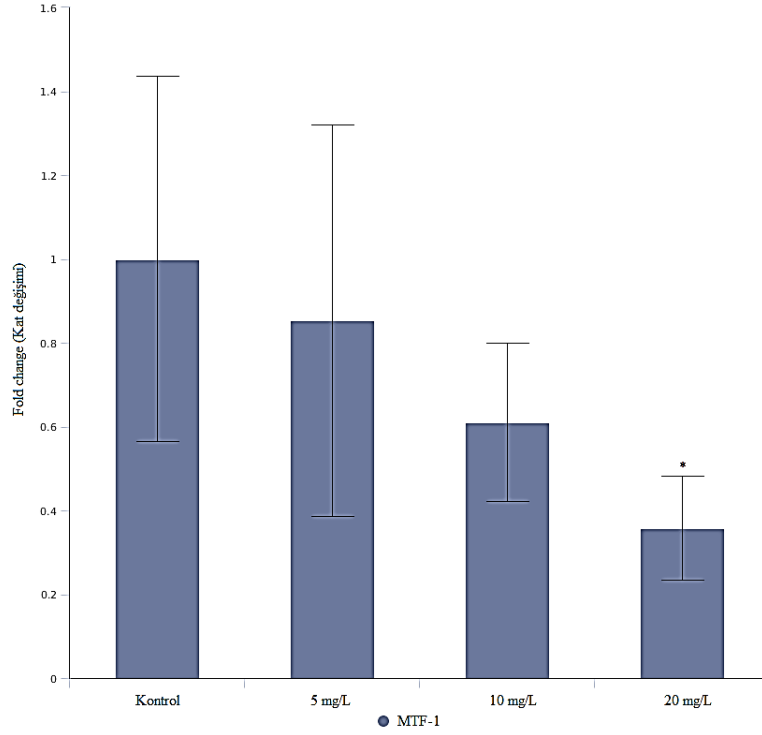
Şekil 4.15. MWCNT-COOH ile kontrol, 5, 10 ve 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının kuyruk bölgesinden toplanmış raman spektrumları

4.4. CuO NP ve MWCNT-COOH Uygulanmış Zebra Balığı Embryo/Larvalarında Oksidatif Stres ve İmmün Sistemle İlişkili Bazı Genlerin Ekspresyonu

CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvaları ve kontrol gruplarına ait bazı oksidatif stres ve immün sistemle ilişkili genlerin mRNA ekspresyonlarındaki değişimler şekil 4.16-4.23’de verilmiştir. Normalizasyon için referans gen olarak aktin kullanılmıştır. Kontrol ile mukayese edildiğinde stresle ilişkili metal transkripsiyon faktörü (MTF-1) geninin ekspresyon seviyesi hem CuO NP hem de MWCNT-COOH gruplarında doza bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.16a,b). Bununla birlikte bu azalış yalnızca 20 mg/L nanotüp uygulanmış grupta kontrole göre istatistiksel anlamda önemli ($P<0,05$) bulunmuştur (Şekil 4.16 b).

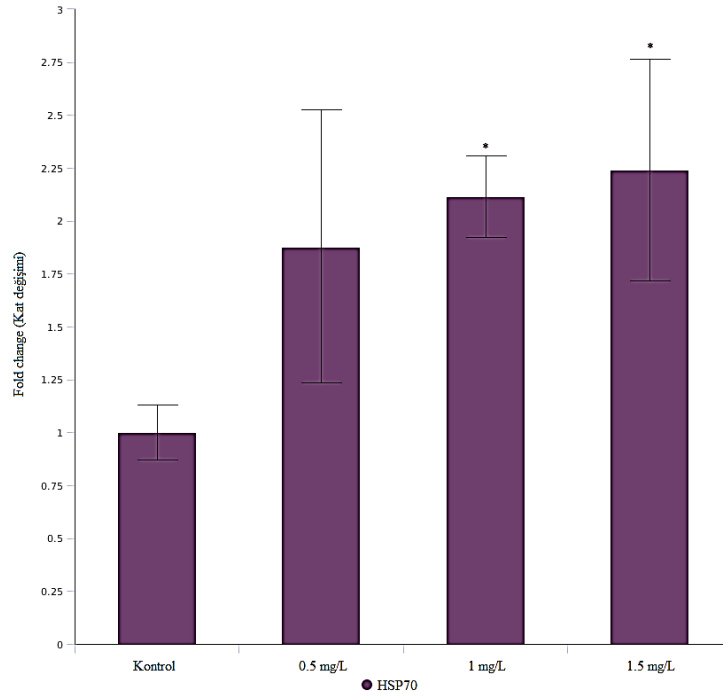


Şekil 4.16.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında MTF-1 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi

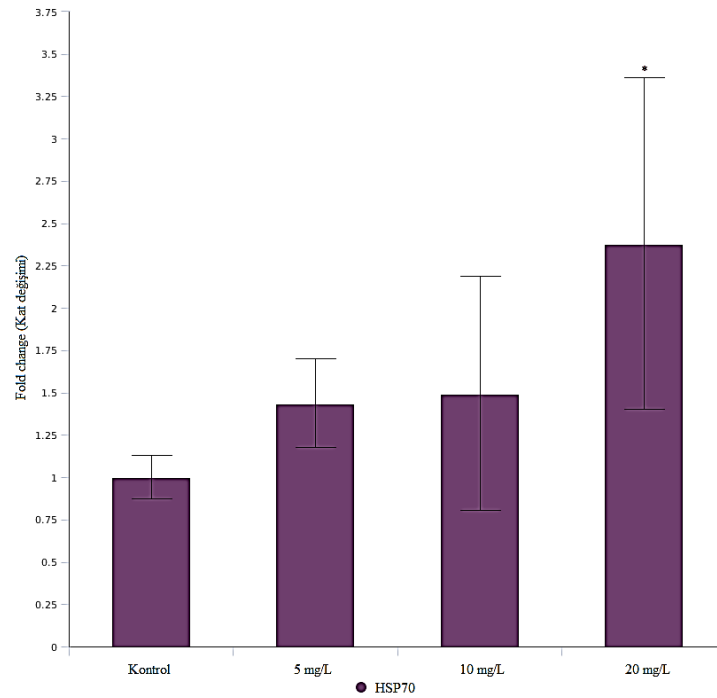


Şekil 4.16.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında MTF-1 mRNA ekspresyonundaki kat değışimi (* $p < 0,05$)

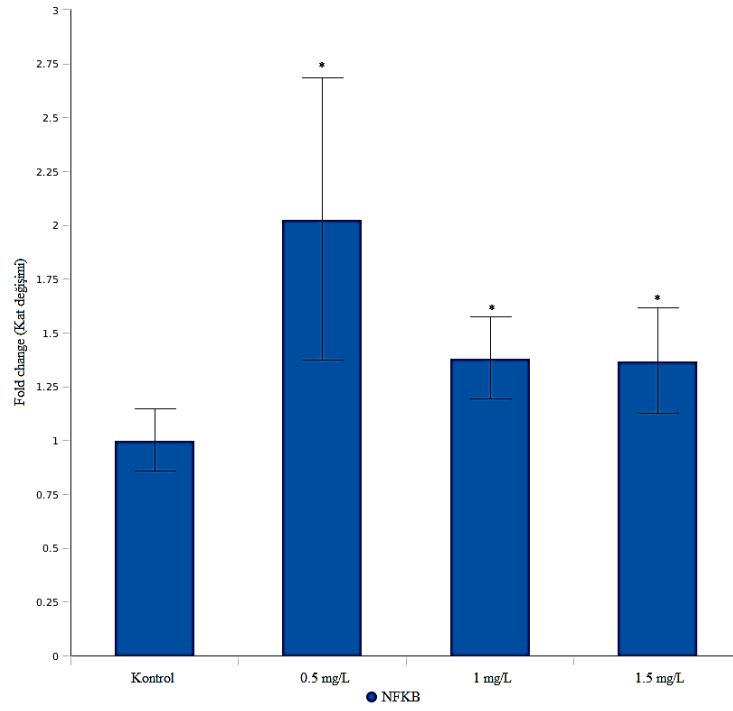
Kontrol ile mukayese edildiğinde CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 geninin ekspresyonunun uygulanan dozlara bağılı olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.17a,b). Örneğin kontrol ile kıyaslandığında 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 geninin mRNA seviyesi 2,25 kat (Şekil 4.17a), MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 geninin mRNA seviyesi 2,5 kat artış göstermiştir (Şekil 4.17b). Yine NFkB geninin ekspresyonu hem CuO NP hem de MWCNT-COOH uygulanan gruplarda kontrole göre artmıştır (Şekil 4.18a,b). Bu artışların CuO NP uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli ($P < 0,05$) olduğu (Şekil 4.18a), MWCNT-COOH uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.18b). 0,5 mg/L CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında NFkB geninin ekspresyonunun kontrole göre 2 kat arttığı, 1 mg/L ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış gruplarda NFkB geninin ekspresyonunun yaklaşık olarak 1,4 kat arttığı tespit edilmiştir.



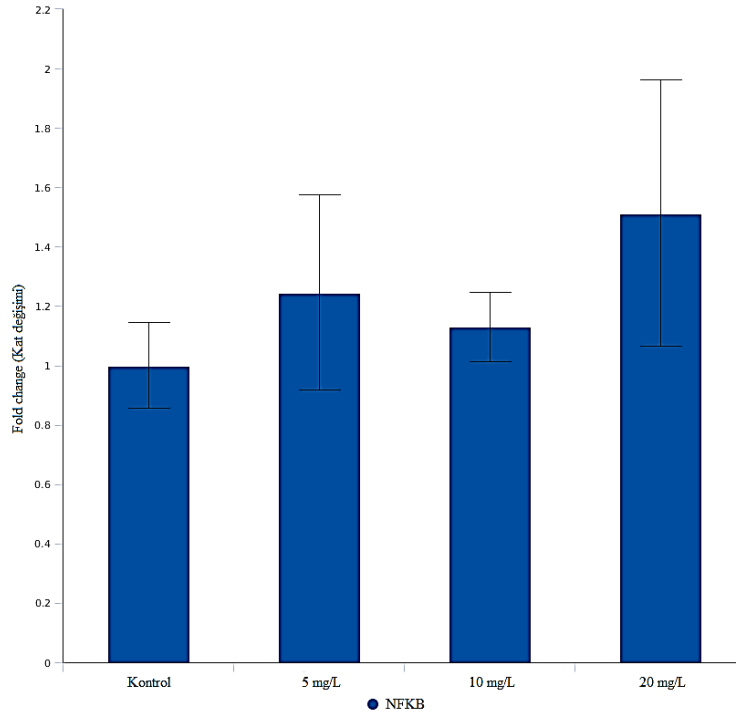
Şekil 4.17.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p<0,05$)



Şekil 4.17.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p<0,05$)

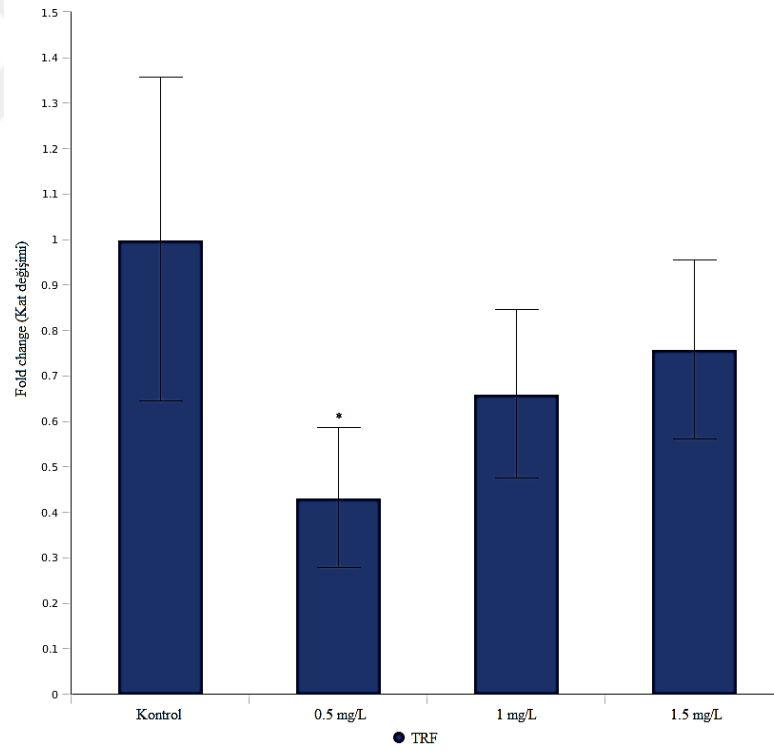


şekil 4.18.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında NFkB mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (*p<0,05)

