

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

**BAZI NANOPARÇACIKLARIN SUBAKUT TOKSİSİTESİ VE ENDOKRİN
BOZUCU ETKİLERİNİN AMFİBİ METAMORFOZ TESTİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eren ARSLAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

AĞUSTOS 2021

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

**BAZI NANOPARÇACIKLARIN SUBAKUT TOKSİSİTESİ VE ENDOKRİN
BOZUCU ETKİLERİNİN AMFİBİ METAMORFOZ TESTİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Eren ARSLAN
(36173611036)**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

AĞUSTOS 2021

TEŐEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalıőmasının her aőamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemededen beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye,

Çalıőmalarımnda laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Çevre Toksikolojisi Laboratuvarı sorumlusu hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e

Çalıőmalarımnda ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu çalıőmalarım süresince debenden her türlü desteklerini esirgemeyen aileme,

Tezin uygulama aőamasında FYL-2019-1830 no'lu proje ile vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

teőekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Bazı Nanoparçacıkların Subakut Toksisitesi ve Endokrin Bozucu Etkilerinin Amfibi Metamorfoz Testi ile Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Eren ARSLAN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER VE ÖNSÖZ.....	i
ONUR SÖZÜ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Endokrin Bozucu Kimyasallar.....	2
1.2 Nanoparçacıklar.....	3
1.3 Çalışma Kapsamında Toksik Etkileri Test Edilen Nanoparçacıklar ve Kullanım Alanları.....	3
1.3.1 Demir oksit nanoparçacıklar (Fe ₂ O ₃ NP).....	4
1.3.2 Çinko oksit nanoparçacıklar (ZnO NP).....	4
1.3.3 Seryum oksit nanoparçacıklar (CeO ₂ NP).....	5
1.4 Nanoparçacıkların Toksikite Mekanizmaları.....	5
1.5 Nanoparçacıkların Fizikokimyasal Özelliklerinin Toksikiteye Etkisi.....	7
1.5.1 Boyutun etkisi.....	8
1.5.2 Yüzey yükünün etkisi.....	9
1.5.3 Şeklin etkisi.....	9
1.5.4 Çözünürlüğün etkisi.....	9
1.6 Çalışmada Kullanılacak Test Organizması, <i>Xenopus laevis</i>	10
1.6.1 Kurbağa metamorfozu.....	11
1.7 Çalışmada Yapılan Testler ve Biyokimyasal Analizler.....	12
1.7.1 Amfibi Metamorfoz Testi (AMT).....	12
1.7.2 Tiroit hormon düzeyleri.....	14
1.7.3 Diğer biyokimyasal belirteçler.....	17
1.7.3.1 Glutasyon S-transferaz.....	18
1.7.3.2 Glutasyon redüktaz.....	18
1.7.3.3 Katalaz.....	19
1.7.3.4 Karboksilesteraz.....	19
1.7.3.5 Asetilkolinesteraz.....	19
1.7.3.6 Malondialdehit.....	19
2. KAYNAK ÖZETİ.....	21
2.1 AMT ile İlgili Çalışmalar.....	22
2.2 Nanoparçacıklar ile İlgili Biyobelirteç Çalışmaları.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1 Test edilen Nanoparçacıklar.....	26
3.2 Test Organizmalarının Sağlanması.....	27
3.3 Amfibi metamorfoz testi.....	27
3.4 Biyokimyasal Analizler.....	30
3.4.1 Tüm vücut homojenatlarının hazırlanması.....	30
3.4.2 Tiroit hormon analizi.....	30
3.4.3 Diğer biyobelirteçlerin analizi.....	31
3.4.3.1 GST aktivitesi.....	31
3.4.3.2 GR aktivitesi.....	32
3.4.3.3 CAT aktivitesi.....	32

3.4.3.4	CaE aktivitesi.....	32
3.4.3.5	AChE aktivitesi.....	32
3.4.3.6	MDA düzeyi.....	33
3.4.3.7	Toplam protein miktarı tayini.....	33
3.5	Test Çözeltilerinde Bazı Fiziko-kimyasal Parametrelerin Saptanması.....	33
3.6	İstatistiksel analiz ve hesaplamalar.....	34
4.	BULGULAR.....	35
4.1	Fiziko-kimyasal Bulgular.....	35
4.2	Fe ₂ O ₃ NP'ler ile İlgili Bulgular.....	36
4.2.1	Fe ₂ O ₃ NP'ler ile ilgili gelişim bulguları.....	36
4.2.2	Fe ₂ O ₃ NP'ler ile biyobelirteç bulguları.....	39
4.3	ZnO NP'ler ile İlgili Bulgular.....	41
4.3.1	ZnO NP'ler ile ilgili gelişim bulguları.....	41
4.3.2	ZnO NP'ler ile biyobelirteç bulguları.....	43
4.4	CeO ₂ NP'ler ile İlgili Bulgular.....	45
4.4.1	CeO ₂ NP'ler ile ilgili gelişim bulguları.....	45
4.4.2	CeO ₂ NP'ler ile biyobelirteç bulguları.....	47
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
5.1	Fe ₂ O ₃ NP Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler.....	49
5.2	ZnO NP Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler.....	51
5.3	CeO ₂ NP Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler.....	54
	KAYNAKLAR.....	57
	ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	<i>Xenopus laevis</i> 'in sistematikteki yeri.....	9
Çizelge 3.1	Nieuwkoop and Faber'e göre belirgin morfolojik evrelendirme parametreleri.....	28
Çizelge 3.2	Amfibi Metamorfoz Testi için uygulanan deneysel koşullar	29
Çizelge 4.1	AMT'ler süresince ortamların sıcaklık, iletkenlik ve pH değerleri.....	36
Çizelge 4.2	AMT kapsamında Fe ₂ O ₃ NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının gelişim özellikleri	38
Çizelge 4.3	AMT kapsamında Fe ₂ O ₃ NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının biyobelirteç düzeyleri.....	40
Çizelge 4.4	AMT kapsamında ZnO NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının gelişim özellikleri.....	42
Çizelge 4.5	AMT kapsamında ZnO NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının biyobelirteç düzeyleri.....	44
Çizelge 4.6	AMT kapsamında CeO ₂ NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının gelişim özellikleri.....	46
Çizelge 4.7	AMT kapsamında CeO ₂ NP'lere maruz bırakılan <i>X. laevis</i> embriyolarının biyobelirteç düzeyleri.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	NP toksisitesine bir örnek olarak Ag NP'lerin hücreye giriş yolları ve sitotoksosite mekanizmaları	6
Şekil 1.2	NP'lerin toksisitesini etkileyen faktörler.....	8
Şekil 1.3	Dişi ve erkek <i>Xenopus laevis</i> kurbağaları ve yumurtaları.....	11
Şekil 1.4	Metamorfoz aşamaları: Premetamorfoz, prometamorfoz ve metamorfik klimaks.....	12
Şekil 1.5	AMT'de iribaşların kullanımı ve gelişim aşamaları	13
Şekil 1.6	Tiroit hormon yoluna ve düzenlenmesine genel bakış.....	15
Şekil 1.7	Kurbağa postembriyonik gelişimi sırasında tiroit hormonu (TH) seviyeleri ve anahtar morfolojik özellikler.....	16
Şekil 1.8	Tiroit hormonları.....	17
Şekil 3.1	Test edilen nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri	26
Şekil 3.2	AMT'de kullanılacak <i>Xenopus laevis</i> iribaşlarının görünümü.....	28
Şekil 3.3	Tiroit hormon düzeylerinin ölçümünde uygulanan yöntem şeması.....	31
Şekil 4.1	AMT'de kullanılan 51. evre iribaşlarının stereo mikroskop altında farklı aydınlatmalardaki görüntüsü.....	36
Şekil 4.2	AMT'de 7 ve 21 günlük uygulamalarda yaygın görülen gelişim evreleri.....	37
Şekil 5.1	Yedi günlük Fe ₂ O ₃ uygulamasında GST ve MDA düzeyleri.....	51
Şekil 5.2	Yedi ve yirmi bir günlük ZnO uygulamalarında GST, GR ve CAT düzeyleri.	53
Şekil 5.3	Yedi günlük CeO ₂ uygulamasında GR, MDA ve CaE düzeyleri.....	56

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
AMT	Amfibi Metamorfoz Testi
ASTM	Amerikan Standartları Enstitüsü
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CRH	Kortikotropin salgılatıcı hormon(CRH, TRH,
DTNB	5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
EBK	Endokrin bozucu kimyasal
FETAX	Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi- <i>Xenopus</i>
GnRH	Gonadotropin-salgılatıcı hormon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH_{red}	Redükte glutasyon
GS-SG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
HHT	Hipotalamus-Hipofiz-Tiroit
LC₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
LPO	Lipid peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MS222	Trikain metansülfonat
NADP⁺	Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF	Nieuwkoop ve Faber
NM	Nanomalzeme
NP	Nanoparçacık
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
ROT	Reaktif oksijen türleri
SH	Standart hata
SOD	Süperoksit dismutaz
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
TH	Tiroit hormonu
tGSH	Toplam glutasyon
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
TSH	Tiroit Uyarıcı Hormon
TTR	Transtiretin
USEPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı
XETA	<i>Xenopus</i> Eleutheroembriyo Tiroit Testi

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI NANOPARÇACIKLARIN SUBAKUT TOKSİSİTESİ VE ENDOKRİN BOZUCU ETKİLERİNİN AMFİBİ METAMORFOZ TESTİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Eren ARSLAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

66+IX sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Abbas GÜNÖRDÜ

Günümüzde nanomateryal kullanılan ve kullanılması öngörülen teknolojilerin sayısı hızla artmaktadır. Bu maddelerin olası olumsuz etkilerinin değerlendirilmesi için teknolojik kullanım ve üretim ile paralel olarak maddelerin toksik etkilerinin hızla ve eş zamanlı değerlendirilmesi zaruri hale gelmiştir. Bu çalışmada CeO_2 , Fe_2O_3 , ZnO nanoparçacıklarını (NP) subletal konsantrasyonlarına (0.001-1 mg/L) maruz bırakılan metamorfoz dönemi kurbağa iribaşlarında, toksik ve endokrin bozucu etkiler değerlendirildi. Çalışmada Amfibi Metamorfoz Testinde öngörülen şekilde NP'lere 21 gün süreyle maruz bırakılan 51. evre *Xenopus laevis* iribaşlarında gelişimsel ve biyokimyasal belirteç düzeyleri belirlendi. Belirtilen organizmalarda maruz kalma sonrası letalite düzeyi ve gelişim aşamaları, vücut, burun-vent ve arka bacak uzunlukları ölçüldü. Ayrıca, iribaşlarda glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) karboksilesteraz, asetilkolinesteraz enzimlerinin aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve tiroit hormon düzeyleri belirlendi.

En düşük Fe_2O_3 NP konsantrasyonuna 21 gün süreyle maruz bırakılan iribaşlarda büyüme evresi açısından gerilik, yaş vücut ağırlığı bakımından ise artış belirlendi. 7 günlük Fe_2O_3 uygulamasında GST inhibisyonu ve MDA düzeyinde artış gerçekleşti. ZnO NP'lere maruz bırakılan iribaşlarda 1 mg/L konsantrasyonu gelişim geriliğine ve GST, GR ve CAT indüksiyonuna neden oldu. Test edilen hiçbir CeO_2 NP konsantrasyonu letal değilken, 0.001 ve 1 mg/L CeO_2 NP konsantrasyonları iribaşlarda sırasıyla arka bacak uzunluğunda artışa ve GR inhibisyonuna neden oldu. Belirtilen enzim aktivitelerinin indüksiyonu, organizmaların güvenli olmayan bir ortama maruz kalmaktan kaynaklanan stresle baş etmeye yönelik bir adaptasyonu olarak düşünülmektedir. Enzim inhibisyonunu ise NP'lerle veya neden oldukları reaktif oksijen türleri ile etkileşim nedeniyle olabilir. Elde edilen veriler ışığında, NP'lerin düşük konsantrasyonlarına uzun süreli maruziyetin iribaşlarda toksik ve endokrin bozucu etkilere neden olabileceği sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Nanoparçacık, toksisite, *Xenopus laevis*, Amfibi Metamorfoz Testi

ABSTRACT

Master Thesis

THE EVALUATION OF SUBACUTE TOXICITY AND ENDOCRINE DISRUPTING EFFECTS OF SOME NANOPARTICLES BY AMPHIBIAN METAMORPHOSIS TEST

Eren ARSLAN

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Biology

66+IX pages

2021

Supervisor: Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ

Today, the number of technologies that use nanomaterials and are predicted to be used is increasing rapidly. To evaluate the possible negative effects of these substances, it has become necessary to evaluate the toxic effects of the substances rapidly and simultaneously in parallel with technological use and production. In this study, toxic and endocrine-disrupting effects were evaluated in metamorphic frog tadpoles exposed to sublethal concentrations (0.001-1 mg/L) of Fe₂O₃, ZnO CeO₂ nanoparticles (NP). In the study, developmental and biochemical marker levels were determined in 51st stage *Xenopus laevis* tadpoles exposed to NPs for 21 days as predicted in the Amphibian Metamorphosis Test. Post-exposure lethality and developmental stages, body, nose-vent, and hind limb lengths were measured in the indicated organisms. In addition, the activities of glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) carboxylesterase, acetylcholinesterase enzymes, and malondialdehyde (MDA) and thyroid hormone levels were determined in tadpoles.

In tadpoles exposed to the lowest Fe₂O₃ NP concentration for 21 days, retardation in the growth stage and increase in wet body weight was determined. In 7 days of Fe₂O₃ exposure, GST inhibition and MDA level were increased. In tadpoles exposed to ZnO NPs, a concentration of 1 mg/L caused growth retardation and induction of GST, GR, and CAT. While none of the CeO₂ NP concentrations tested were lethal, the 0.001 and 1 mg/L CeO₂ NP concentrations caused an increase in hind limb length and GR inhibition in tadpoles, respectively. The induction of the indicated enzyme activities is thought to be an adaptation of organisms to cope with stress from exposure to an unsafe environment. Enzyme inhibition may be due to interaction with NPs or the reactive oxygen species they cause. In the light of the data obtained, it can be concluded that long-term exposure to low concentrations of NPs may cause toxic and endocrine-disrupting effects in tadpoles.

Keywords: Nanoparticle, toxicity, *Xenopus laevis*, Amphibian Metamorphosis Assay

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, ekonomik ve bilimsel ilginin giderek artması nedeniyle hızlı gelişim sergileyen bir bilim alanıdır. Son yıllarda nanomateryallerin (NM) önemli optik, elektriksel ve manyetik özellikleri belirlenmekte, yeni nano-malzemeler üretilmekte ve bu materyaller iletişim, enerji depolanması, veri depolama, optik, iletim, çevre koruma, kozmetik, biyoloji ve tıp alanlarında kullanılmaktadır (Baig ve diğ, 2021; Chen ve Mao, 2007). Örneğin, karbon siyahı ve sentetik amorf silis on yıllardır üretilmekte ve lastik üretiminden gıda üretimine kadar geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Üretilen yeni nesil NM'ler ise kanser ilaçlarında, elektrikli arabaların lityum-iyon pillerinde ve güneş panellerinde kullanılmaya başlanmıştır. Avrupa Komisyonu 2011 yılı Tavsiye Raporuna göre 2009'dan 2015'e kadarki dönemde nanoteknoloji tarafından desteklenen ürünlerin 200 milyar avro ile global bir hacme ulaşacağı öngörülmüştür (EC, 2012). Belirtilen Komisyon Raporunda Avrupa'da NM sektöründe doğrudan istihdam edilen kişi sayısı 300000-400000 olarak öngörülmüştür. Diğer yandan ABD'deki nanoteknoloji pazarının 2021 yılında 13.2 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir. Dünyanın en büyük ikinci ekonomisi olan Çin'in 2026 yılına kadar 5.1 milyar ABD doları olarak öngörülen pazar büyüklüğüne ulaşacağı tahmin edilmektedir. Nanoteknoloji alanında diğer dikkate değer pazarlar arasında, her birinin sırasıyla %8.1 ve %9.4 oranında büyüyeceği tahmin edilen Japonya ve Kanada pazarları bulunmaktadır. Avrupa'da ise Almanya'nın yıllık büyüme oranının yaklaşık %8.2 olması beklenmektedir (ReportLinker, 2021).

Nanomateryaller, küçük parçacık boyutları nedeniyle spesifik özelliklere sahip materyaller olarak tanımlanmaktadır (EC, 2012). Bu materyal grubundan olan ve 1 ile 100 nm arasında en az iki boyuta sahip malzemeler ise nanoparçacık (NP) olarak isimlendirilmektedir (Klaine ve diğ, 2008). NP'ler, bulk (hacimli) muadillerinden farklı olarak, küçük parçacık boyutları nedeniyle yüksek yüzey-hacim oranına sahiptirler. Parçacık boyutu küçüldüğü için parçacıkların yüzeyinde çok sayıda atom bulunabilmekte ve bu da parçacıkları daha reaktif hale getirmektedir (Vaseem ve diğ, 2010). Küçük parçacık boyutuyla sağlanan yüksek yüzey alanı, cihazlar ve etkileşen ortam arasındaki

reaksiyonu/etkileşimi kolaylaştırdığı için NP tabanlı cihazlar için yararlı olmaktadır (Chen ve Mao, 2007).

Çevreye ve insan sağlığına potansiyel etkileri konusunda araştırmalar ve tartışmalar devam ettiği halde, tüketicilerin kullanımına sunulan NP içerikli ürünlerin sayısı giderek artmaktadır. Giderek genişleyen ve büyük ekonomik çıkarların olduğu bu pazar nedeniyle, toksisite verileri bulunmayan NP'lerin üretilmesi ve kullanıma sunulmasının, maruz kalan çevre ve insan üzerinde olumsuz etkileri olacağı öngörülmektedir (Bacchetta ve diğ, 2012). Yapılan birçok çalışma bu ürünlerin yüksek konsantrasyonlarda bile kısa süreli maruz kalma durumlarında toksik olmadıkları, bazı maddelerin ise toksik yanıtlara neden oldukları yönündedir. Ancak bu maddelerin uzun vadede yol açacakları olumsuz etkiler, yapılan çalışma sayısının azlığı nedeniyle, veri eksikliğinden dolayı belirsizliğini korumaktadır.

1.1 Endokrin Bozucu Kimyasallar

NM'ler de dahil olmak üzere yerel ve küresel ölçekli üretilen kimyasalların kullanıma sunulmadan önce ve kullanımdan sonra, canlılar ve ekosistemler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için çok sayıda bilimsel araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğunluğu akut etkilerin belirlenmesine yönelik olup görece yüksek konsantrasyondaki kimyasalların yarattığı letal veya subletal etkileri belirlemeye dönüktür. Diğer yandan kronik çalışmalarda ise maddenin canlıda veya ekosistemde bulunabilecek konsantrasyonlarından hareketle, maruz kalma süresi ve şekli de dikkate alınarak uzun vadeli etkiler değerlendirilmektedir.

Toksik etkilerin yanı sıra bazı kimyasalların düşük konsantrasyonlarda bile canlıların endokrin sistemleri üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu tespit edilmiştir (Iwamuro ve diğ, 2003). Bu maddeler endokrin bozucu kimyasallar (EBK) olarak adlandırılmış ve bu yönde yapılan çalışmaların sayısında dikkate değer artış gözlenmiştir. Bu konudaki ilk çalışmalar eşey hormonlarının etkilerini taklit ederek olumsuz etkilere neden olan kimyasal maddelere odaklanmış iken sonraki çalışmalar tiroit hormonları gibi diğer hormon aktiviteleri üzerindeki etkilerin değerlendirilmesine yöneliktir. EBK'lerin tiroit hormon (TH) aktivitelerini etkilemeleri, TH'lerin büyüme, gelişim, metabolizma ve üremenin düzenlenmesinde oynadığı hayati rol nedeniyle dikkate değerdir (Opitz ve diğ, 2006).

Kanıtlar, çevresel kirleticilerin insanlarda ve doğal yaşamda endokrin bozucular olarak hareket edebildiğini göstermektedir. Çevrede EBK'lerin etkisi, küresel olarak azalan amfibiler için özel bir endişe kaynağıdır. Son derece geçirgen bir deriye sahip olmanın yanı sıra (amfibileri kimyasal kirletici maddelere karşı özellikle savunmasız kılar), amfibiler su ortamındayken hormonlar tarafından düzenlenen kritik gelişim aşamalarından geçerler. Yaşam döngülerinin bu önemli dönemlerini EBK'lerle kirlenmiş habitatlarda geçirmelerinin bireyler ve popülasyonlar üzerinde önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir (Hayes ve diğ, 2006).

EBK'lerin TH aktivitelerini bozma potansiyelleri, onlarla ilgili yasal düzenlemelerin yapılması için önemli bir neden haline geldiğinden, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) (OECD, 2009) ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (USEPA) (EPA, 2019) tarafından olası endokrin bozucuları belirleme ve test etmek için Afrika Tırnaklı Kurbağası (*Xenopus laevis*) iribaşlarından ve kurbağa metamorfozundan yararlanılan test sistemleri geliştirilmiştir (Miyata ve Ose, 2012).

1.2 Nanoparçacıklar

NP'ler, yarı iletkenlik özellikleri nedeniyle, redoks reaksiyonları için katalizör olarak sıklıkla kullanılan, endüstriyel açıdan önemli NM'lerdir (Zhang ve diğ, 2012). Dünya çapında çok sayıda metal oksit NP üretilmektedir. Örneğin TiO₂'nin yıllık üretim düzeyi 10,000 ton iken FeO ve ZnO NP'lerin üretim düzeyi yıllık 100 ile 1000 ton arasındadır (Piccinno ve diğ, 2012). Metal oksit NP'ler, hem tekli (ZnO, TiO₂, CeO₂, CrO₂, MoO₃, Bi₂O₃) ve hem de ikili oksitler (BaTiO₃, LiCoO₂, InSnO) şeklinde olabilmektedir (Klaine ve diğ, 2008). Metal oksit NP'lerin (örneğin TiO₂, CeO₂ ve ZnO) fotokatalitik özellikleri de çok iyi bilinmektedir (Haynes ve diğ, 2017). Buna bağlı olarak endüstriyel ve çevresel uygulamalarda en yaygın kullanılan malzemeler arasına girmekte, çok farklı amaçlar için NP'lerin fotokatalitik yetenekleri değerlendirilmektedir.

1.3 Çalışma Kapsamında Toksik Etkileri Test Edilen Nanoparçacıklar ve Kullanım Alanları

NP'ler 100 nm'den daha küçük boyutlu olup, bu parçacıkların eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmaları, onları ticari ürünlerde, askeri ve tıbbi amaçlar için cazip hale getirmektedir (Bour ve diğ, 2015). Diğer yandan hem üretim sektöründe hem de

tüketime yönelik yaygın kullanımlarına karşın bu maddelerin çoğu için toksisite ile ilgili veri eksiktir.

1.3.1 Demir oksit nanoparçacıklar (Fe₂O₃ NP)

Demir oksit NP'lerden manyetit (Fe₃O₄) ve hematit (Fe₂O₃) birçok önemli biyomedikal ve endüstriyel uygulamada (örneğin kanser tedavisinde, ilaçların hedeflerine ulaştırılmasında, manyetik rezonans görüntüleme, hücre ayırımında ve elektronik cihazlarda) kullanılan önemli NP'lerdir (Seabra ve Haddad, 2014). Fe₂O₃ NP'lerin canlı organizmalara aktif veya pasif yollardan girebildiği ve belirli bir süre boyunca maruz kalmanın, farklı organ ve dokularda demir birikimine neden olduğu rapor edilmiştir. Bu NP'lerin toksisitesinin, NP boyutu, boyut dağılımı, yüzey morfolojisi, yüzey yük yoğunluğu, kaplama maddesinin kimyasal yapısı, konsantrasyonu, hücre tipleri ve maruz kalma yolları gibi çeşitli etkenlere bağlı olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri göz önüne getirmek ve bu umut verici NP'lerin güvenli bir şekilde kullanılmasını önermek için bunların hücreler, dokular, organlar ve organizmalar üzerindeki etkisinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Seabra ve Haddad, 2014).