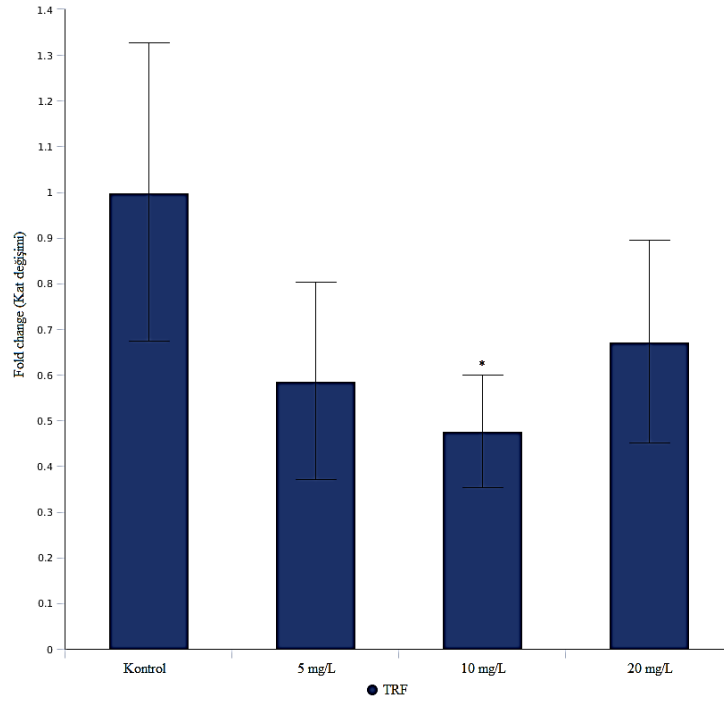


şekil 4.18.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında NFkB mRNA ekspresyonundaki kat değişimi

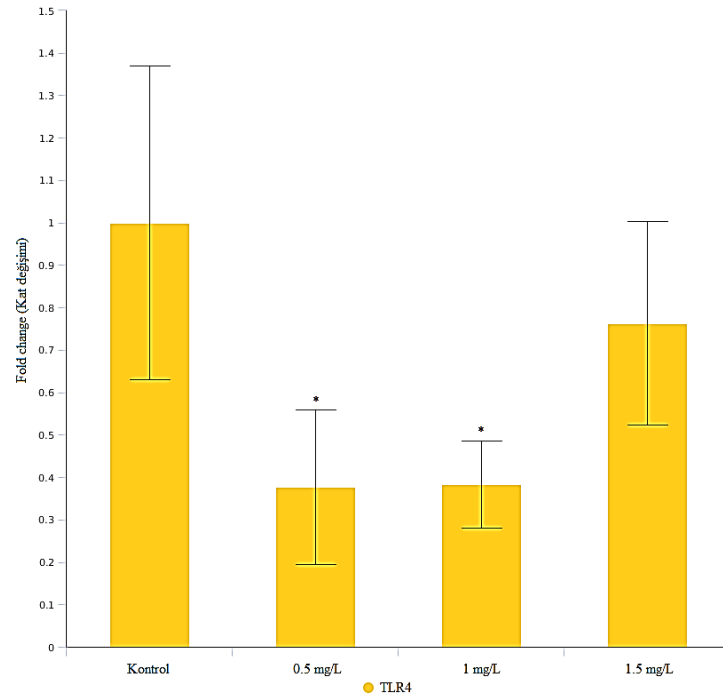
Kontrol grupları ile mukayese edildiğinde CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış gruplarda immün sistemle ilişkili genlerden TRF, TLR4, CEBP genlerinin mRNA ekspresyonlarının azaldığı (Şekil 4.19-Şekil 4.21), 0,5 mg/L CuO NP uygulanmış larvalarda TRF (Şekil 4.19.a) ve TLR4 (Şekil 4.20.a) genlerinin, 10 mg/L CuO NP uygulanmış larvalarda TLR4 (Şekil 4.20.a) geninin ekspresyonlarındaki azalışın istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. 5 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda CEBP geninin ($P<0,01$) (Şekil 4.21.b), 10 mg/L uygulanmış larvalarda TRF ($P<0,05$) (Şekil 4.19.b), TLR4 ($P<0,05$) (Şekil 4.20.b) ve CEBP($P<0,01$) (Şekil 4.21.b) genlerinin, 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda TLR4 ($P<0,05$) (Şekil 4.20.b) ve CEBP ($P<0,05$) (Şekil 4.21.b) genlerinin ekspresyonlarındaki azalışın istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya konmuştur.



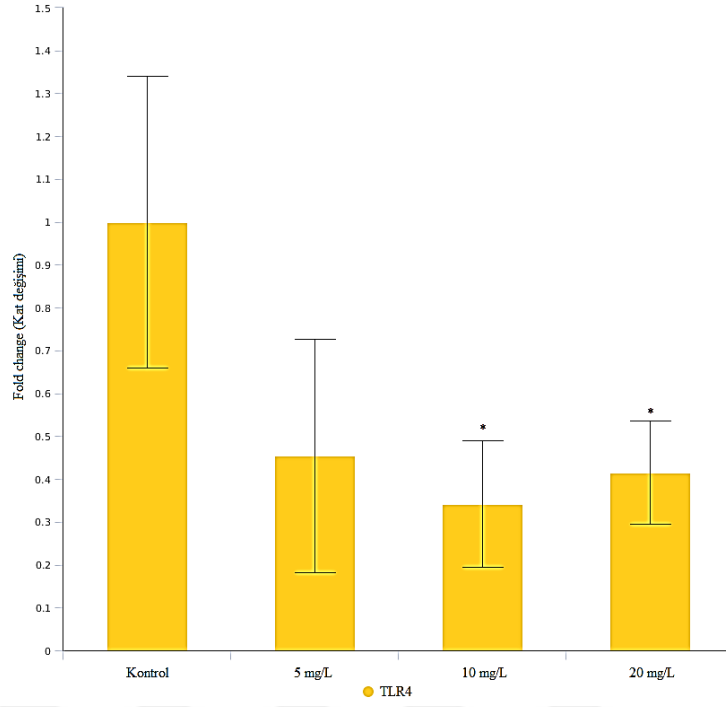
Şekil 4.19.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TRF mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p<0,05$)



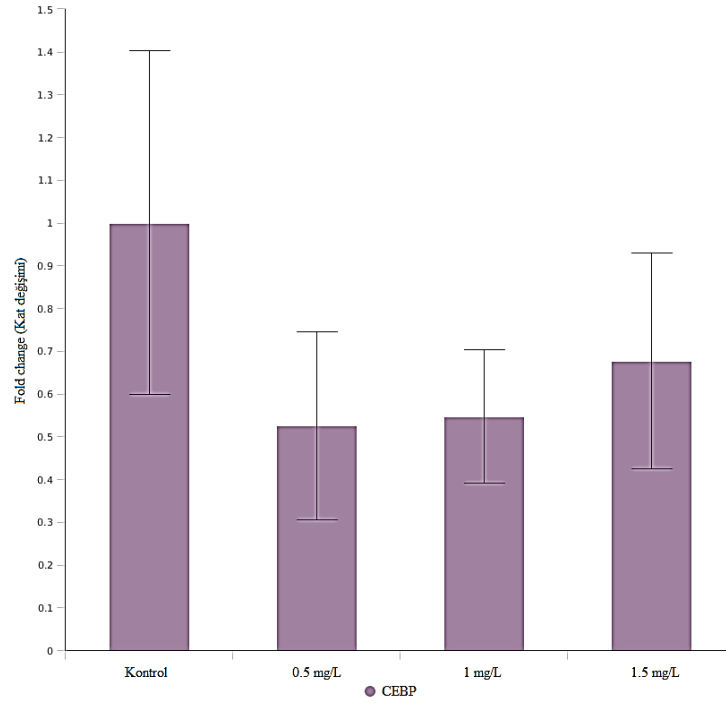
şekil 4.19.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TRF mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p < 0,05$)



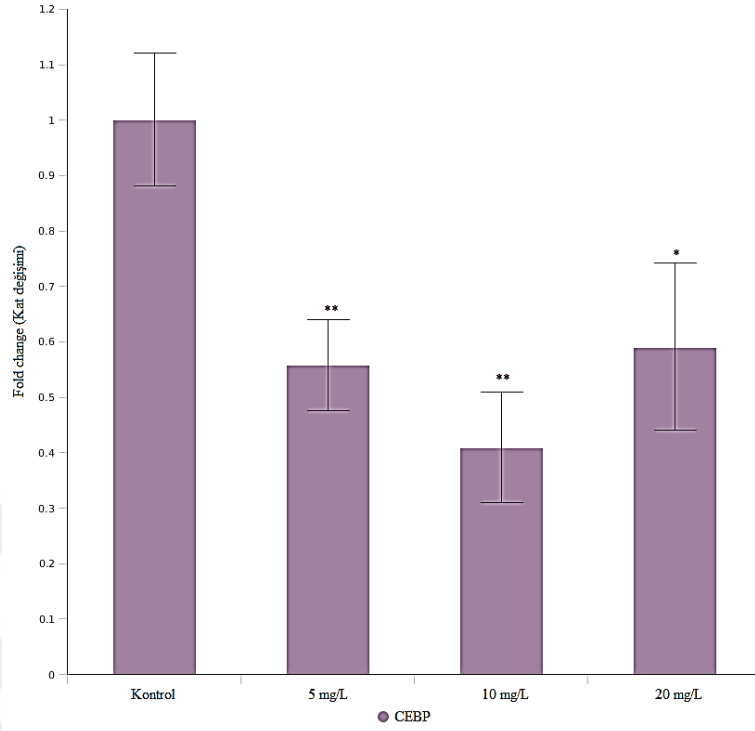
şekil 4.20.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR4 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p < 0,05$)



Şekil 4.20.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR4 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi (* $p < 0,05$)

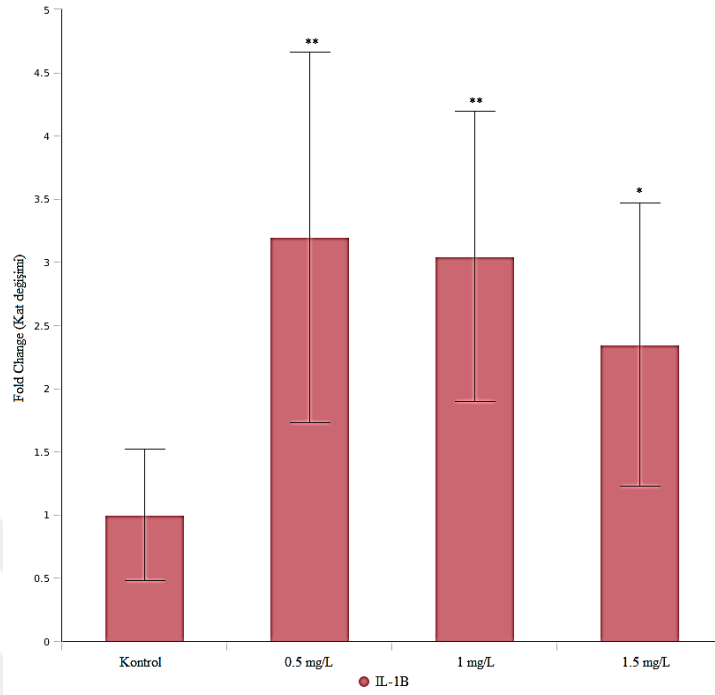


Şekil 4.21.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında CEBP mRNA ekspresyonundaki kat değişimi