1.3.2 Çinko oksit nanoparçacıklar (ZnO NP)

ZnO NP'ler, son yıllarda çok sayıda endüstriyel süreçte ve endüstriyel ürünün üretiminde (ör. plastikler, seramik, cam, çimento, kauçuk, boyalar, pigmentler, gıdalar ve piller gibi) kullanılmaktadır. Yüksek morötesi radyasyon emiliminden ötürü, ZnO NP'ler güneş kremi, diş macunu ve kozmetik malzemeleri gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Lopes ve diğ, 2014). Buna ek olarak, bu NP'ler, bakterilere karşı seçici toksisitesi nedeniyle su dezenfeksiyonu için potansiyel materyallerden biri olarak düşünülmektedir (Ates ve diğ, 2013). Ayrıca, benzersiz bakteriyostatik ve fungusidal özellikleri, boyalarda ve hatta gıda paketlemesinde kullanılmalarını sağlamaktadır (Connolly ve diğ, 2016). ZnO NP'lerin çözünürlüğü, bu NP'lerin toksisitesi ve ekosistem üzerindeki etkileri için çok önemlidir. Ayrıca, yüksek kararlılıkları ZnO NP'lerin organizmalara nüfuz etmesine ve organizmada birikmesine yol açmaktadır (Ates ve diğ, 2013; Choi ve diğ, 2016).

ZnO NP'ler, kozmetik, güneş pilleri, pigmentler, elektronik ve tekstilde yaygın kullanımları nedeniyle dünya çapında üçüncü en yüksek NP üretim oranlarına sahiptir (tahminler 550 ila 10 000 ton/yıl arasında değişmektedir) (Wu ve diğ, 2019a). ZnO

NP'lerin üretimindeki artışın ve yaygın olarak kullanılmasının bir sonucu olarak, çevreye salınma, ekosistemleri ve insanları etkileme potansiyelleri giderek artmaktadır.

1.3.3 Seryum oksit nanoparçacıklar (CeO₂ NP)

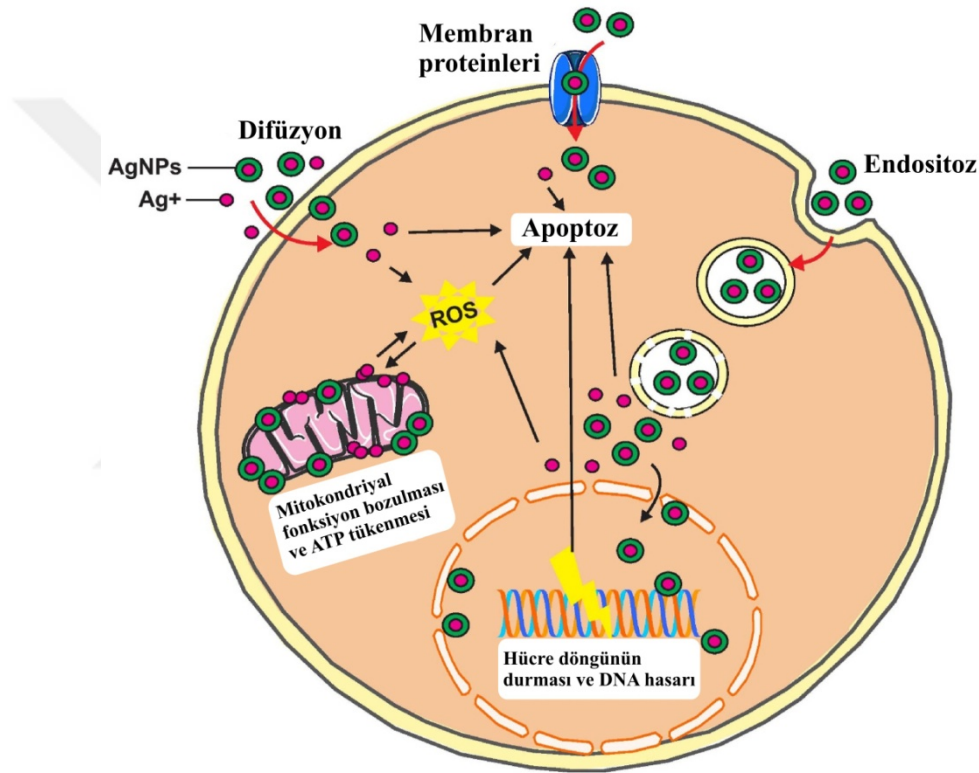
Ceria veya seryum dioksit olarak da bilinen Seryum (IV) oksit, toprakta nadir bulunan bir metal olan seryumun bir oksitidir. CeO₂ NP'ler, Ce (III) ve Ce (IV)'ün değerlik durumlarına bağlı olarak, yakıt katkı maddelerinde, güneş pillerinde ve diğer çok sayıda farklı endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Bu NP'lerin reaktif oksijen türlerinin (ROT) temizlenmesindeki eşsiz yeteneği, onları biyotıp alanında ve ilaçların hedef bölgeye ulaştırılması ile ilgili çalışmalarda ümit verici hale getirmektedir (Wu ve diğ, 2019b). Öte yandan, bu NP'lerin yüzey sularında giderek arttığı, Avrupa yüzey sularında tahmin edilen çevresel konsantrasyonun yaklaşık 0.76 ng/L olduğu bildirilmiştir (Sendra ve Blasco, 2018).

1.4 Nanoparçacıkların Toksikite Mekanizmaları

Canlılar, toz fırtınaları, volkanik kül ve diğer doğal kaynaklardan köken alan NP'lere sürekli olarak maruz kalmaktadır. Diğer yandan teknolojik gelişmeler, çevredeki nanoparçacık kirliliğinin özelliklerini değiştirmekte, böylece ekosistemlerde nano boyutlu parçacıkların miktarı ve kimyasalların çeşitliliği artmaktadır. NP'lerin boyutu, yüzey özellikleri, şekil, kimyasal bileşim ve sudaki aglomerasyonu gibi birçok faktör, NP'lerin organizmalara ve çevreye olan etkilerini belirlemektedir. Boyutlarından dolayı, NP'lerin çoğu biyolojik zarlara kolayca nüfuz edebilir ve hücrelerdeki belirli biyolojik moleküllere kolayca bağlanabilir veya bunları taklit edebilirler. NP'ler fiziksel hasar, toksik iyonların salınması ve ROT üretimi de dahil olmak üzere çeşitli yollardan hücresel toksisiteye neden olurlar (Şekil 1.1). Hücresel redoks dengesini değiştirerek ve hücresel hasara yol açarak organizmanın ölümüne neden olabilirler (Khan, 2020; Ozmen ve diğ, 2020).

Biyolojik zarlar, hücreleri çevreleyen ve koruyan seçici yarı geçirgen yapılardır. Membran yapısındaki proteinler, iyonların ve diğer maddelerin hücre içi ve hücre dışı hareketi için kanal görevi görebilirler. Membran taşıyıcıları ile hücre içine alınamayan büyük parçacıkların taşınması, endositoz ve ekzositoz ile sağlanabilir. Bu bağlamda, NP'lerin bir sucul ekosistemdeki organizmalar üzerindeki toksisite mekanizmasını belirlemek için endositoz ve ekzositoz mekanizmasını anlamak önemlidir. NP'lerin tanecik boyutunun toksisiteye etkisini belirlemek için aynı maddenin nano boyutlu olan ve

olmayan muadillerinin (yani, ZnO/bulk, TiO₂/bulk ve Al₂O₃/bulk) sucul organizmalar üzerine etkileri karşılaştırılmaktadır (Genix ve Oberdisse, 2018). Aynı ayrı dağılmış NP'ler hücre membranından kolaylıkla geçebilirken kümelenmiş hallerinin membran bariyerinden taşınması nispeten zor olabilmektedir (Joo ve diğ, 2013). Bununla birlikte, araştırmalar bazı metallerin hacimli ve nano ölçekli parçacıklarının toksisite seviyeleri arasında hiçbir fark olmadığını göstermiştir. Diğer yandan, ZnO'nun hem hacimli hem de NP formlarının zebra balıklarında embriyo ve larva gelişimi için eşit derecede toksik olduğu, embriyoların hayatta kalma ve yumurtadan çıkma oranlarını azalttığı ve gelişim sırasında doku hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Zhu ve diğ, 2008).



Şekil 1.1: NP toksisitesine bir örnek olarak Ag NP'lerin hücreye giriş yolları ve sitotoksosite mekanizmaları (Nikzamid ve diğ, 2021)

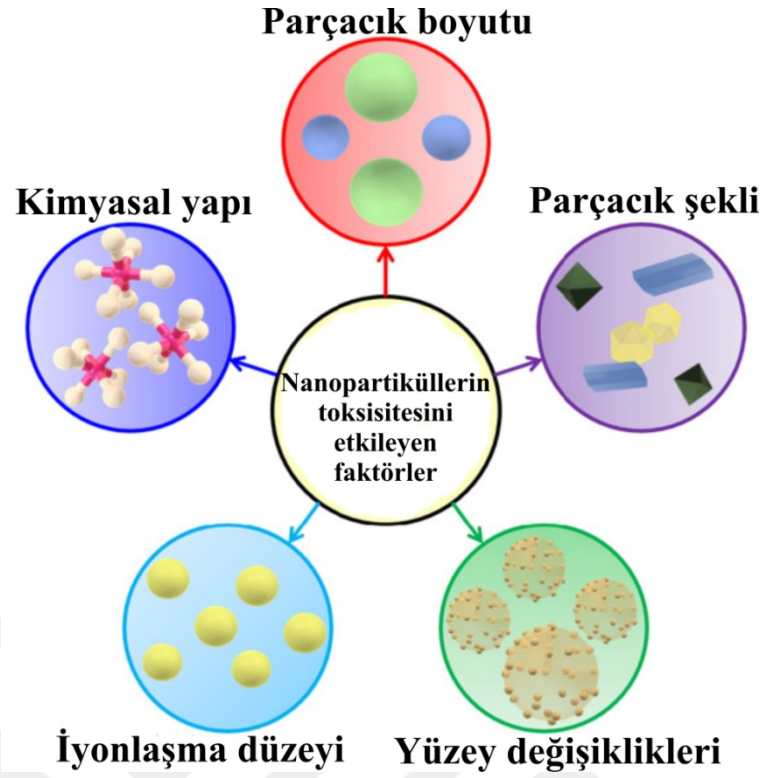
Membran Hasarı: NP'ler doğrudan hücre zarında veya hücreye alınmaları esnasında akut toksik reaksiyona neden olabilirler. Bunda yüksek yüzey alanlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Yüksek yüzey alanı nedeniyle NP'lerin hücre zarlarına hasarı ve zarları aşındırıcı etkisi, hücre içeriğinin sızmasına ve sonuçta hücrenin ölümüne sebep olur (Stoimenov ve diğ, 2002). Yüksek konsantrasyonlarda Ag ve ZnO NP'lerin bakteriyel hücre zarı hasarına neden olduğu bilinmektedir (Morones ve diğ, 2005). Tek hücreli organizmalarda hücre zarı hasarı daha belirgindir (Wiesner ve diğ, 2006)

Toksik çözünmüş türlerin salınımı: NP'lerin yüzeyinden çözünmüş metal iyonlarının salınması toksik etkilere neden olabilmektedir. Yavaş yavaş çözünen NP'ler doğada yüksek konsantrasyonda iyon kaynağı haline gelebilirler. Sonuç olarak, ana kaynağa yakın olan hücreler daha uzak olan hücelere kıyasla daha yüksek bir metal konsantrasyonuna maruz kalırlar. Bazı metaller çok az miktarda dahi aşırı toksik etkiler gösterebilir. Örneğin; Cu ve Zn düşük konsantrasyonlarda dahi son derece zararlı olabilir. Bu sebeple suda yaşayan organizmalar için NP'ler çok toksiktir (Santore ve diğ, 2001). ZnO çözünmemesinin ayrıca insan mezotelyoma ve kemirgen fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Brunner ve diğ, 2006).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi: NP'ler, geniş yüzey alanı/hacim oranı başta olmak üzere fizikokimyasal özelliklerinden dolayı peroksitler, oksijen iyonları ve serbest oksijen radikalleri gibi ROT'leri üretmek için büyük bir yeteneğe sahiptir (Oberdorster ve diğ, 2005). ROT, oksidatif strese yol açan farklı mekanizmalar yoluyla hücrelerle etkileşime girebilir. Hücre içinde oksidasyona yatkın olan yağlar, proteinler, nükleik asitler gibi hücre yapıtaşlarıyla etkileşime girerek organellere ve DNA'ya zarar verip, oksidatif strese ve hücrede fonksiyon kayıplarına neden olurlar (Fahmy ve Cormier, 2009)

1.5 Nanoparçacıkların Fizikokimyasal Özelliklerinin Toksikiteye Etkisi

Hücre kültürlerinde ve çeşitli hayvan deneyleriyle NM'lerin toksisitesini inceleyen çalışmalar, boyut, şekil, yüzey kimyası, çözünlülük gibi faktörlerin, NM'lerin toksisite potansiyeli üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Şekil 1.2) (Khan, 2020; Maynard ve diğ, 2006; Ozmen ve diğ, 2020).



Şekil 1.2: NP'lerin toksisitesini etkileyen faktörler (Aguilar-Perez ve diğ, 2021)

1.5.1 Boyutun etkisi

Üretilen NP'lerin boyutu, 1 ila 100 nm arasında değişir ve bu boyut canlı hücrelerin boyutlarına kıyasla (tipik olarak 1-10 μm çapında) çok küçüktür. Nano ölçekli boyutlar NP'lere daha büyük yüzey alanı, farklı fiziksel özellikler ve büyük ölçekli maddelere kıyasla reaktivitede artış gibi özellikler kazandırır. Örneğin, boyut 100 nm'nin altına düştüğünde, yüzey alanı katlanarak artar. Aynı malzemenin aynı kütlesi için, daha büyük parçacıklarıyla karşılaştırıldığında hücrelerle etkileşime giren moleküllerin sayısı daha yüksek olacaktır. Parçacık boyutunun NP toksisitesinde rol oynadığı ve parçacık boyutunun azalmasının bazı Ag ve Au NP'ler için toksik etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (Chen ve diğ, 2009). Bununla birlikte, "daha küçük, daha toksik" olarak bir genelleme yapılamaz. Bazı malzemelerin NP'leri boyut azaldığında daha toksik olabileceği gibi, bazı durumlarda da toksisite boyut arttıkça artabilir. Örneğin, daha büyük parçacıkların toksik olmadığı Au NP'lerin aksine, 100 nm boyutlu TiO_2 NP'lerin 15 nm boyutlulara kıyasla apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Bauer ve diğ, 2009).

1.5.2 Yüzey yükünün etkisi

Yüzey özellikleri, özellikle hücresel membranlarda, biyoaktif bileşiklerle elektrostatik etkileşimleri belirleyebilir (Ozmen ve diğ, 2020). NP'lerin hücre içi alımı, hücre tipinin yanı sıra yüzey yükü gibi parçacık yüzey özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Artan yüzey yüklerinin, yüksüz NP'lere kıyasla parçacık alımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, birçok metalin iyonik formları, oksitlenmiş formlardan daha yüksek toksik etkilere sahiptir. Bununla birlikte, NP'lerin iyonik formlarının daha yüksek toksisitesi ile ilgili konu tam olarak anlaşılammıştır. Örneğin, yüklü Au NP'ler nötr formlarından daha toksiktir (Oh ve diğ, 2010). Genel olarak, pozitif yüklü NP'lerin daha yüksek bir sitotoksositeye neden olduğu bildirilmektedir. Örneğin, pozitif yüklü ZnO NP'ler, fagositik olmayan hücreler üzerinde negatif yüklü varyantlarından daha fazla sitotoksosite gösterebilmektedir. Daha önce, katyonik NP'lerin, hücre zarı bileşimi üzerindeki kararsızlaştırıcı etkileri, mitokondriyal ve lizozomal işlevi bozmaları ve otofagozom oluşumunu indüklemeleri açısından anyonik NP'lerden daha güçlü olduğu bildirilmiştir (Frohlich, 2012).

1.5.3 Şeklin etkisi

NP'ler, çubuklar, küreler, elipsoitler, silindirler, küpler, üçgen, altıgen vb. gibi birçok farklı şekilde bulunur. NP'lerin şekli de biyolojik yanıtı etkileyen kritik bir faktördür. NP'lerin biyolojik engelleri aşma kabiliyetinin, NP'lerin hücrelere girme mekanizmasının, döngü süresinin, hedefleme etkisinin kısmen NP'lerin geometrisine bağlı olduğu bildirilmektedir. Örneğin Jiang ve diğ, (2008) küresel Au NP'lerin, benzer boyuttaki çubuk şeklindeki Au NP'lere kıyasla HeLa hücreleri tarafından alınma eğiliminin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Dal şeklindeki NP'lerin daha yüksek toksisitesinin, hücrelere daha uzun süre tutunma ve tutma yetenekleri ile ilişkilendirilmektedir (Khan, 2020).

1.5.4 Çözünürlüğün etkisi

Hücrelere alınan bazı metal oksit NP'ler metal iyonları sağlayan bir kaynak görevi görür ve sürekli olarak metal iyonlarını sitoplazmaya bırakır. Metal iyonlarının salınımı, çözünürlüğüne ve çözünme hızına bağlıdır. Metal oksit NP'lerin bazıları düşük çözünürlük gösterebilir, ancak yine de fizyolojik ortamda önemli ölçüde toksisiteye neden olabilir. Örneğin, 1g/L ZnO NP, 10 mg/L çözünmüş çinko, yani %2 çinko oksit çözeltisi verecektir,

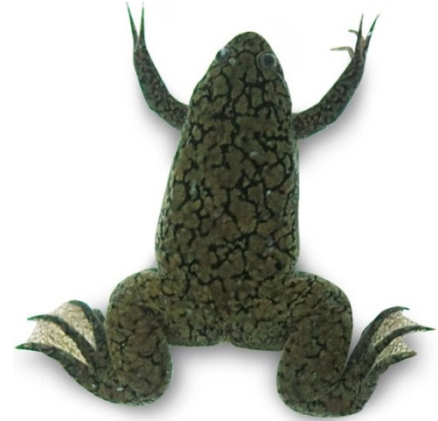
ancak bu konsantrasyon sudaki organizmaların çoğunu öldürecek kadar zehirlidir (Khan, 2020).

1.6 Çalışmada Kullanılacak Test Organizması, *Xenopus laevis*

Bu çalışmada test organizması olarak *Xenopus laevis* iribaşları kullanıldı. *X. laevis*, Sahra-Altı Afrika'da, Nijerya'dan Sudan'a kadar farklı alanlarda, özellikle durgun göllerde yaygın olarak bulunan bir anura türüdür (Çizelge 1.1). Bu tür, laboratuara iyi adapte edilmiş (amfibi organizmalar için emsalsizdir) ve biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir türdür. Embriyoları ve iribaşları, teratojenite ve gelişim inhibisyonu ile ilgili toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir test organizmasıdır (Ge ve diğ, 2021; Prati ve diğ, 2000). Bu kurbağa türü kullanılarak çeşitli çevresel kirleticilerin, canlıların gelişim evreleri üzerindeki etkileri test edilebilmekte ve aynı zamanda sucul ekosistemler üzerinde kirleticilerin etkileri değerlendirilebilmektedir (Bacchetta ve diğ, 2012; Güngördü, 2013; Tamschick ve diğ, 2016; Wu ve diğ, 2018; Xu ve diğ, 2021).

Çizelge 1.1: *Xenopus laevis*'in sistematikteki yeri

Kategori	Takson	Otör
Regnum	Animalia	
Subregnum	Bilateria	
İnfraregnum	Deuterostomia	
Filum	Chordata	
Subfilum	Vertebrate	
İfracilum	Gnathostomata	
Superklasis	Tetrapoda	
Klasis	Amphibia	
Takım	Anura	
Familya	Pipidae	Gray, 1825
Genus	<i>Xenopus</i>	Wagler, 1827
Spesies	<i>Xenopus laevis</i>	Daudin, 1802

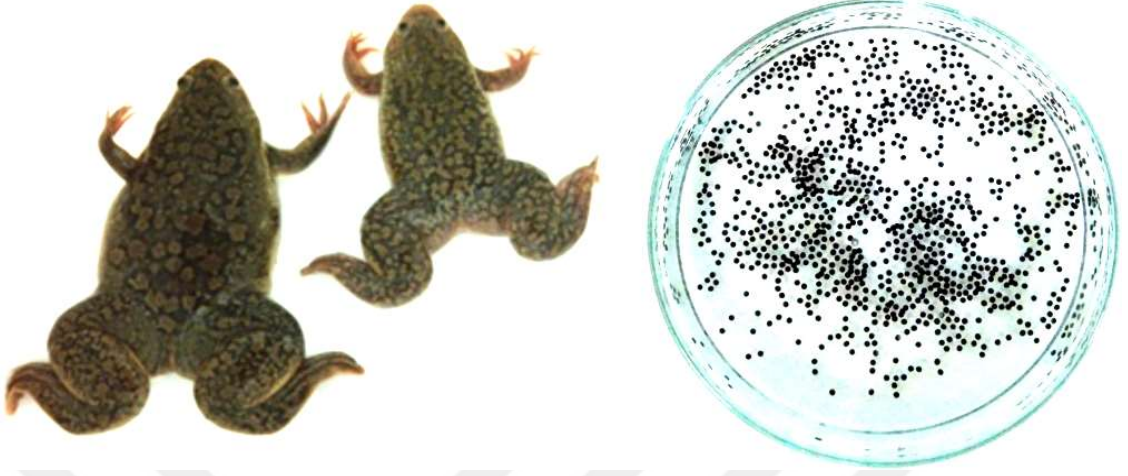


*: Belirtilen internet sitesinden alınmıştır (Son erişim: 6 Ekim 2020)

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=173549#null

Afrika tırnaklı kurbağası olarak da bilinen *X. laevis* ilk kez 1802 yılında Daudin tarafından keşfedilmiştir (Şekil 1.3). Keşfinden bugüne kadar çeşitli adlar verilmiştir. Bu hayvana garip ayak anlamına gelen *Xenopus* adı ilk kez Wagler (1827) tarafından verilmiştir. *X. laevis*'e genellikle Güney Afrika tırnaklı kara kurbağası adı verilse de, bunun kara veya su kurbağası olup olmadığı halen tartışmalıdır. Deri yapısından dolayı su

kurbağasına, çiftleşme özelliğinden dolayı da kara kurbağasına benzetilmektedir (Özgünen, 1994).



Şekil 1.3: Dişi ve erkek *X. laevis* kurbağaları ve yumurtaları

Xenopus laevis, Kurbağa Embriyo Teratogenez Testi-*Xenopus* (The frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*, FETAX), Amfibi Metamorfoz Testi (Amphibian Metamorphosis Assay, AMT) ve *Xenopus* Eleutheroembriyo Tiroit Testi (*Xenopus* Eleutheroembryo Thyroid Assay, XETA) testlerinde ksenobiyotiklerin gelişimsel, endokrin bozucu toksisitesini değerlendirmek için kullanılan test organizmasıdır (ASTM, 2003; Couderq ve diğ, 2020; OECD, 2009, 2019).