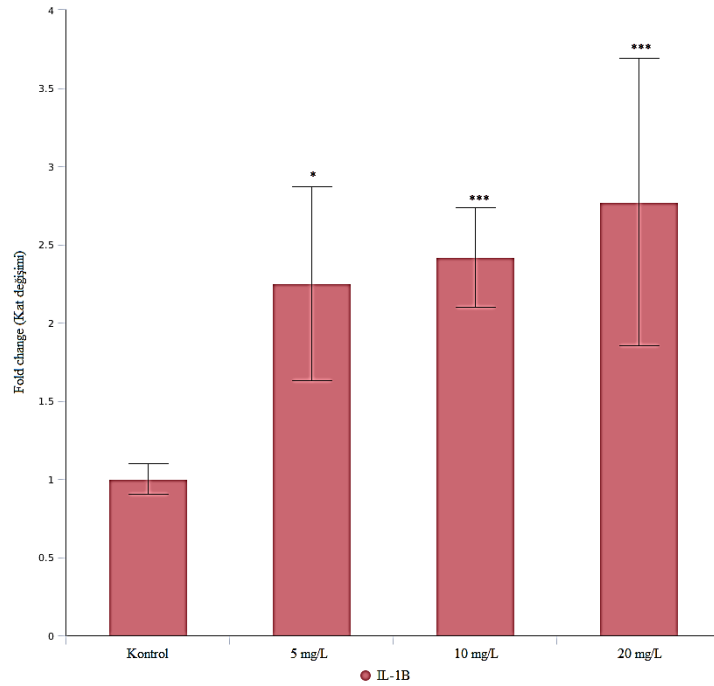


Şekil 4.21.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında CEBP mRNA ekspresyonundaki kat değışimi (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Kontrol ile kıyaslandığında IL-1 β mRNA ekspresyonunun hem CuO NP hem de MWCNT-COOH uygulama gruplarında arttığı ve bu artışların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.22). IL-1 β mRNA ekspresyonunu kat değışimi 0,5 mg/L CuO NP (Şekil 4.22.a) ve 20 mg/L MWCNT-COOH (Şekil 4.22.b) uygulanan gruplarda en yüksek olarak bulunmuştur.

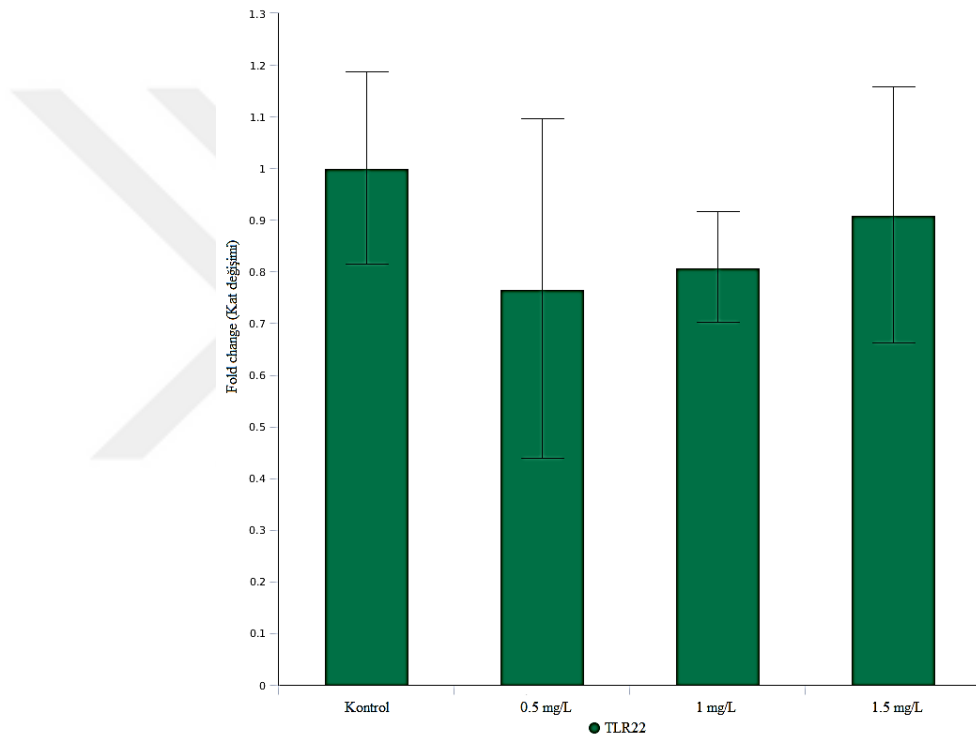


Şekil 4.22.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında IL-1 β mRNA ekspresyonundaki kat değışimi (*p<0,05, **p<0,01)

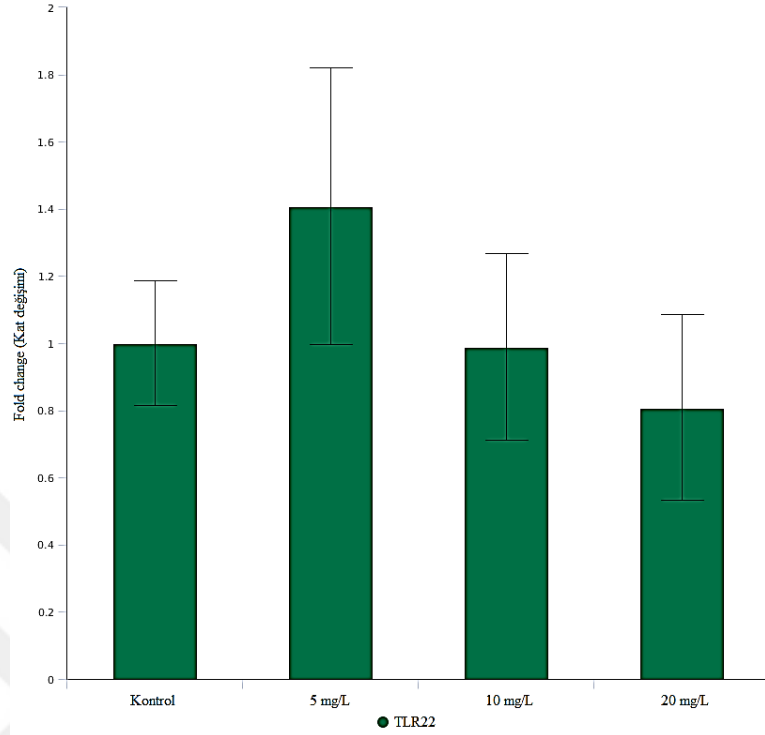


Şekil 4.22.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında IL-1 β mRNA ekspresyonundaki kat değışimi (*p<0,05, ***p<0,001)

Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 geninin ekspresyonunun azaldığı, bu azalışın doza bağlı olmadığı ve istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23.a). Öte yandan, MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 geninin ekspresyonunun 5 mg/L uygulanmış larvalarda kontrole göre 1,4 kat arttığı, 10 mg/L ve 20 mg/L uygulanmış larvalarda kontrole göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.23.b).

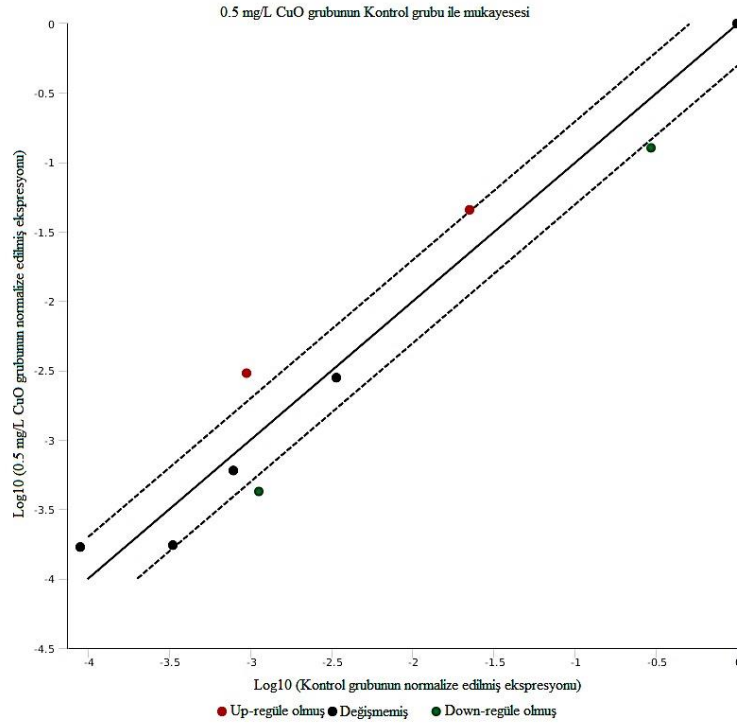


Şekil 4.23.a. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 mRNA ekspresyonundaki kat değişimi

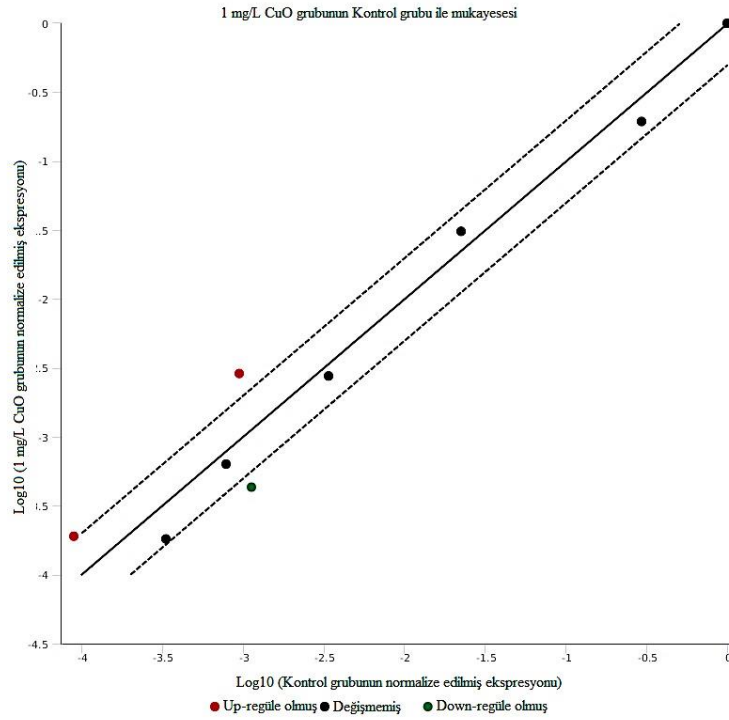


Şekil 4.23.b. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında TLR22 mRNA ekspresyonundaki kat değışimi

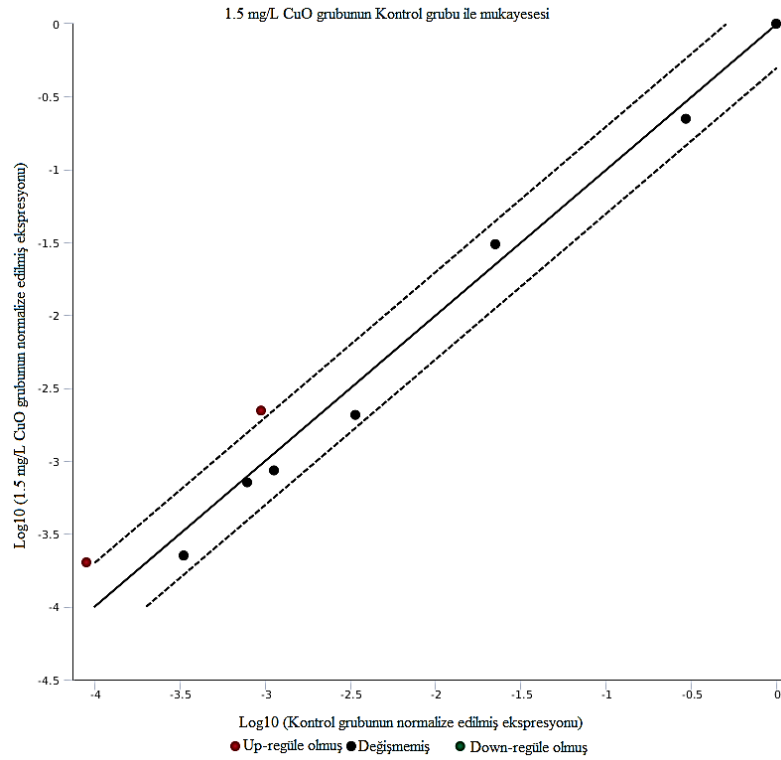
CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarının kontrol grubu ile mukayese edilmesiyle elde edilen normalize edilmiş ekspresyon grafikleri Şekil 4.24.a,b,c'de verilmiştir. Şekillerden 0,5, 1 ve 1,5 mg/L CuO NP uygulanmış larvalarda NFKB ve IL-1 β genlerinin ekspresyonunun kontrole göre arttığı görülmektedir. Öte yandan 0,5 mg/L CuO NP uygulanmış larvalarda TRF ve TLR4 genlerinin ekspresyonunun kontrole göre azaldığı görülmektedir (Şekil 4.24.a). Yine Şekil 4.24.b'den 1 mg/L CuO NP uygulanmış larvalarda TLR4 geninin ekspresyonunu azaldığı görülmektedir. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının kıyaslanması ile oluşturulan hiyerarşik kümeleme analizine göre elde edilen heat mapping (ısı haritası) yukarıda CuO NP uygulaması için verilen gen ekspresyon değışimlerini desteklemektedir (Şekil 4.25).



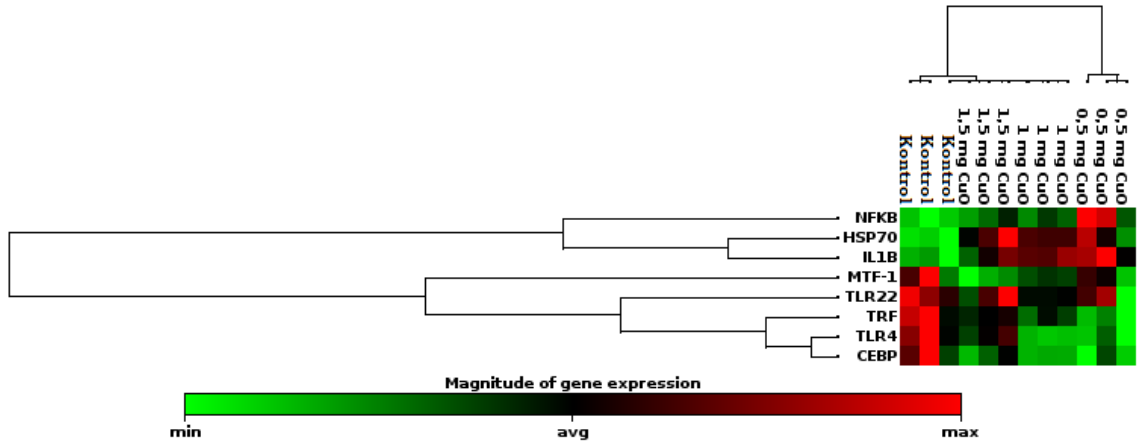
Şekil 4.24.a. 0,5 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



Şekil 4.24.b. 1 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



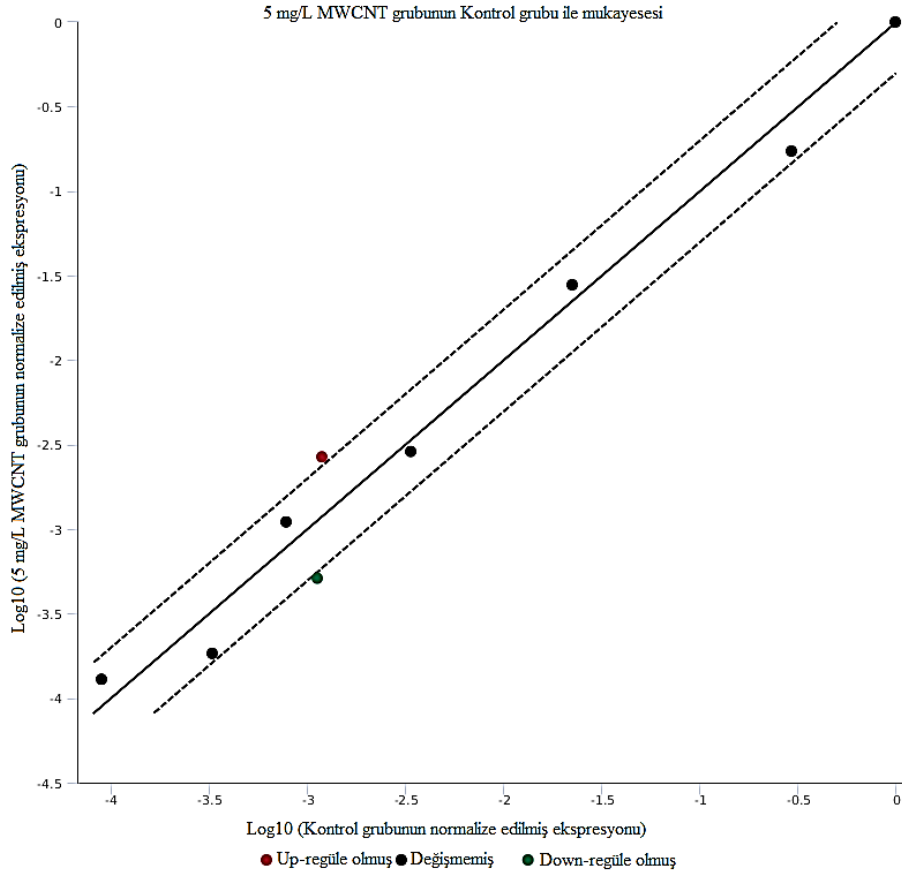
Şekil 4.24.c 1,5 mg/L CuO NP grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



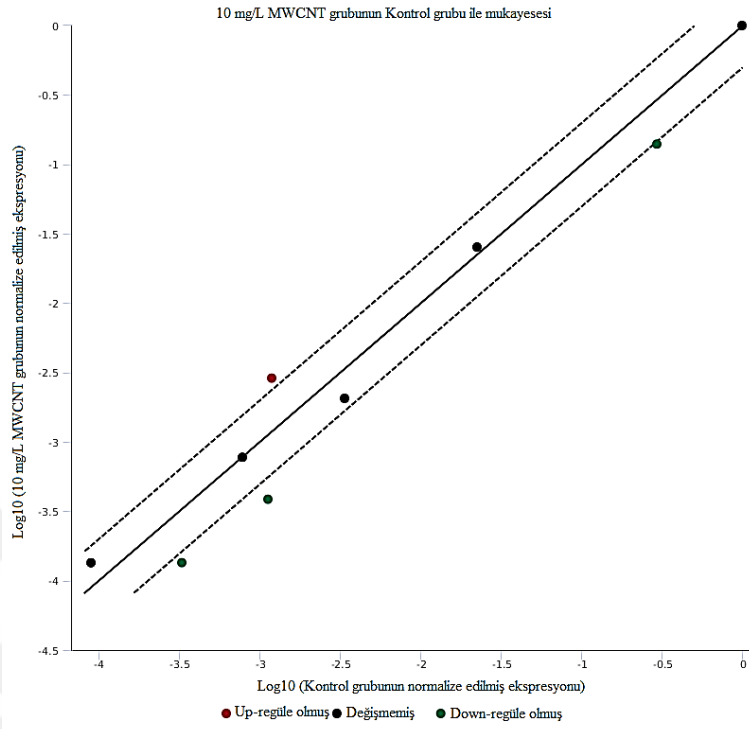
Şekil 4.25. CuO NP uygulanmış zebra balığı larvalarında hiyerarşik kümeleme

MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarının kontrol grubu ile mukayese edilmesiyle elde edilen normalize edilmiş ekspresyon grafikleri şekil 4.26.a,b,c'de verilmiştir. Şekil 4.26.a ve 4.26.b'den 5 ve 10 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda IL-1 β geninin ekspresyonunun kontrole göre arttığı, CEBP geninin

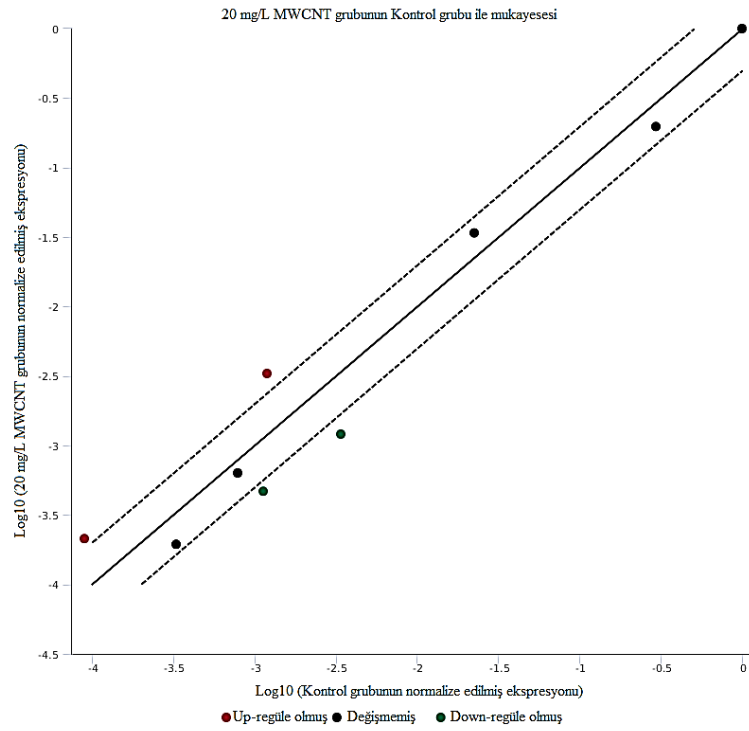
ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Yine 10 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda TRF ve TLR4 genlerinin ekspresyonunun kontrole göre azaldığı görülmektedir (Şekil 4.26.b). Şekil 4.26.c'den 20 mg/L MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda HSP70 ve IL-1 β genlerinin ekspresyonunun arttığı, TLR4 ve CEBP genlerinin ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Kontrol grupları ve uygulama gruplarının kıyaslanması ile oluşturulan hiyerarşik kümeleme analizine göre elde edilen heat mapping (ısı haritası) yukarıda MWCNT-COOH uygulaması için verilen gen ekspresyon değişimlerini desteklemektedir (Şekil 4.27).