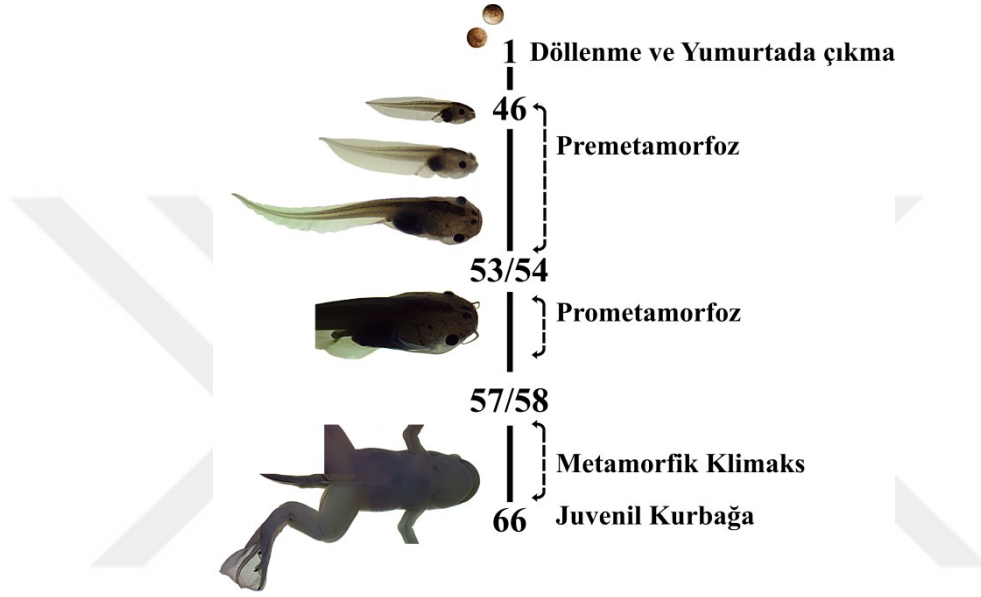
1.6.1 Kurbağa metamorfozu

Metamorfoz, hayvanlar aleminin birçok şubesinde (Phylum veya Filum) meydana gelir ve metamorfoz sonrası organizmaların habitat, morfoloji ve fizyolojilerinde değişiklikler görülebilir. Amfibilerde, deri, solunum organları, karaciğer, bağışıklık sistemi, beyin, omurilik, göz, burun, hipofiz, hematopoietik sistem ve iskelet sistemi dahil olmak üzere, yeni organlar, bu süreçte önceden var olan ve işlevsel kurbağa yavrusu organlarından yeniden modellenir (Brown ve Cai, 2007). Böylece, suda yaşayan iribaşlar tiroit hormon kontrolü altında metamorfoza uğrar ve karasal organizmalara dönüşür.

Kurbağa metamorfozu, premetamorfoz, prometamorfoz ve metamorfik klimaks olmak üzere üç gelişim döneminden oluşur (Şekil 1.4) (Miyata ve Ose, 2012).

- ✓ Pre-metamorfoz: Embriyogenez ve erken gelişim dönemlerini kapsar (yumurtanın döllenesinden 54. evreye kadar). Arka bacakların ortaya çıkmasına kadar geçen dönemdir. Bu dönemde tiroit hormonu ya yoktur ya da azdır.

- ✓ Pro-metamorfoz: Arka bacakların ayak parmaklarının farklılaşması ve ayakların hızlı gelişiminin gerçekleştiği evredir. Bu dönemde endojen TH düzeyi artar (55-57. evreler arası)
- ✓ Metamorfik klimaks: Bu dönemde radikal değişimler olur. Kuyruk ve solungaçlarda rezorpsiyon ve akciğer gelişimi meydana gelir. Larval karakterler hızlıca yok olur, kuyruk yıkımı başlar ve emilimle sonuçlanır. Yüksek TH düzeylerine ulaşılır (58-66. evreler arası).



Şekil 1.4: Metamorfoz aşamaları: Premetamorfoz, prometamorfoz ve metamorfik klimaks

Kurbağa iribaşları, ince, geçirgen bir deriye sahip olduklarından ve su ortamlarında yaşadıklarından, hem deri hem de beslenme yoluyla tarımsal, endüstriyel ve evsel faaliyetlerden kaynaklanan atık sulardaki çok sayıda toksik ve endokrin bozucu maddeye maruz kalırlar. Bu canlıların metamorfoz aşamasının TH'ler tarafından düzenlenmesi, bu aşamada larva dokularındaki çarpıcı yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinin, endokrin bozucu etkiyi yansıtan parametreler olarak kullanılmasını sağlamaktadır (Miyata ve Ose, 2012).

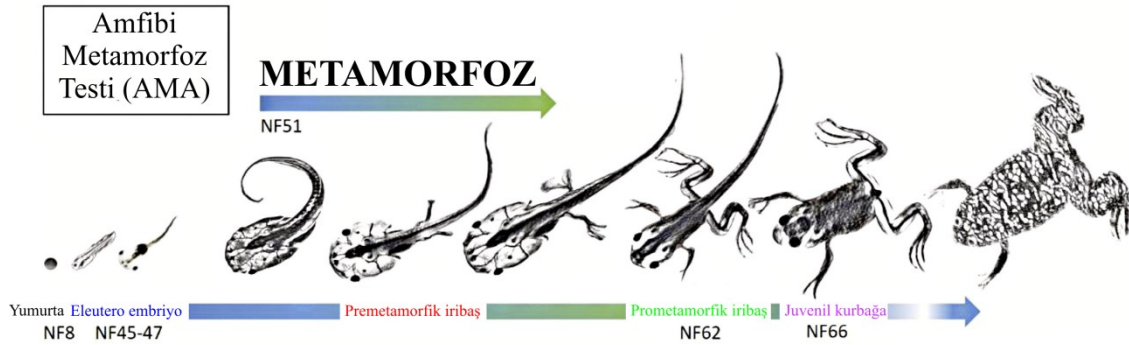
1.7 Çalışmada Yapılan Testler ve Biyokimyasal Analizler

1.7.1 Amfibi metamorfoz testi (AMT)

Tiroit hormonları (TH'ler), vücut büyümesi ve gelişimi ile üremede kritik rol oynar. Ayrıca, daha geniş çeşitlilikteki dokuların aktivitelerini ve osmoregülasyon, metabolizma

ve özellikle kurbağa gibi organizmalardaki metamorfoz gibi biyolojik fonksiyonları da etkilerler (Babalola ve diğ, 2020).

Günümüzde insanların yanı sıra yaban hayvanları üzerinde EBK'lerin etkileriyle ilgili bir endişe söz konusudur. Omurgalılarda TH sisteminin aktivitesini değiştiren çok sayıda kimyasal madde olduğu gösterilmiş ve kimyasalların üretim ve kullanımı ile ilgili düzenlemelerde TH sisteminin bozulmasının önemli bir husus olduğu tespit edilmiştir. TH'ler ile ilgili endokrin bozucu etkilerin değerlendirilmesine odaklanan OECD ve USEPA, kurbağa metamorfozunun tiroit hormon sisteminin denetiminde olması nedeniyle, metamorfoz dönemi ile EBK'lerin etkilerini değerlendirecek alternatif testler düzenlemişlerdir. OECD'nin Amfibi Metamorfoz Testi (Şekil 1.5) (OECD, 2009) kimyasal maddelerin endokrin bozucu aktivitesini test etmek için geliştirilmiş testlerden biridir. AMT, deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir amfibi türü olan *Xenopus laevis*'in kullanıldığı ve çevresel kimyasalların TH aktivitelerini bozucu olup olmadıklarını değerlendirelebildiği bir testtir (Zhang ve diğ, 2015).



Şekil 1.5: AMT'de iribaşların kullanımı ve gelişim aşamaları (Couderq ve diğ. (2020)'den özetle)

Hipotalamus-Hipofiz-Tiroit (HHT) eksenini vücutta, termo-regülasyon, enerji üretimi, büyüme, merkezi sinir sisteminin gelişimi, kardiyovasküler sistemin kontrolü, üreme ve ayrıca amfibilerde larval gelişim ve metamorfoz gibi metabolik süreçleri kontrol eder. AMT, HHT ekseninin normal fonksiyonlarını engelleyebilecek maddelerin deneysel olarak tanımlanması için tasarlanan bir tarama testidir. AMT aynı zamanda, HHT ekseninin omurgalılarda yapı ve işlevlerinin korunmuş olmasına dayalı olarak, genel bir omurgalı modeli temsil etmektedir (OECD, 231 (OECD, 2009)). Bu çalışmada AMT modifiye edilmiş, iribaşların mortalite düzeyleri ve gelişim belirteçleri ölçülmüş ancak histopatoloji

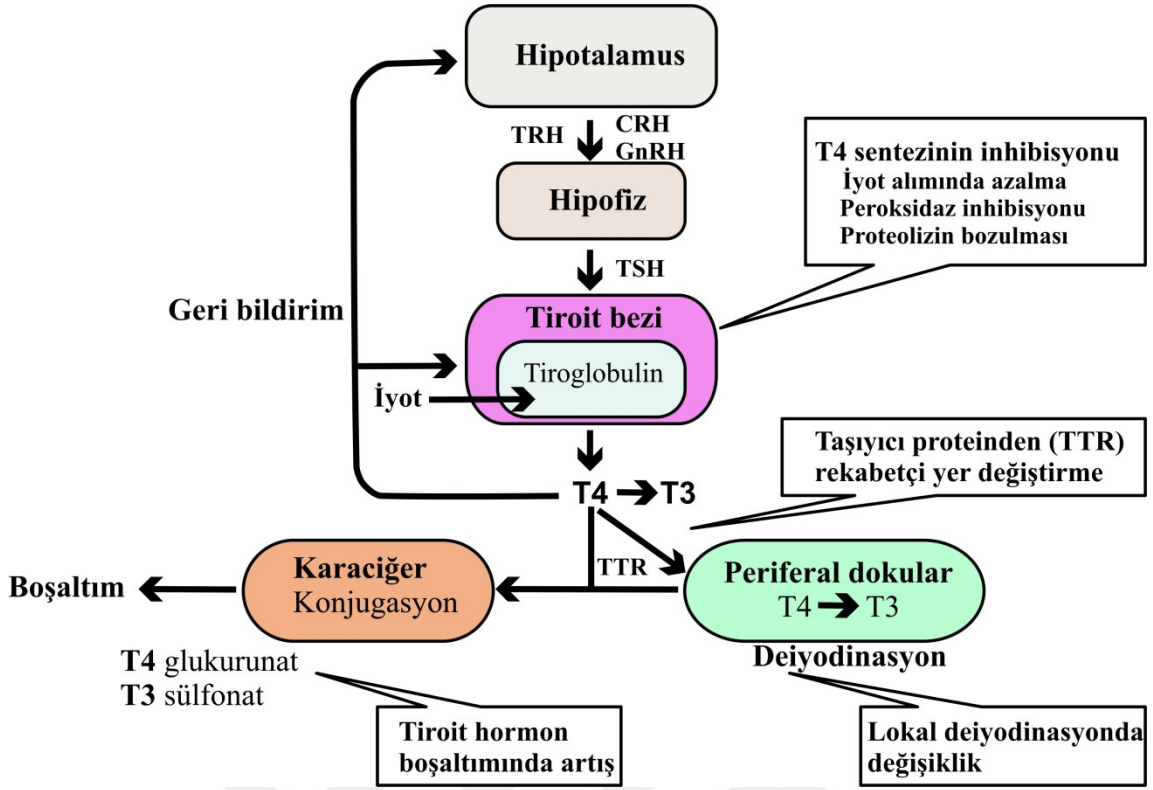
yerine, toksikolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde biyobelirteç olarak kullanılan detoksifikasyon ve metabolik enzimler ile T3 ve T4 düzeyleri ölçülmüştür.

1.7.2 Tiroit hormon düzeyleri

Yaklaşık 100 yıl önce, J.F. Gudernatsch dikkat çekici bir keşifle, at tiroit ekstraktının kurbağalarda metamorfozu hızlandırdığını belirledi. Sonraki çalışmalarda ise iribaşlarda tiroit bezinin uzaklaştırılmasının veya TH sentezi inhibitörleri ile muamele etmenin metamorfozu engellediği gösterilmiştir.

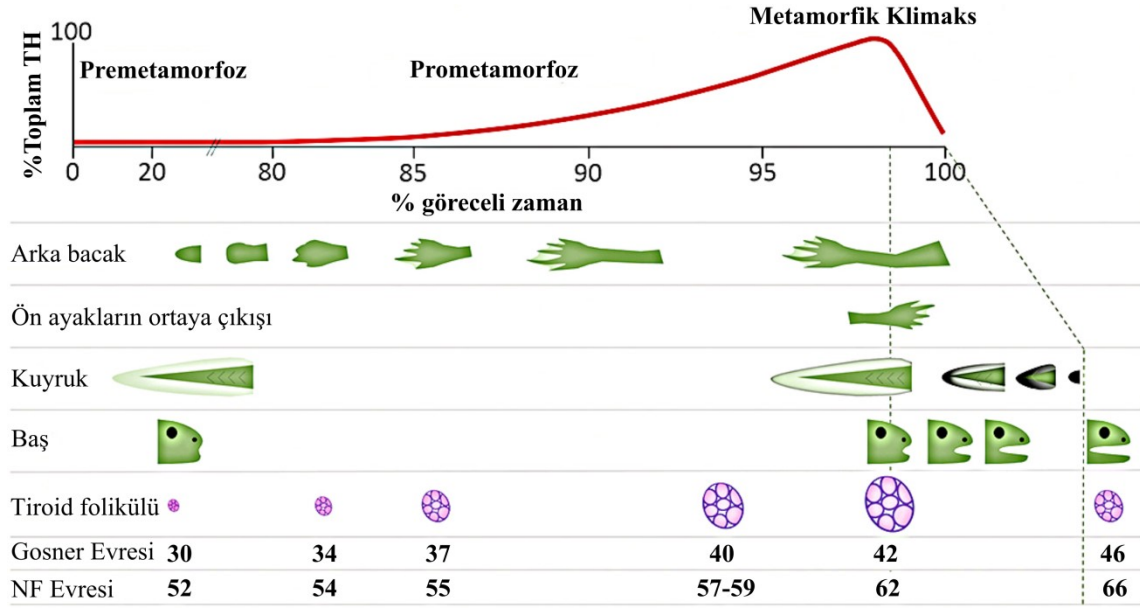
TH'ler arasında tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) bulunur (Şekil 1.6). Tiroid bezi öncelikle T4'ü sentezler ve salgılar ve T4 de-iyotlanır ve daha yüksek biyoaktiviteye sahip olan T3'e dönüştürülür. TH'ler kanda nakil proteini transtiretine (TTR) bağlı bir biçimde taşınır, karaciğerde konjuge olur ve safraya atılır (Şekil 1.6). Omurgalılarda TH'lerin yapısı tamamen korunmuş olup, sentez ve salgılama şekilleri temelde amfibiler ve memelilerde benzerdir (Miyata ve Ose, 2012).

TH'ler HHT eksenini tarafından kontrol edilir ve onları kontrol eden mekanizmalar ve bunları etkileyen faktörler Şekil 1.5'te gösterilmiştir. Tiroid bezinin iyot alımını ve tiroid peroksidaz kontrolünü engellemek TH'lerin sentezini bozar. Ek olarak, periferik dokuda deiyodinazın baskılanması, T4'ten T3 üretimini baskılar. Karaciğer ilaçlarını metabolize eden enzimlerin sentezi, T4 ve T3'ün safra atılımını kolaylaştırır. Kimyasal bir madde TH taşıma proteinine bağlandığında ve bir TH ile antagonistik olarak rekabet ettiğinde, kandaki TH seviyesi azalır. (Miyata ve Ose, 2012).



Şekil 1.6: Tiroit hormon yoluna ve düzenlenmesine genel bakış (Miyata ve Ose, 2012)

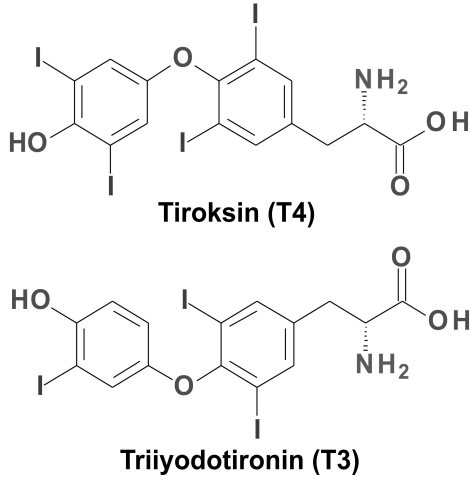
TH sinyal iletimi, erken omurgalı gelişimine özgü morfolojik değişikliklere aracılık eden moleküler olayların temel taşıdır. TH'lerin gerekliliği, belki de en iyi, TH tarafından temel uyarımın uygun çevresel koşullar altında iribaştan juvenil kurbağalara geçişleri başlattığı anuran amfibilerin metamorfoz süreçleridir. Amfibiler, işlevsel olarak tiroit premetamorfik iribaşlar, prometamorfoz (eşzamanlı, artan endojen TH seviyeleri ile) ve metamorfik klimakstan sonra genç kurbağalara ilerlediğinden karmaşık ve kapsamlı morfolojik değişikliklere uğrarlar (Şekil 1.7). Bu değişiklikler, organların koordineli olgunlaşmasını ve yeniden şekillenmesini, uzuvların *de novo* oluşumunu, kuyruğun gerilemesini ve bunun sonucunda suda yaşayan iribaşların karada yaşayan kurbağalara dönüşmesi nedeniyle davranış, beslenme ve nişte meydana gelen değişiklikleri kapsar (Thambirajah ve diğ, 2019).



Şekil 1.7: Kurbağa postembriyonik gelişimi sırasında tiroit hormonu (TH) seviyeleri ve anahtar morfolojik özellikler. Amfibi metamorfozu, TH sinyali tarafından yönlendirilen postembriyonik bir süreçtir. Serbest yüzen kurbağa yavrusu (% 0 göreceli süre) neredeyse saptanamayan TH seviyelerine sahiptir. Bir kurbağa yavrusunun genç bir kurbağaya gelişiminde meydana gelen morfolojik değişiklikler (% 100 göreceli zaman), TH seviyelerindeki artışlarla direkt ilişkilidir. Yükselen TH seviyeleri, arka bacak gelişimi, ön ayak oluşumu, kuyruk gerilemesi, kafa şekli değişiklikleri ve tiroit folikül üretimi dahil gelişim aşamalarında morfometrik ölçümlerle görülebilen değişikliklere yol açar (Thambirajah ve diğ, 2019).

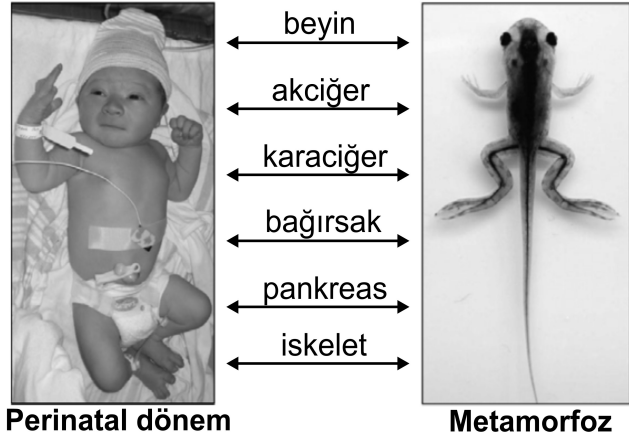
İnsan tiroit bezlerinde üretilen TH'lerden tiroksin (T4) ve daha aktif form olan triiyodotironin (T3) hormonlarının kurbağa iribaşlarının metamorfoz süreçlerinde miktarlarının arttığı belirlenmiştir (Furlow ve Neff, 2006). Tiroit bezi, periferik dokularda biyolojik olarak daha aktif form olan T3'e dönüştürülen, tiroksini (T4) salgılar. TH'lerin kanda taşınması çoğunlukla transtiretin olmak üzere transport proteinlerine bağlanarak gerçekleşir. Karaciğerde gerçekleşen konjugasyon ve yıkım süreçlerinden sonra safradan atılım gerçekleşir. Bazı TH'ler bakteriyel dekonjugasyon sonrasında bağırsaklardan geri emilirler. TH'ler omurgalılar arasında korunmuştur ve bunların üretimi ve salgılanması memelilerde ve amfibilerde benzerdir. Tiroit hormonunun varlığında gerçekleşen kurbağa metamorfozu ve memeli doğumu arasında önemli paralellikler vardır (Şekil 1.8) (Buchholz, 2015).

A) Tiroit Hormonları



B) Hormon hedefleri

(Gelişim sürecinde hormon hedefleri ortaktır)



Şekil 1.8: Tiroit hormonları: Doğumda ve metamorfozda hormon hedef organları ortaktır.

İnsanlarda ve kurbağalarda birçok organ doğru gelişim için tiroit hormonlarına ihtiyaç duyar (Buchholz, 2015).

X. laevis'te TH'ler evre 54'ten önce tiroid bezinden salgılanmaz, arka bacak gelişimi gerçekleşmez. Plazma T4 seviyesi, evre 54'ten 62'ye yavaş yavaş artar, buna arka uzuv büyümesi eşlik eder. T4'ten türetilen oldukça aktif bir TH olan T3, 58. aşamada plazmada aniden yükselir ve kuyruk kısalmasının başladığı 61-62 aşamalarında zirveye ulaşır (Li ve diğ., 2016; Yaoita, 2019).

1.7.3 Diğer biyokimyasal belirteçler

Biyobelirteç terimi “bir biyolojik sistemin kimyasal, fiziksel veya biyolojik, potansiyel bir tehlike ile etkileşimini yansıtan herhangi bir ölçüm” şeklinde tanımlanmaktadır. Biyobelirteç kısaca, çevresel kimyasallara maruz kalma sonucu canlının verdiği biyolojik yanıtta bir değişim olarak da tanımlanır (van der Oost ve diğ., 2003). Biyobelirteçler, organizmaların sağlık durumlarını değerlendirmede ve çevresel riskin önceden belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla, ksenobiyotiklere maruz kalan organizmalarda çeşitli biyokimyasal parametreler, bu maddelere verilen yanıtın belirlenmesi açısından biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise NP uygulamanın sonunda iribaşlarda morfolojik değişimler ve TH düzeylerindeki değişikliklerin yanı sıra glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz, katalaz, asetilkolinesteraz ve karboksilesteraz enzimleri ile malondialdehit düzeyi NP toksisitesini yansıtacakları varsayımı ile belirteç olarak seçilmiştir.

1.7.3.1 Glutasyon S-transferaz

GST'ler, tripeptid glutasyonun (GSH) elektrofilik substratlar ile konjugasyon reaksiyonunu katalizleyerek faz II biyotransformasyon sürecinde önemli rol oynayan enzimlerdir. Bu reaksiyon daha hidrofilik ve daha kolay atılabilir ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. Buna göre, GST'lerin, çeşitli hücre içi metabolitlerin detoksifikasyonuna, aynı zamanda doğal toksinler ve ilaçlar dahil ksenobiyotik bileşikler ve bunların reaktif ara maddelerinin detoksifikasyonuna katıldığı bilinmektedir. (Anila ve diğ, 2021; Tierbach ve diğ, 2018).

GST ailesi 3 ana gruptan oluşur: zara bağlı, mitokondriyal ve sitozolik proteinler. Membranla ilişkili GST'ler, eikosanoid ve GSH metabolizması sınıfındaki mikrozomal GST veya membranla ilişkili protein grubuna dahildir ve lökotrienlerin ve prostanooidlerin biyosentezinde rol oynarlar. Mitokondriyal GST'ler kappa sınıfını oluşturur. Sitosolik GST'ler, enzim dizisi benzerliklerine göre birkaç sınıfa ayrılır. Bu sınıflar alfa, zeta, teta, mu, pi ve omegadır. Memeli türlerinde, başka bir sitosolik sınıf olan sigma mevcuttur, sitosolik sınıf rho ise teleostlara ve sefalokordatlara özgüdür. Sitosolik GST'lerin çok sayıda sınıfa çeşitlendirilmesi, ksenobiyotikler dahil potansiyel olarak zararlı endojen ve eksojen bileşiklerin inaktivasyonu için geniş bir substrat spesifikliğı sağlar (Tierbach ve diğ, 2018).