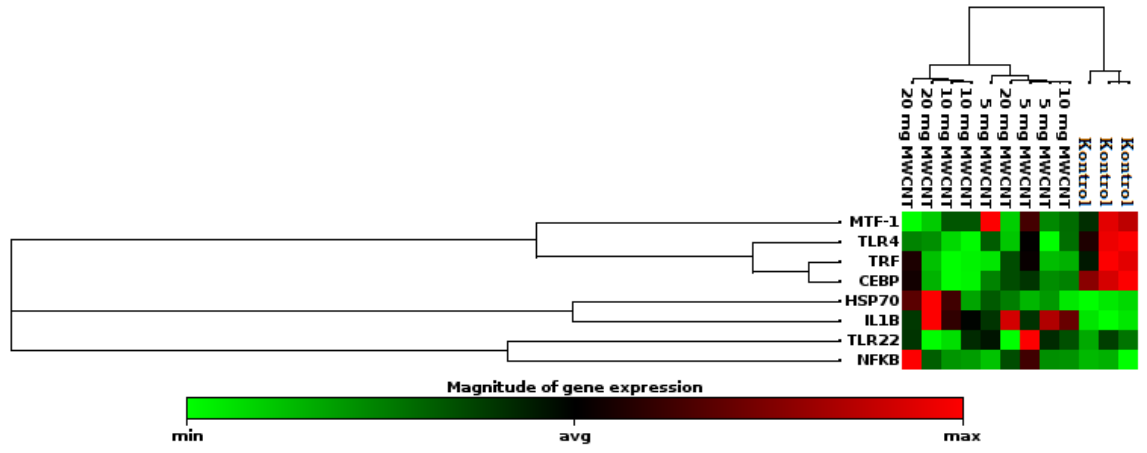
Şekil 4.26.a. 5 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



Şekil 4.26.b. 10 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



Şekil 4.26.c. 20 mg/L MWCNT-COOH grubunun kontrol grubu ile mukayesesi



Şekil 4.27. MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında hiyerarşik kümeleme

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyomedikal, elektronik, kozmetik ve ilaç endüstrisi gibi çeşitli alanlarda sentezlenen ve kullanılan nanomateryallerin sayısının ve çeşidinin artmasıyla birlikte nanoteknoloji daha büyük ölçekli ve sürekli artan uygulamalara doğru gitmektedir. Bu durum nanomateryallerin ve yan ürünlerinin doğrudan veya dolaylı olarak su ortamına bırakılmasını kaçınılmaz kılmaktadır (Jovanovic and Palic 2012; Zhao *et al.* 2013). Sonsuz mineral, enerji ve gıda kaynağı olan sucul ekosistemler çoğunlukla nanomateryallerin son durağıdır (Zhuang and Gao 2014). Hem akarsu ve göllerin hem de denizlerin sedimenti Ag, CuO, ZnO, TiO₂, karbon nanotüpler ve flurenler gibi nanomateryaller için birikme alanlarıdır (Krishnaraj *et al.* 2016; Vale *et al.* 2016). Küçük boyuttaki (100nm<) benzersiz fiziksel yapıları, kimyasal bileşimleri, aglomerasyon, yüksek oranda kalıcı olma, hemen hemen her ortamda rastlanma ve biyoyumluluk gibi özellikleri nanomateryallerin toksisitesi üzerine olan ilgiyi de beraberinde getirmiştir (Zhao *et al.* 2013; Ghobadian *et al.* 2015). Nanomateryaller su ortamına girdikten sonra asılı parçacıklarla birlikte omurgalı ve omurgasız hayvanlar tarafından absorbe edilebilmekte veya besinlerle birlikte alınabilmektedirler (Jovanovic and Palic 2012; Callaghan and MacCormack 2017). Bu durumdan dolayı, sucul organizmalar üzerine nanomateryallerin toksik etkileri hidrobiyota tarafından nanomateryallerin emilimi, dağılımı, atılımı ve ekotoksikolojik potansiyeli üzerine odaklanmıştır (Jovanovic and Palic 2012; Boyle *et al.* 2014; Carrillo *et al.* 2015). Sucul organizmaların erken yaşam evreleri üzerine çeşitli nanomateryallerin toksik etkileri üzerine de çok sayıda çalışma yapılmıştır (Callaghan and MacCormack 2017). Toksik etkiye sahip nanomateryaller arasında bakır oksit nanopartikülleri ve çok duvarlı karbon nanotüpler ekotoksikolojik araştırmalarda son yıllarda oldukça büyük ilgi çekmiştir. Nano boyuttaki bakır oksit eşsiz termo-fiziksel özelliği ve çeşitli nano yapılarına bağlı olarak elektronik (yarı iletkenler ve elektronik çiplerin yapımında), gaz sensörleri, katalizör, solar hücreler ve lityum bataryaların yapımında, tekstil, seramik ve pigment sanayiinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Song *et al.* 2015; Sun *et al.* 2016). Yine çok duvarlı karbon nanotüpler benzersiz termal, mekanik ve elektriksel özellikleri ile farmakoloji, tıp ve endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır (Cheng *et al.* 2007;

Maes *et al.* 2014; Gilbertson *et al.* 2016). Bu nanomateriyallerin kullanımındaki artış insanoğlunun ve çevrenin bakır oksit nanopartikülüne ve çok duvarlı karbon nanotüpe maruziyetini de artırmıştır (Falconer *et al.* 2015). Örneğin San Fransisko körfezinde $5.10^{-2} \mu\text{gL}^{-1}$ oranında bakır oksit nanopartikülü ve $10^{-1} \mu\text{gL}^{-1}$ oranında MWCNT tespit edilmiştir (Keller *et al.* 2013; Keller and Lazareva 2014). CuO ve MWCNT gibi nanomateriyallerin toksik özelliği nanomateriyalin şekli, büyüklüğü, konsantrasyonu, uygulama metodu ve yüzeyinin fonksiyonelleştirilip fonksiyonelleştirilmemesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Chang *et al.* 2012; Handy *et al.* 2012; Miseljić and Olsen 2014). Buna ilaveten, materyallerin işlevselleştirilmesi, sonikasyon süresi ve kaplanması da toksisiteyi üzerinde büyük etkiye sahiptir (Coleman *et al.* 2013; Zhuang and Gao 2014). Örneğin, Kennedy *et al.* (2008) hidrokisile edilmiş veya karboksil grubu ile fonksiyonelleştirilmiş MWCNT'nin toksisitesinin modifiye edilmemiş kontrol grubuna göre arttığını rapor etmiştir. Bu nanomateriyallerin sucul organizmalar üzerindeki toksik etkileri türe ve organizmanın gelişim periyoduna bağlı olarak da farklılık göstermektedir (Shaw *et al.* 2016; Callaghan and MacCormack 2017). CuO NP'nin yavru sazan balığının erken yaşam evrelerinde gelişimsel gecikmeye ve anormalliklere neden olduğu (Zhao *et al.* 2011), gökkuşağı alabalığı solungaçlarında hasara yol açtığı (Liu *et al.* 2014; Song *et al.* 2015), zebra balığı embriyoları üzerine güçlü toksisite gösterdiği belirtilmiştir (Sun *et al.* 2016). Yine, CuO NP'nin ergin zebra balıklarında solungaçlarda hasar oluşturduğu, fonksiyonelleştirilmemiş çok duvarlı karbon nanotüplerin zebra balığının üreme potansiyelini azalttığı rapor edilmiştir (Maes *et al.* 2014; Chakraborty *et al.* 2016; Shaw *et al.* 2016).

Literatürde balıklar ve diğer sucul organizmalar üzerine CuO NP ve MWCNT'lerin toksik etkileri üzerine yapılmış bazı çalışmalar bulunmakla birlikte bu nanomateriyallerin zebra balığının embriyonik gelişimi üzerine olan etkisi tam olarak aydınlatılamamış ve bu etkinin çeşitli antioksidan genler ve immün sistemle ilişkili genlerle bağlantısı çalışılmamıştır. Zebra balığı gelişim toksisitesi çalışmak ve spesifik biyolojik mekanizmaları araştırmak için oldukça kullanışlı bir organizmadır (Jin *et al.* 2010; Jin *et al.* 2015). Bu nedenle, bu tezde CuO NP ve MWCNT-COOH'un zebra balığı üzerine toksik etkisi çeşitli parametreler kullanılarak bir bütün olarak ele alınmıştır. Zebra

balığının embriyonik gelişimi üzerine CuO NP'nin ve MWCNT-COOH'un toksik etkisini değerlendirmek için farklı konsantrasyonlarda CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı embriyo/larvalarında mortalite oranı, koryondan çıkış oranı, malformasyon miktarı ve kalp atışı oranı araştırılmıştır. Çalışmamızda CuO NP'in ve MWCNT-COOH'un zebra balığı embriyo/larvalarında doz artışına bağlı olarak toksisiteye yol açtığı, ölüm oranı artırdığı ve koryondan çıkışı geciktirdiği belirlenmiştir. Ölüm oranı ve koryondan çıkış spesifik olmayan toksisiteyi belirlemek için sıklıkla kullanılan parametrelerdir. Koryon, koryondan çıkmadan önce embriyoyu dış etkilerden koruyan hücresiz, glikoprotein yapısında bir membrandır (Girardi *et al.* 2017). Koryondan çıkış zebra balığının yaşam döngüsünün embriyonik gelişiminde anahtar bir nokta olarak düşünülür ve balıklar üzerine toksik maddelerin etkisini değerlendirmek için temel parametrelerden biri olarak kabul edilir (Suvarchala and Philip 2016; De la Paz *et al.* 2017; Sun and Liu 2017). CuO NP ve MWCNT-COOH tarafından zebra balığı embriyolarının koryondan çıkışının gecikmesi koryonik keseye gömülü bir salgı bezi tarafından üretilen koryondan çıkış enziminin (Korinaz veya zebra balığı koryondan çıkış enzimi 1) bozulmasından, embriyogenezisin baskılanmasından, larvanın yumurta kabuğunu kırıp çıkma yeteneğinin zayıf olmasından veya toksik maddeler tarafından oluşturulan gelişimsel anormalliklerin embriyonun koryon zarını parçalama yeteneğini azaltmasından kaynaklanabilir (Hallare *et al.* 2005; Osman *et al.* 2007; Cao *et al.* 2016; Mu *et al.* 2016; De la Paz *et al.* 2017). Teleost embriyolarının normal koryondan çıkış işleminde koryon korinaz enzimi tarafından sindirilir (Osterauer and Kohler, 2008). Korinaz enziminin ömrünün oldukça kısa olması bu enzimin aktivitesi üzerine toksik maddelerin olası etkilerini gözlemlemeyi zorlaştırmaktadır (Sano *et al.* 2008; De la Paz *et al.* 2017). Bununla birlikte, CuO NP ve MWCNT-COOH uygulanmış larvalarda koryondan çıkışın belirgin olarak gecikmesi embriyo gelişimi esnasında korinaz enziminin bu nanomateriyaller tarafından inhibe edildiğine işaret etmektedir. Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda nanopartiküllerin ve karbon nanotüplerin potansiyel olarak koryon por kanallarından geçebildiği veya koryon üzerinde birikerek por kanallarını tıkadığı, böylece embriyo gelişimi için gerekli olan oksijen teminini azaltarak korinaz enziminin aktivitesini inhibe edebildiği gösterilmiştir (Cheng *et al.* 2007; Ghobadian *et al.* 2015; Sun *et al.* 2016; Girardi *et al.* 2017). Çalışmamızda elde edilen raman spektrumu sonuçlarına göre 0,5 mg/L

konsantrasyonunda uygulanan CuO NP ve 5, 20 mg/L konsantrasyonlarında uygulanan MWCNT-COOH larvaların kafa, vitellüs kesesi ve kuyruk gibi organlarına girmiştir. Deneyler esnasında yapılan gözlemler ve raman sonuçlarına göre daha büyük çapta olan CuO NP'in koryon zarı üzerinde yoğun olarak biriktiği, daha küçük yapıda olan MWCNT-COOH'un ise koryon zarından geçtiği anlaşılmıştır. Bu durumda koryon zarı üzerinde biriken CuO NP'in oksijen teminini azaltarak koryondan çıkış geciktirdiği, MWCNT-COOH'un ise koryon por kanallarını tıkayarak koryondan çıkışı geciktirdiği söylenebilir. Sonuçlarımıza benzer olarak çeşitli çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda zebra balığı embriyolarına uygulanan altın, gümüş, çinko oksit gibi nanopartiküllerin, tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin koryondan çıkışı geciktirdiği rapor edilmiştir (Xiong *et al.* 2011; Liu *et al.* 2014; Xin *et al.* 2015; Girardi *et al.* 2017).

Gelişimsel anormallikler toksik maddelerin teratojenikliğini değerlendirmek için önemli parametredir (Niell *et al.* 2010). Çalışmamızda CuO NP'ü ve MWCNT-COOH'a maruz bırakılan zebra balığı embriyo/larvalarında kalp ödemi, vitellüs kesesi ödemi, omurga deformasyonu, kuyruk deformasyonu ve çeşitli vücut anomalileri gözlenmiş olup bu durum uygulanan nanomateryaller tarafından oluşturulan teratojenik etkinin görmezden gelinemeyeceğini göstermektedir. Nanomateryallere maruz bırakılan embriyolarda kalp ödemi 24. saatte, vitellüs kesesi ödemi 48. saatte dahi gözlenmiştir. Genel olarak vitellüs kesesi ödeminin gözlendiği embriyo/larvalarda kalp ödeminin de olduğu belirlenmiştir. Vitellüs kesesinde meydana gelen ödemin besin alınımını bloke edebileceği, bu durumda kalp ödemi ile sonuçlanabileceği daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Fraysse *et al.* 2006; Mu *et al.* 2013; Cao *et al.* 2016). Yapılan raman spektroskopisi analizlerinde bakır oksit nanopartikülü ve MWCNT-COOH'un vitellüs kesesine girdiği saptanmıştır. Vitellüs kesesine giren nanomateryallerin vitellüs kesesinde ödeme neden olduğu ve bu ödeminde kalp ödeminin tetiklediği söylenebilir. Bu durumda, özellikle yüksek konsantrasyonda embriyolara uygulanan MWCNT-COOH maruziyetine bağlı gelişen perikardiyal ödem vitellüs kesesi ödemi tarafından indüklenmiş olabilir. Elde edilen raman spektrumu verileri bu durumu desteklemektedir. Çünkü hem 5 mg/L konsantrasyonda hem de 20 mg/L

konsantrasyonda uygulanan MWCNT-COOH zebra balığı embriyo/larvalarının vitellüs kesesine girmiştir.

Zebra balığı embriyonik gelişiminin en erken safhalarında oluşan fonksiyonel organlardan biri kalptir ve embriyonik dönemde kalp hızının ölçümü önemli toksikolojik parametreler arasında yer almaktadır (Hill *et al.* 2005; Sun and Liu, 2017). Bu nedenle, kalp atış hızının ölçümü kalp fonksiyonlarının değerlendirilmesinde oldukça önemlidir. Kalp atışı ritmindeki değişiklikler gizli bir patolojik durumun etkisiyle de ortaya çıkabilir (Sun and Liu 2017). Zebra balığı embriyo/larvalarına uygulanan CuO NP ve MWCNT-COOH doz artışına bağlı olarak kalp atışı hızını düşürmüştür. Bu yüzden, uygulanan nanomateryaller zebra balığı embriyolarında kalp atışı hızının azalmasına bağlı olarak kalp fonksiyonunu değiştirmiş olabilir. Kalp fonksiyonu perikardiyum ve kalp anormalliklerinde etkilenebilir, böylece düzensiz kalp atışı ve kan akımı yetmezliğine neden olur. Elde edilen bulgular neticesinde kullanılan nanomateryallerin kalp atış hızını ve kalp fonksiyonlarını değiştirebildiği kalbin uygulanan nanomateryallerden etkilendiği sonucunu göstermektedir.

Metal transkripsiyon faktörü MTF-1 tarafından metalotiyonein genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu, DNA bağlama, nüklear translokasyon, hücre içerisinde düzensiz çinko artışına yol açan oksidatif stres ve oksijen yetersizliğini de kapsayan çeşitli uyarılara cevap olarak genlerin transkripsiyonunu düzenler (Murphy *et al.* 1999; Smirnova *et al.* 2000; Lichtlen and Schaffner 2001). MTF metal bağlama için güçlü bir afiniteye sahiptir ve bu yüzden detoksifikasyonun düzenlenmesinde önemlidir (Krishnaraj *et al.* 2016). MTF-1 embriyonik hepatositlerin gelişimi ve farklılaşması içinde gereklidir (Gunes *et al.* 1998). CuO NP ve MWCNT-COOH'a maruz bırakılan zebra balığı embriyo/larvalarında doz artışına bağlı olarak MTF-1 geninin ekspresyonu azalmıştır. Bu azalış larvalarda oksidatif stresin olduğunu işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlara benzer biçimde gümüş nanopartikülü uygulanmış ergin zebra balıklarının karaciğerinde MTF-1 geninin ekspresyonunun azaldığı Krishnaraj *et al.* (2016) tarafından bildirilmiştir. Öte yandan ısı şok proteinleri, özellikle HSP70 gen ekspresyonundaki değişikliğin ölçülmesinin ağır metaller, teratojenler, kimyasallar ve

oksijen yetersizliği gibi stres faktörleri tarafından oluşturulan toksikolojik hasarın araştırılmasında faydalı olduğu bildirilmiştir (Kim *et al.* 2011; Krishnaraj *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016). Isı şok proteinleri ağır metaller, toksik kimyasallar ve nanomateryaller gibi stres faktörlerine karşı hücrelerin kendini savunmasında yer alırlar (Vale *et al.* 2016). Dorts *et al.* (2016) ısı şok proteinlerinin zebra balığı embriyolarının normal gelişimi esnasında da önemli rol oynadığını bildirmiştir (Cui *et al.* 2013). Isı şok proteinleri proliferasyon, morfogenez ve hücre hareketinde görev aldığından dolayı moleküler şaperonlar olarak iş görürler (Dahms and Lee 2010; Cui *et al.* 2013). Kontrol ile mukayese edildiğinde hem CuO NP hem de MWCNT-COOH uygulanmış zebra balığı larvalarında HSP70 geninin ekspresyonu önemli oranda artmıştır. HSP70 hücrel stresin hassas bir indikatörü olarak düşünülür (Cui *et al.* 2013). HSP70 geninin ekspresyonundaki artış nanomateryallere maruziyet dolayısı ile oluşan oksidatif hasarın azaltılması veya hücre bütünlüğünün devamı için adaptif bir mekanizma olabilir. Yine, NFkB transkripsiyon faktörü kompleksi oksidatif strese cevap veren hücrel sensörlerden biridir (Helenius *et al.* 1996). Hücrelerdeki oksidatif stres NFkB'yi aktive edebilir ve DNA'da hasar oluşturabilir (Ye *et al.* 2016). NFkB reaktif oksijen türevleri tarafından indüklenir ve antioksidanlar tarafından inhibe edilir (Campo *et al.* 2008). NFkB hücrelerde adhezyon molekülleri ve kemokinler, sitokinlerin sentezi, siklojenaz-2 ve nitrik oksit sentaz gibi çok sayıda genin ekspresyonunun düzenlenmesi ve apoptoz, hücre proliferasyonu gibi çok sayıda fizyolojik olayda önemli rol oynar (Ozbek *et al.* 2009; da Silva *et al.* 2014). Oksijen yetmezliği ve serbest radikaller gibi stresi uyaran faktörler akut stres ve bağışıklık tepkisinde rol oynayan NFkB geninin aktivitesini tetikler (Barchowsky *et al.* 1996; Campo *et al.* 2008). Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde zebra balığı larvalarına uygulanan CuO NP ve MWCNT-COOH NFkB geninin ekspresyonunu artırmıştır. Kullandığımız nanomateryaller ilk 48 saat zarfında koryon zarı üzerinde birikerek embriyonun oksijen miktarında azalmaya, sonraki 48 saat zarfında suyu kirleterek sudaki oksijen konsantrasyonunun düşmesine neden olmuş ve NFkB gen ekspresyonunda artışa yol açmış olabilir. Öte yandan, NFkB geninin ekspresyonundaki artış larvalarda stres oluştuğuna ve reaktif oksijen türevlerinin artmış olduğuna işaret etmektedir.

Bağışıklık sistemini etkileyen toksik maddelere maruziyet balıklarda endokrin sistemin bozulmasına neden olabilir (Jin *et al.* 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli kimyasalların ve nanomateryallerin balıklarda bağışıklık sistemini zayıflattığı yada güçlendirdiği rapor edilmiştir (Jin *et al.* 2010; Jovanovic and Palic 2012; Brun *et al.* 2014; Mu *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2016). Bu nedenle, bağışıklık sistemi toksik maddelerin ekotoksitesinin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir (Stein, 2011). Zebra balığının erken gelişim evrelerinde toksik ajanlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı tek savunma doğal bağışıklık sistemidir (innate immune system) (Trede *et al.* 2004). Adaptif bağışıklık sistemi ise fertilizasyondan 3 hafta sonra geliştiği için zebra balığının gelişiminin ilk haftalarında etkisizdir (Nayak *et al.* 2007). Bu durumdan dolayı zebra balığının erken gelişim evreleri doğal bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını araştırmak için oldukça uygundur (Mu *et al.* 2015). Doğal bağışıklık sistemi ile ilgili genlerin ekspresyonunun bakteri, virüs ve çeşitli toksik maddeler tarafından artırıldığı yada azaltıldığı son yıllarda yapılan çok sayıda çalışmada ortaya konmuştur (Jin *et al.* 2010; Brun *et al.* 2014; Mu *et al.* 2015). Doğal bağışıklık sisteminin düzenli çalışması zebra balığının çevresel değişikliklere yanıt vermesinde hayati bir rol oynamaktadır. Bu yüzden, zebra balığının doğal bağışıklık sistemi işlevi üzerine yapılan araştırmalar nanomateryallerin toksisitesinin tam olarak anlaşılmasına büyük katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda zebra balığı larvalarına uygulanan CuO NP ve MWCNT-COOH'un doğal bağışıklık sistemi ile ilişkili IL-1 β geninin transkripsiyonunu artırdığı, TRF, CEBP, TLR4 ve TLR22 genlerinin transkripsiyonunu ise azalttığı belirlenmiştir. IL-1 β geni fagositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmasında hayati bir rol oynamaktadır (Jin *et al.* 2010). Ayrıca bu gen makrofajları ve nötrofilleri harekete geçirerek hasar görmüş bölgede toplanmalarını sağlar (Dinarello 1996). IL-1 β ekspresyonunda meydana gelen artış 96 saatlik zebra balığında bir immün cevabın oluştuğunu göstermektedir. Öte yandan, doğal bağışıklık sistemi ile ilişkili diğer genlerin ekspresyon seviyelerinde uygulanan nanomateryallere bağlı olarak ortaya çıkan azalış larvaların strese girdiğine ve bu stresin bağışıklık sistemini baskıladığına işaret etmektedir. Strese bağlı olarak bu genlerin ekspresyonlarında azalış gümüş ve titanyum dioksit nanopartikülü uygulanmış zebra balığında da rapor edilmiştir (Yeo and Kim 2010; Jovanovic and Palic 2012; Krishnaraj *et al.* 2016).

Sonuç olarak zebra balığı embriyo/larvalarına uygulanan CuO NP ve MWCNT-COOH'un ölüm oranını artırmak, koryondan çıkışı geciktirmek, malformasyon oranını ve sayısını artırmak, kalp atış hızını düşürmek yoluyla gelişimsel toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan raman spektroskopisi analiz sonuçlarına göre çalışmada kullanılan CuO NP ve MWCNT-COOH'un su ortamından balığın çeşitli dokularına geçtiği tespit edilmiştir. Söz konusu nanomateryallere maruziyetin zebra balığı embriyo/larvalarında hasar oluşturduğu, antioksidan sistem ve doğal bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerin ifadelerinde değişime yol açarak oksidatif strese ve immünotoksisiteye neden olduğu saptanmıştır.