1.7.3.2 Glutasyon redüktaz

Kirlenmiş alanlardaki amfibi iribaşları, kirlenmemiş koşullardaki amfibilere kıyasla biyokimyasal değişiklikler gösterebilmektedir. İribaşların kirleticilere maruz kalmasının, oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna (LPO) neden olan ROT ve diğer serbest radikalleri ürettiği bildirilmiştir. ROT'ler, hücre ölümüne ve doku hasarına neden olabilirler. Dokularda yaygın olarak bulunan bir enzim olan glutasyon redüktaz (GR) ise hücrelerin ROT ve serbest radikallere karşı korunması da dahil olmak üzere birçok süreçte işlev gören glutasyonu, işlev gördüğü indirgenmiş formda tutar. GR, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfata (NADPH) bağlı reaksiyonda glutasyon disülfidin (GS-SG) glutatyon (GSH) indirgenmesini katalizler. GSH ayrıca ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar. GR'nin inhibisyonu, düşük GSH konsantrasyonuna ve bununla birlikte dokularda yüksek konsantrasyonda eksojen bileşiklere yol açabilir ve bu da ciddi patolojik durumlara neden olabilir.(Anila ve diğ, 2021; Eriyamremu ve diğ, 2008).

1.7.3.3 Katalaz

Katalaz (CAT), hücre peroksizomlarında bulunan ve hidrojen peroksidi, oksijene ve suya dönüştüren bir enzimdir. Diğer organlara kıyasla, en önemli detoksifikasyon organı olduğu için, bu enzimin aktivitesinin karaciğerde en yüksek olduğu bilinmektedir. CAT gibi antioksidan sistem enzimlerinin aktivitesinin artmasının, bireylerin kirletici varlığından kaynaklanan oksitleyici ortama adaptasyonunu ve H₂O₂'nin olumsuz etkileriyle baş etmeye yardımcı olduğu bildirilmiştir (Bonifacio ve diğ, 2016). Diğer yandan *X. laevis* gelişiminin ilk iki gününde (evre 22'den evre 35/36'ya kadar), embriyo antioksidan metabolizmasının CAT ve SOD aktivitelerine dayandığı ve sonrasında GSH sisteminin aktive olduğu ve GSH ilişkili tüm enzimlerin aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Oksidatif stres, gelişimin ilk günlerinde artarsa, CAT ve SOD'nin toksik konsantrasyonlar altında ROT seviyesini koruyamadığı ve MDA düzeyinin arttığı bilinmektedir. Daha ileri gelişim evrelerindeki embriyolarda ise GSH sistemi, hücreleri LPO'dan korumaktadır (Rizzo ve diğ, 2007).

1.7.3.4. Karboksilesteraz

Karboksilesteraz (CaE), birçok kimyasalın hidrolizinde yer alan bir faz I enzimi olarak sınıflandırılır ve detoksifikasyonda önemli bir role sahiptir. CaE, piretroidler, organofosfatlar ve karbamatlar dahil olmak üzere birçok tarımsal kimyasalın detoksifikasyonunda rol oynar (Wheelock ve diğ, 2005). Nano boyutlu olmayan metal tuzlarının *X. laevis* iribaşlarında CaE aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Gungordu ve diğ, 2010; Yologlu ve Ozmen, 2015)

1.7.3.5. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, kolinerjik sinapslarda ve kas plakalarında çok önemlidir ve sinir sinyali iletdikten sonra postsinaptik membranda asetilkolin uyarımının kesilmesine sağlar. AChE inhibitörleri olarak enzim aktif bölgesine geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlanan organofosfat insektisitlerinin ana hedefi olarak kabul edilir ve aktivitesindeki azalma genellikle letalite ile ilişkilidir (Venturino ve diğ, 2003) .

1.7.3.6 Malondialdehit

Çeşitli kimyasalların, hücre zarlarında çoklu doymamış lipidlerin peroksidasyonuna, yapısal proteinlerin, enzimlerin ve ribonükleik asitlerin bozulmasına ve doku hasarına

neden olduğu bilinen serbest radikalleri oluşturabileceği kabul edilmektedir. Y¼ksek MDA seviyesinin, membran LPO d¼zeyinin ve dolayısıyla doku hasarının önemli bir belirteci olduğu bilinmektedir (Eriyamremu ve diğ, 2008). Biyomembranların peroksidasyonu, MDA'yı da içeren epoksitler ve aldehitler gibi reaktif elektrofiller dahil olmak üzere çeşitli ürünler üretir. MDA oldukça reaktif bir aldehittir ve nükleofillere karşı reaktivite sergiler ve MDA-MDA dimerleri oluşturabilir. Hem MDA hem de MDA-MDA dimerleri mutajeniktir (Klaassen ve diğ, 2013).



2. KAYNAK ÖZETİ

Sucul ekosistemler üzerine insan aktivitelerinin etkisini değerlendirirken çok sayıda omurgalı ve omurgasız hayvan türü biyoindikatör tür olarak tercih edilmektedir. Literatür incelendiğinde en çok tercih edilen omurgalı organizmaların balıklar olduğu görülebilir. Kurbağa türleri de sucul ekosistem için risk değerlendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Balıklar üzerine yapılan kronik toksisite testlerinin kurbağalar üzerine toksisitenin değerlendirilmesinde yeterli olup olmayacağı Weltje ve diğ., (2013) tarafından ele alınmıştır. Bu araştırmacılar, balık ve amfibi toksisite verilerinin yüksek oranda ilişkili olduğu ve balıkların amfibilerden daha hassas olduğu sonucuna varmışlardır (Weltje ve diğ., 2013). Diğer yandan, karşılaştırma testleri amfibilerin, tiroid hormon bozucu kimyasallardan bazılarına (sodyum perklorat gibi) balıklardan daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bundan hareketle araştırmacılar, "amfibi metamorfozunda yer alan biyokimyasal yollara etki eden maddelerin, balıklar vekil olarak kullanıldığında tespit edilemeyebileceği" sonucuna varmışlardır (Dang, 2019; Weltje ve diğ., 2013).

Sucul olan amfibiler için kimyasalların ekolojik riski, çoğunlukla, balık türlerinden alınan toksisite verileriyle, yüzey suyundaki tahmini çevresel konsantrasyonların karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Bariz benzerliklerine rağmen, balıklar ve amfibiler arasında kimyasallara maruziyetlerini ve tepkilerini etkileyebilecek biyolojik farklılıklar vardır. İnsan kaynaklı kirliliğin amfibilerdeki endişe verici azalışın nedenlerinden biri olduğu bilindiğinden, kimyasalların amfibiler üzerindeki riskini araştırmak giderek daha önemli hale gelmektedir (Glaberman ve diğ., 2019).

Tiroit hormonları (TH) pek çok omurgalı taksonunda, sinir sisteminin gelişiminde kritik roller oynamaktadır, ancak bu temel biyolojik süreçlerin kesin moleküler mekanizmaları hala çözülmeye çalışılmaktadır. Çevre ve insan sağlığı ile ilgili endişeler, kimyasal güvenlik testlerinin geliştirilmesine yol açtı ve endokrin bozucu etkiler bağlamında, tiroid hormonu eksenini bozan kimyasalların tanımlanması yönelik araştırmalar hız kazandı. Çeşitli moleküllerin farklı TH sinyal mekanizmalarını etkilediği bilindiğinden, bu maddelerin etkilerini değerlendirmede tek başına *in vitro* ligand/reseptör etkileşimine dayalı testler yetersiz kalmakta ve yeni nesil tarama testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, sayısı giderek artan çevresel kimyasalların daha yüksek verimli taramasını gerçekleştirmek için, dolaşımdaki TH düzeylerini belirlemeden daha hassas ve tiroit histopatolojisinden daha hızlı, memeli *in vivo* deneylerine alternatif

biyobelirteçler gereklidir. Memeli olmayan omurgalı modeller arasında, zebra balığı ve TH sinyalinin incelemek için yaygın olarak kullanılan bir amfibi modeli olan *Xenopus laevis* yer almaktadır (Couderq ve diğ, 2020).

2.1 AMT ile İlgili Çalışmalar

Xenopus laevis sucul toksisite çalışmalarında yoğun olarak kullanılan türlerdendir. *X. laevis* embriyoları kullanılarak yapılan, FETAX ksenobiyotiklerin kısa süreli maruz kalmalarda teratojenik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. AMT, *X. laevis*'in metamorfoz süreci kullanılarak ksenobiyotiklerin gelişimsel, endokrin bozucu etkileri ve toksisitelerinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Yine 2019 yılında yayınlanan XETA da ksenobiyotiklerin gelişimsel, endokrin bozucu ve toksik etkilerini değerlendirmek için *X. laevis* embriyonal gelişim dönemlerinin kullanıldığı yeni nesil bir testtir (ASTM, 2003; Couderq ve diğ, 2020; OECD, 2009, 2019). Literatür incelendiğinde FETAX testi ile kıyaslandığında daha uzun süreli ve daha masraflı bir test olması nedeniyle daha az sayıda direkt veya modifiye AMT'lerinin yapıldığı görülebilir.

TH'lerin işlevleri üzerine tarım ilaçlarının büyüme ve özellikle üreme sistemini etkilediği düşünülerek yapılan bir AMT çalışmasında, Glufosinate amonyum Basta'nın değişik konsantrasyonlarda (0.05-0.25 mg/L) tiroid hormon bozucu potansiyeli değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bu formülasyonun morfolojik parametrelerden yalnızca arka bacak uzunluğunun gelişimini sınırladığını göstermiştir. Histolojik değerlendirme, ortalama tiroid bezi alanı ve ortalama tiroidal folikül epitel yüksekliğinin 0.15 ve 0.25 mg/L maruziyetleri takiben önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Mevcut çalışma, bu Basta formülasyonunun tiroit eksenini etkileşime girdiğini ve bu nedenle özellikle amfibi ve metamorfik su omurgalıların sağlığı için tehlike potansiyeli oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca, sucul biyoçeşitliliği korumak için bazı herbisit formülasyonlarının tiroit bozucu aktivitelerinin daha fazla araştırılması ve karakterize edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Babalola ve diğ, 2020).

Antibakteriyel bir ajan olan triklosanın (TCS) prometamorfik *X. laevis* iribaşları üzerindeki etkisini değerlendirmek için AMT kullanılmıştır. Sonuçlar, çevrede bulunabilir TCS konsantrasyonlarının, tiroid aracılı metamorfozun normal seyrini değiştirmediğini göstermiştir. Bununla birlikte, premetamorfos sırasında TCS maruziyetinin etkilerini incelemek ve metamorfoz üzerindeki etkiler ile büyüme üzerindeki etkileri ayırt etmek için daha uzun vadeli bir TCS maruziyet çalışması yapılmıştır. Standart Nieuwkoop ve Faber

(NF) 47. evre *X. laevis* iribaşları, dört farklı TCS konsantrasyonuna (0.8-50 µg/L aralığında) 32 gün boyunca (yaklaşık NF evre 59-60) maruz bırakılmış, hayatta kalma, arka bacak uzunluğu, vücut uzunluğu (burun-vent), gelişim aşaması, yaş vücut ağırlığı, tiroit histolojisi, plazma TH konsantrasyonları, TH reseptörü beta (TRβ) ve tip II ve III deiyodinaz (DI-2 ve DI-3) ekspresyonları biyobelirteç olarak değerlendirilmiştir. Gelişim aşaması, tiroid histolojisi, TRβ, DI-2 ve DI-3 ekspresyonu ve tiroid bezi T4 ve plazma T4 dahil olmak üzere tiroit aracılı metamorfoz üzerindeki etkileri değerlendirmek için ölçülen parametreler ve T3 seviyeleri TCS maruziyetinden etkilenmemiştir. Bununla birlikte, 32 günlük TCS maruziyetinin ardından vücut uzunluğuna, burun-vent uzunluğuna ve tüm vücut ağırlığına bağlı olarak artan larva büyümesi gözlenmiştir. Bu sonuçlar, pre- ve prometamorfoz sırasında TCS maruziyetinin larva büyümesini arttırdığını, ancak *X. laevis*'te normal metamorfoz seyrini değiştirmediğini göstermiştir (Fort ve diğ, 2011).