KAYNAKLAR

- Adam, N., Vergauwen, L., Blust, R., Knapen, D., 2015. Gene transcription patterns and energy reserves in *Daphnia magna* show no nanoparticle specific toxicity when exposed to ZnO and CuO nanoparticles. *Environmental Research*, 138, 82-92.
- Adenuga, A.A., Truong, L., Tanguay, R.L., Remcho, V.T., 2013. Preparation of water soluble carbon nanotubes and assessment of their biological activity in embryonic zebrafish. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 3, 38-51.
- Aillon, K.L., Xie, Y.M., El-Gendy, N., Berkland, C.J., Forrest, M.L., 2009. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advances Drug Delivery Reviews*, 61, 457-466.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 1461-1468.
- Aschberger, K., Johnston, H.J., Stone, V., Aitken, R.J., Hankin, S.M., Peters, S.A.K., Tran, C.L., Christensen, F.M., 2010. Review of carbon nanotubes toxicity and exposure-Appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Critical Review of Toxicology*, 40, 759-790.
- Banerjee, S., Leptin, M., 2014. Systemic Response to Ultraviolet Radiation Involves Induction of Leukocytic IL-1 beta and Inflammation in Zebrafish. *Journal of Immunology*, 193, 1408-1415.
- Barchowsky, A., Dudek, E.J., Treadwell, M.D., Wetterharn, K.E., 1996. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radical Biolgy and Medicine*, 21, 783-790.
- Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J., 2013. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Accounts Chemical Research*, 46, 854-862.
- Battez, A.H., Gonzalez, R., Viesca, J.L., Fernandez, J.E., Fernandez, J.M.D., Machado, A., Chou, R., Riba, J., 2008. CuO, ZrO₂ and ZnO nanoparticles as antiwear additive in oil lubricants. *Wear*, 265, 422-428.
- Battez, A.H., Viesca, J.L., Gonzalez, R., Blanco, D., Asedegbega, E., Osorio, A., 2010. Friction reduction properties of a CuO nanolubricant used as lubricant for a NiCrBSi coating. *Wear*, 268, 325-328.
- Bermejo-Nogales, A., Fernandez-Cruz, M.L., Navas, J.M., 2017. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 90, 297-307.
- Bohme, S., Baccaro, M., Schmidt, M., Potthoff, A., Stark, H.J., Reemtsma, T., Kuhnel, D., 2017. Metal uptake and distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo: differences between nanoparticles and metal ions. *Environmental Science-Nano* 4, 1005-1015.
- Bondarenko, O., Ivask, A., Kakinen, A., Kahru, A., 2012. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environmental Pollution*, 169, 81-89.

- Boyle, D., Fox, J.E., Akerman, J.M., Sloman, K.A., Henry, T.B., Handy, R.D., 2014. Minimal effects of waterborne exposure to single-walled carbon nanotubes on behaviour and physiology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 146, 154-164.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brun, N.R., Lenz, M., Wehrli, B., Fent, K., 2014. Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions. *Science of the Total Environment*, 476, 657-666.
- Bundschuh, M., Seitz, F., Rosenfeldt, R.R., Schulz, R., 2016. Effects of nanoparticles in fresh waters: risks, mechanisms and interactions. *Freshwater Biology*, 61, 2185-2196.
- Callaghan, N.I., MacCormack, T.J., 2017. Ecophysiological perspectives on engineered nanomaterial toxicity in fish and crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 193, 30-41.
- Campo, G.M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Traina, P., Sama, D., Calatroni, A., 2008. NF- κ B and caspases are involved in the hyaluronan and chondroitin-4-sulphate-exerted antioxidant effect in fibroblast cultures exposed to oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology*, 28, 509-517.
- Cao, F.J., Liu, X.S., Wang, C.J., Zheng, M.Q., Li, X.F., Qiu, L.H., 2016. Acute and short-term developmental toxicity of cyhalofop-butyl to zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 10080-10089.
- Cao, Y., Liu, S.Y., Jian, X., Zhu, G.L., Yin, L.J., Zhang, L., Wu, B.A., Wei, Y.F., Chen, T., Gao, Y.Q., Tang, H., Wang, C., He, W.D., Zhang, W.L., 2015. Synthesis of high-purity CuO nanoleaves and analysis of their ethanol gas sensing properties. *Rsc Advances*, 5, 34788-34794.
- Carrillo, Y., Torres-Duarte, C., Oviedo, M.J., Hirata, G.A., Huerta-Saquero, A., Vazquez-Duhalt, R., 2015. Lipid Peroxidation and Protein Oxidation Induced by Different Nanoparticles in Zebrafish Organs. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13, 709-723.
- Cava, R.J., 1990. Structural Chemistry and the Local Charge Picture of Copper-Oxide Superconductors. *Science*, 247, 656-662.
- Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G., Lee, S.S., 2016. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14.
- Chang, Y.N., Zhang, M.Y., Xia, L., Zhang, J., Xing, G.M., 2012. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 5, 2850-2871.
- Chen, L.Q., Hu, P.P., Zhang, L., Huang, S.Z., Luo, L.F., Huang, C.Z., 2012. Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish. *Science China Chemistry*, 55, 2209-2216.
- Cheng, J., Flahaut, E., Cheng, S.H., 2007. Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 708-716.
- Cheng, J.P., Chan, C.M., Veca, L.M., Poon, W.L., Chan, P.K., Qu, L.W., Sun, Y.P., Cheng, S.H., 2009. Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235, 216-225.

- Coleman, J.G., Kennedy, A.J., Bednar, A.J., Ranville, J.F., Laird, J.G., Harmon, A.R., Hayes, C.A., Gray, E.P., Higgins, C.P., Lotufo, G., Steevens, J.A., 2013. Comparing the effects of nanosilver size and coating variations on bioavailability, internalization, and elimination, using *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 2069-2077.
- Colvin, V.L., 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21, 1166-1170.
- Cui, Y.T., Liu, B., Xie, J., Xu, P., Tsion, H.M.H., Zhang, Y.Y., 2013. The effect of hyperthermia on cell viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Thermal Biology*, 38, 355-361.
- Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L., O'Connor, C.J., 2004. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews*, 104, 3893-3946.
- da Silva, B.S., Rodrigues, G.B., Rocha, S.W.S., Ribeiro, E.L., Gomes, F.O.D., Silva, A.K.S.E., Peixoto, C.A., 2014. Inhibition of NF-kappa B activation by diethylcarbamazine prevents alcohol-induced liver injury in C57BL/6 mice. *Tissue Cell*, 46, 363-371.
- Dahms, H.U., Lee, J.S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*, 97, 3-14.
- De la Paz, J.F., Beiza, N., Paredes-Zuniga, 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.
- de Souza, J., Matsubara, E.Y., Franchi, L.P., Martins, I.P., Rivera, L.M.R., Rosolen, J.M., Grisolia, C.K., 2014. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Environmental Research*, 134, 9-16.
- Dinarelli, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., Alexander, A., 2006. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Science*, 92, 5-22.
- Dorts, J., Falisse, E., Schoofs, E., Flamion, E., Kestemont, P., Silvestre, F., 2016. DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. *Sci Rep-Uk* 6.
- Ema, M., Hougaard, K.S., Kishimoto, A., Honda, K., 2016. Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology*, 10, 391-412.
- Fadool, J.M., Dowling, J.E., 2008. Zebrafish: A model system for the study of eye genetics. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27:89-110.
- Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Advances Drug Delivery Reviews*, 61, 478-486.
- Falconer, J.L., Jones, C.F., Lu, S., Grainger, D.W., 2015. Carbon nanomaterials rescue phenanthrene toxicity in zebrafish embryo cultures. *Environmental Science-Nano*, 2, 645-652.

- Farkas, J., Booth, A.M., 2017. Are fluorescence-based chlorophyll quantification methods suitable for algae toxicity assessment of carbon nanomaterials? *Nanotoxicology*, 11, 569-577.
- Fraysse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day toxicity of embryo-larval bioassay to assess chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 253-267.
- Fu, L., Cao, L.C., Liu, Y.Q., Zhu, D.B., 2004. Molecular and nanoscale materials and devices in electronics. *Advances Colloid Interface*, 111, 133-157.
- Ghobadian, M., Nabiuni, M., Parivar, K., Fathi, M., Pazooki, J., 2015. Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 260-267.
- Gilbertson, L.M., Melnikov, F., Wehmas, L.C., Anastas, P.T., Tanguay, R.L., Zimmerman, J.B., 2016. Toward safer multi-walled carbon nanotube design: Establishing a statistical model that relates surface charge and embryonic zebrafish mortality. *Nanotoxicology*, 10, 10-19.
- Girardi, F.A., Bruch, G.E., Peixoto, C.S., Dal Bosco, L., Sahoo, S.K., Goncalves, C.O.F., Santos, A.P., Furtado, C.A., Fantini, C., Barros, D.M., 2017. Toxicity of single-wall carbon nanotubes functionalized with polyethylene glycol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 37, 214-221.
- Goldshmit, Y., Sztal, T.E., Jusuf, P.R., Hall, T.E., Nguyen-Chi, M., Currie, P.D., 2012. *The Journal of Neuroscience*, 32(22): 7477-7492.
- Gonzalez, L., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 2008. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology*, 2, 252-273.
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., Barber, D.S., 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 41, 8178-8186.
- Gunes, C., Heuchel, R., Georgiev, O., Muller, K.H., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A., Schaffner, W., 1998. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *Embo Journal*, 17, 2846-2854.
- Hallare, A., Pagulayan, R., Lacdan, N., Kohler, H., Triebkorn, R., 2005. Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: developmental toxicity and stress protein responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 104: 171-187.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Kohler, H.R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30, 7-17.
- Handy, R.D., Cornelis, G., Fernandes, T., Tsyusko, O., Decho, A., Sabo-Attwood, T., Metcalfe, C., Steevens, J.A., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., 2012. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 15-31.
- Helenius, M., Hanninen, M., Lehtinen, S.K., Salminen, A., 1996. Aging induced up regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- κ B

- transcription factor in mouse cardiac muscle. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 28, 487-498.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science*, 86, 6-19.
- Hou, P.X., Xu, S.T., Ying, Z., Yang, Q.H., Liu, C., Cheng, H.M., 2003. Hydrogen adsorption/desorption behavior of multi-walled carbon nanotubes with different diameters. *Carbon*, 41, 2471-2476.
- Jackson, P., Jacobsen, N.R., Baun, A., Birkedal, R., Kuhnel, D., Jensen, K.A., Vogel, U., Wallin, H., 2013. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal*, 7, 154.
- Jin, Y.X., Chen, R.J., Liu, W.P., Fu, Z.W., 2010. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 854-861.
- Jin, Y.X., Liu, Z.Z., Liu, F., Ye, Y., Peng, T., Fu, Z.W., 2015. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, 48, 9-17.
- Jorio, A., Saito, R., Hafner, J.H., Lieber, C.M., Hunter, M., McClure, T., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M.S., 2001. Structural (n, m) determination of isolated single-wall carbon nanotubes by resonant Raman scattering. *Physical Review Letters*, 86, 1118-1121.
- Jovanovic, B., Palic, D., 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish-Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquatic Toxicology*, 118, 141-151.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Moller, L., 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1726-1732.
- Keller, A.A., Lazareva, A., 2014. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Science & Technology Letters*, 1, 65-70.
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticul Research*, 15.
- Kennedy, A.J., Hull, M.S., Steevens, J.A., Dontsova, K.M., Chappell, M.A., Gunter, J.C., Weiss, C.A., 2008. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1932-1941.
- Kim, R.O., Rhee, J.S., Won, E.J., Lee, K.W., Kang, C.M., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus sp.* *Aquatic Toxicology*, 101, 529-539.
- Krishnaraj, C., Harper, S.L., Yun, S.I., 2016. In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials*, 301, 480-491.
- Kuzma, J., Priest, S., 2010. Nanotechnology, Risk, and Oversight: Learning Lessons from Related Emerging Technologies. *Risk Analysis*, 30, 1688-1698.

- Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Science*, 77, 126-134.
- Lele, Z., Khrono, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, 14:57-72.
- Li, J.Y., Ying, G.G., Jones, K.C., Martin, F.L., 2015. Real-world carbon nanoparticle exposures induce brain and gonadal alterations in zebrafish (*Danio rerio*) as determined by biospectroscopy techniques. *Analyst*, 140, 2687-2695.
- Lichtlen, P., Schaffner, W., 2001. Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioessays*, 23, 1010-1017.
- Liu, J.N., Fan, D.L., Wang, L., Shi, L.L., Ding, J., Chen, Y.W., Shen, S.B., 2014. Effects of ZnO, CuO, Au, and TiO₂ nanoparticles on *Daphnia magna* and early life stages of zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Protection Engineering*, 40, 139-149.
- Liu, X.T., Mu, X.Y., Wu, X.L., Meng, L.X., Guan, W.B., Ma, Y.Q., Sun, H., Wang, C.J., Li, X.F., 2014. Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide to Zebrafish Embryos. *Biomedical and Environmental Science*, 27, 676-683.
- Liu, Y., Zhang, Y., Tao, S., 2016. Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 124-132.
- Maes, H.M., Stibany, F., Giefers, S., Daniels, B., Deutschmann, B., Baumgartner, W., Schaffer, A., 2014. Accumulation and Distribution of Multiwalled Carbon Nanotubes in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology*, 48, 12256-12264.
- Maisano, M., Cappello, T., Catanese, E., Vitale, V., Natalotto, A., Giannetto, A., Barreca, D., Brunelli, E., Mauceri, A., Fasulo, S., 2015. Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay. *Marine Environmental Research*, 111, 121-127.
- Maynard, A.D., Kuempel, E.D., 2005. Airborne nanostructured particles and occupational health. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 587-614.
- Meeker, N.D., Trede, N.S., 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 745-757.
- Miranda-Rodriguez, J., Salas-Vidal, E., Lomeli, H., Zurita, M., Schnabel, D., 2017. RhoA/ROCK pathway activity is essential for the correct localization of the germ plasm mRNAs in zebrafish embryos. *Developmental Biology*, 421, 27-42.
- Miseljic, M., Olsen, S.I., 2014. Life-cycle assessment of engineered nanomaterials: a literature review of assessment status. *Journal of Nanoparticle Research*, 16.
- Mu, X.Y., Chai, T.T., Wang, K., Zhang, J., Zhu, L.Z., Li, X.F., Wang, C.J., 2015. Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio rerio*) during different life stages. *Aquatic Toxicology*, 160, 57-68.
- Mu, X.Y., Chai, T.T., Wang, K., Zhu, L.Z., Huang, Y., Shen, G.M., Li, Y.R., Li, X.F., Wang, C.J., 2016. The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: A mechanism research. *Environmental Pollution*, 212, 18-26.

- Mu, X.Y., Pang, S., Sun, X.Z., Gao, J.J., Chen, J.Y., Chen, X.F., Li, X.F., Wang, C.J., 2013. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, 175, 147-157.
- Murphy, B.J., Andrews, G.K., Bittel, D., Discher, D.J., McCue, J., Green, C.J., Yanovsky, M., Giaccia, A., Sutherland, R.M., Laderoute, K.R., Webster, K.A., 1999. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Research*, 59, 1315-1322.
- Namburu, P.K., Kulkarni, D.P., Misra, D., Das, D.K., 2007. Viscosity of copper oxide nanoparticles dispersed in ethylene glycol and water mixture. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 32, 397-402.
- Nayak, A.S., Lage, C.R., Kim, C.H., 2007. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Science*, 98, 118-124.
- Niell, S., Pareja, L., Asteggiate, L.G., Cesio, M.V., Heinzen, H., 2010. Comparison of extraction solvents and conditions for herbicide residues in milled rice with liquid chromatography-diode array detection analysis (LC-DAD). *Food Additive and Contaminants A*, 27, 206-211.
- Osman, A.G.M., Mckkawy, I.A., Verreth, J., Kirschbaum, F., 2007. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 1-13.
- Osterauer, R., Kohler, H.R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 86, 485-494.
- Oyarbide, U., Iturria, I., Rainieri, S., Pardo, M.A., 2015. Use of Gnotobiotic Zebrafish to Study *Vibrio anguillarum* Pathogenicity. *Zebrafish*, 12, 71-80.
- Ozbek, E., Cekmen, M., Ilbey, Y.O., Simsek, A., Polat, E.C., Somay, A., 2009. Atorvastatin Prevents Gentamicin-Induced Renal Damage in Rats through the Inhibition of p38-MAPK and NF-kB Pathways. *Renal Failure*, 31, 382-392.
- Parichy, D.M., 2006. Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*, 97: 200-210.
- Qian, L., Cui, F., Yang, Y., Liu, Y., Qi, S., Wang, C., 2018. Mechanism of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. *Science of The Total environment*, 634:478-487.
- Rauta, P.R., Samanta, M., Dash, H.R., Nayak, B., Das, S., 2014. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*, 158, 14-24.
- Salah, M., Farghali, A.A., Azmy, H., Khedr, H., 2013. Biological compatibility of carbon nanotubes for treatment of pollution of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by lead acetate. *Life Science journal*, 10(2), 2106-2117.
- Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., Yasumasu, S., 2008. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *Febs Journal*, 275, 5934-5946.
- Sant, K., Jacobs, H., Borofski, K., Moss, J., Timme-Laragy, A., 2017. Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic

- organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio*. Environmental Pollution 220, 807–817.
- Seaton, A., Donaldson, K., 2005. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. Lancet, 365, 923-924.
- Shaw, B.J., Liddle, C.C., Windeatt, K.M., Handy, R.D., 2016. A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: experimental modifications and recommendations. Archives of Toxicology, 90, 2077-2107.
- Shaukat, A.I., Harald, G.J., Michael, K.R., 2011. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. PLoS One 6.
- Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H.M., Andrews, G.K., 2000. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. The Journal of Biological Chemistry, 275, 9377-9384.
- Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*):Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. Aquatic Toxicology, 82, 94-109.
- Song, L., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., Galloway, T.S., Tyler, C.R., 2015. A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish. Chemosphere, 139, 181-189.
- Stein, C., 2011. Innate immune genes in the zebrafish, *Danio rerio*. PhD Thesis, University of Köln, Köln, Germany.
- Sun, G.J., Liu, K.C., 2017. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology, 192, 165-170.
- Sun, Y., Zhang, G., He, Z.Z., Wang, Y.J., Cui, J.L., Li, Y.H., 2016. Effects of copper oxide nanoparticles on developing zebrafish embryos and larvae. International Journal of Nanomedicine, 11, 905-918.
- Suvarchala, G., Philip, G.H., 2016. Toxicity of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol tested at multiple stages of zebrafish (*Danio rerio*) development. Environmental Science and Pollution Research, 23, 15515-15523.
- Thit, A., Huggins, K., Selck, H., Baun, A., 2017. Acute toxicity of copper oxide nanoparticles to *Daphnia magna* under different test conditions. Toxicological & Environmental Chemistry, 99, 665-679.
- Tranquada, J.M., Sternlieb, B.J., Axe, J.D., Nakamura, Y., Uchida, S., 1995. Evidence for Stripe Correlations of Spins and Holes in Copper-Oxide Superconductors. Nature, 375, 561-563.
- Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T., Zon, L.I., 2004. The use of zebrafish to understand immunity. Immunity, 20, 367-379.
- Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. Aquatic Toxicology, 170, 162-174.
- Vasyukova, I., Gusev, A., Tkachev, A., 2015. Reproductive toxicity of carbon nanomaterials: a review. Iop Conference Series-Materials Science, 98.
- Walters, D.A., Ericson, L.M., Casavant, M.J., Liu, J., Colbert, D.T., Smith, K.A., Smalley, R.E., 1999. Elastic strain of freely suspended single-wall carbon nanotube ropes. Applied Physical Letters, 74, 3803-3805.

- Wang, Z.Y., Li, N., Zhao, J., White, J.C., Qu, P., Xing, B.S., 2012. CuO Nanoparticle Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 1512-1521.
- White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, M., Burns, C.E., Zon, L.I., 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*, 2(2): 183-189.
- Wu, F., Bortvedt, A., Harper, B.J., Crandon, L.E., Harper, S.L., 2017. Uptake and toxicity of CuO nanoparticles to *Daphnia magna* varies between indirect dietary and direct waterborne exposures. *Aquatic Toxicology*, 190, 78-86.
- Xiao, Y.L., Peijnenburg, W.J.G.M., Chen, G.C., Vijver, M.G., 2018. Impact of water chemistry on the particle-specific toxicity of copper nanoparticles to *Daphnia magna*. *Science Of The Total Environment*, 610, 1329-1335.
- Xie, H., Mason, M.M., Wise, J.P., Sr., 2011. Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on Environmental Health*, 26, 251-268.
- Xin, Q., Rotchell, J.M., Cheng, J.P., Yi, J., Zhang, Q., 2015. Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 35, 1481-1492.
- Xiong, D.W., Fang, T., Yu, L.P., Sima, X.F., Zhu, W.T., 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science Of The Total Environment*, 409, 1444-1452.
- Xu, J.F., Ji, W., Shen, Z.X., Tang, S.H., Ye, X.R., Jia, D.Z., Xin, X.Q., 1999. Preparation and characterization of CuO nanocrystals. *Journal of Solid State Chemistry*, 147, 516-519.
- Ye, X.Z., Jiang, R., Zhang, Q.Q., Wang, R.F., Yang, C.H., Ma, J., Du, H., 2016. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA from patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Journal of International Medical Research*, 44, 472-482.
- Yeo, M.K., Kim, H.E., 2010. Gene expression in zebrafish embryos following exposure to TiO₂ nanoparticles. *Molecular & Cellular Toxicology*, 6, 97-104.
- Yokohira, M., Hashimoto, N., Yamakawa, K., Suzuki, S., Saoo, K., Kuno, T., Imaida, K., 2009. Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO₂ Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 22, 71-78.
- Yu, M.F., Files, B.S., Arepalli, S., Ruoff, R.S., 2000. Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties. *Physical Review Letters*, 84, 5552-5555.
- Yuan, H., Zhang, T., Liu, X.H., Deng, M., Zhang, W.Q., Wen, Z.L., Chen, S.J., Chen, Z., de The, H., Zhou, J., Zhu, J., 2015. Sumoylation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha is implicated in hematopoietic stem/progenitor cell development through regulating runx1 in zebrafish. *Scientific Reports-Uk* 5.
- Zannotti, M., Giovannetti, R., D'Amato, C.A., Rommozzi, E., 2016. Spectroscopic studies of porphyrin functionalized multiwalled carbon nanotubes and their interaction with TiO₂ nanoparticles surface. *Spectrochimica Acta A*, 153, 22-29.

- Zhang, Q.F., Li, Y.W., Liu, Z.H., Chen, Q.L., 2016. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. *Aquatic Toxicology*, 181, 76-85.
- Zhao, J., Wang, Z.Y., Liu, X.Y., Xie, X.Y., Zhang, K., Xing, B.S., 2011. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 197, 304-310.
- Zhao, X.S., Wang, S.T., Wu, Y., You, H., Lv, L.N., 2013. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 136, 49-59.
- Zhuang, W., Gao, X.L., 2014. Methods, Mechanisms and Typical Bio-Indicators of Engineered Nanoparticle Ecotoxicology: An Overview. *Clean-Soil Air Water*, 42, 377-385.



ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2013 yılından Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2013 yılından beri Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine devam etmektedir.

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde 2011 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve 1 kız çocuğu annesidir.