X. laevis kullanılarak amfibi bazlı tiroit tarama testinin geliştirilmesine yönelik ilkin çalışmalardan birinde propiltiourasil (PTU), metimazol ve tiroksin (T4) model bileşiklerinin *X. laevis* 'te tiroit yanıtları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. TH sentezi inhibitörleri olan metimazol ve PTU, larva gelişiminde konsantrasyona bağlı gecikmeye neden olmuştur. Her iki bileşik de tiroit bezi morfolojisinde konsantrasyona bağlı değişikliklere kolloid azalması, glandüler hipertrofi ve hücrel hiperplazi neden olmuştur. Maruz bırakma önemli düzeyde metamorfik inhibisyon yaşayan iribaşlarda bile büyümeyi olumsuz etkilememiştir. T4 maruziyeti, beklendiği gibi gelişim hızında konsantrasyona bağlı bir artışla sonuçlanmıştır. Metimazol ile yapılan çalışmalara benzer şekilde, incelenen iki gelişim evresi arasında duyarlılık açısından fark belirlenmemiştir. Bu sonuçlar, metamorfozun erken aşamalarındaki kurbağa yavrularının tiroit eksenini bozulmasına duyarlı olduklarını ve kısa vadeli, tanısız amfibi tabanlı tiroit tarama testinin geliştirilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır (Degitz ve diğ, 2005).

Herbisit formülasyonlarının suda yaşayan organizmaların endokrin sisteminin tiroid yollarını modüle etme potansiyeli olduğundan hareketle yapılan bir AMT çalışmasında bir herbisit olan Diquat dibromid'in *X. laevis* metamorfozu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Formülasyonun, kontrol grubu ile kıyaslandığında, hem ön hem de arka bacak uzunluklarında hem de gelişim evresinde gerilemeye (57-kontrol 60) neden olduğu saptanmıştır. Histopatolojik olarak, tiroid bezi alanında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, uygulama konsantrasyonlarından kaynaklı çeşitli değişiklikler tespit edilmiştir (Babalola ve van Wyk, 2021). Araştırmacılar tiroit metabolizması dışında da LPO düzeyi

ve hücre hasarını içeren oksidatif etki tarzının neden olduğu stres yolunun rolü, vahşi yaşam üzerindeki fizyolojik ve ekolojik etkileri daha fazla karakterize etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir.

Propikonazol, pestisitlerde ve biyositlerde yaygın olarak kullanılan bir azol bileşigidir. Propikonazol'un amfibilerdeki endokrin aktivitesini ve yan etkilerini belirlemeye dönük bir çalışmada, *Xenopus tropicalis* iribaşları metamorfoz tamamlanana kadar 0.33 ve 384 µg/L propikonazol'e maruz bırakılmıştır. Metamorfozda, kontrole kıyasla yüksek doz grubunda beyin aromataz aktivitesinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Her iki propikonazol grubunda, artan sayıda birey, kontrollerin ortalama zamanından daha hızlı metamorfoza ulaştığından, bunun tiroid sistemi üzerinde uyarıcı bir etkiden kaynaklandığı düşünülmüştür. Metamorfozdan 2 ay sonra, kontrollere kıyasla her iki propikonazol grubunda da düşük dozda, erkeklerde testis boyutu, sperm ve Müllerial kanal olgunluğu azalmış ve karaciğer somatik indeksi artmıştır. Sonuç olarak, propikonazol maruziyetinin endokrin bozulmalara ve ardından ergenlik döneminde belirgin olan hepatik ve üreme etkilerine neden olduğu ve metabolizmanın ve erkek üreme fonksiyonunun kalıcı olarak bozulduğu gösterilmiştir (Svanholm ve diğ., 2021).

2.2 Nanoparçacıkları ile İlgili Biyobelirteç Çalışmaları

Özgür ve diğ., (2018) yaptıkları bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (50-800 mg/L) Fe₃O₄ NP'lerin (30 nm boyutlu) 4 °C'de 24 saat boyunca gökkuşuğu alabalığı üzerindeki etkisini *in vitro* olarak değerlendirmişlerdir. Uygulama sonucunda 100 mg/L ve üzeri konsantrasyonlar SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya, 400 ve 800 mg/L konsantrasyonları ise MDA ve toplam glutatyon (tGSH) düzeylerinde anlamlı artışa neden olmuştur ($p < 0.05$).

Özmen ve diğ., (2015) mangan katkılanmış TiO₂ NPLerin fotokatalitik verimliliğinin değerlendirildiği bir çalışmada. Tek halde TiO₂ NP'lere ve Mn-katkılanmış TiO₂ NP'lere 96 saat süreyle maruz bırakılan 46. evre *X. laevis* iribaşlarında GST ve CaE aktivitelerinde kontrole istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı düzeyde inhibisyon, tGSH düzeyinde ise azalma belirlenmişlerdir ($p < 0.05$). Aynı çalışmada bisfenol A ve atrazin gibi kirleticilerin GST düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Zn NP'lerin *Oreochromis niloticus* ve *Tilapia zillii* için ortalama öldürücü konsantrasyonunu (LC₅₀) belirlemek için yapılan bir çalışmada Zn NP'lerin (500 ve 2000

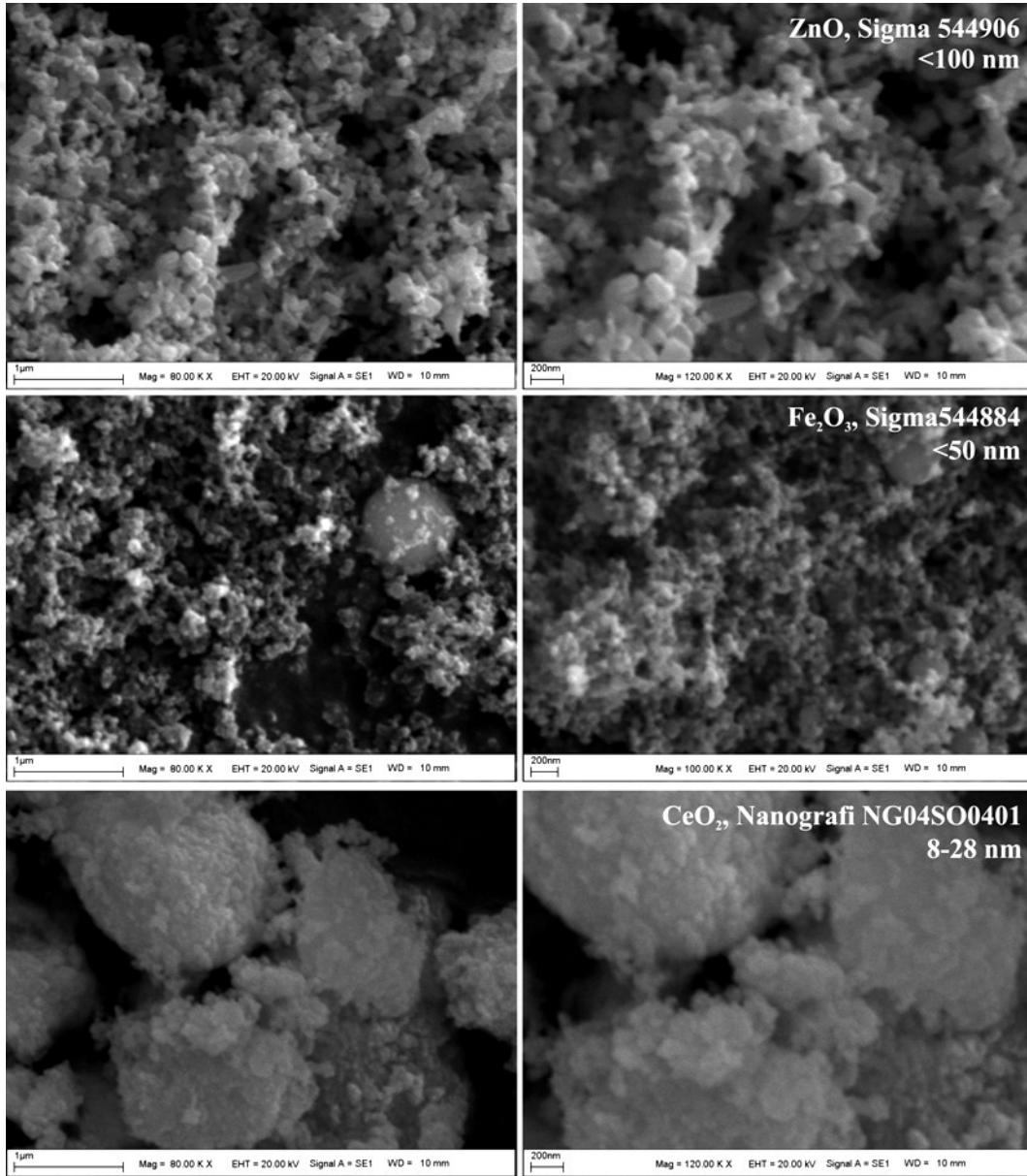
$\mu\text{g/L}$) test organizmalarının beyin dokusundaki antioksidan sistem üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, *O. nilotica* ve *T. zillii* 96 saatlik LC_{50} düzeyleri sırasıyla 5.5 ± 0.6 ve 5.6 ± 0.4 mg/L olarak saptanmıştır. 0.5 mg/L ZnO NP'lere maruz kalan balıklarda GSH_{red} , tGSH seviyeleri, SOD, CAT, GR, glutasyon peroksidaz (GPx) ve GST aktivitelerinde ve gen ifadelerinde artış, MDA düzeyinde ise önemli ölçüde azalma belirlenmiştir. Ayrıca, 2 mg/L Zn NP'lere maruz kalan balıklar, GSH, tGSH seviyeleri, SOD, CAT, GR, GPx ve GST aktivitesinde ve gen ekspresyonunda önemli bir azalma belirlendi. Aksine, MDA seviyeleri önemli ölçüde arttığı belirlendi (Saddick ve diğ, 2017).

Bir tatlı su balığında (*Carassius auratus*) Al_2O_3 ve ZnO NP'lerin tek başına ve karışım halinde toksisitesi değerlendirilmiştir. 7, 14 ve 21 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda NP'lere maruz bırakılan *C. auratus* solungaçlarında ve karaciğerlerinde CAT, GST, SOD aktiviteleri, LPO düzeyi ve histopatoloji değerlendirilmiştir. Sonuçlar, özellikle tek ve birleşik NP'lere 14 gün maruz kaldıktan sonra, balıkların solungaçlarında ve karaciğerlerinde CAT ve SOD aktivitesinde bir artış ve ardından 21 günde ise bir azalma olduğunu göstermektedir. Test edilen tüm NP konsantrasyonları (tek ve kombine) için 7 gün sonra solungaçlarda GST aktivitesinde bir artış gözlemlendi; karaciğerlerde ise, hem tekli ZnO hem de Al_2O_3 NP'lere 14 gün maruz kaldıktan sonra önemli bir artış belirlenmiştir. LPO, Al_2O_3 NP'lere (tek veya kombine) 7 gün maruz kaldıktan sonra solungaçlarda önemli ölçüde artmıştır. Histolojik gözlemlerden elde edilen sonuçlar, metal oksit NP'lere maruz kalmanın hem karaciğerleri hem de solungaçları etkilediğini ve solungaç hiperplazisi ve karaciğer dejenerasyonu gibi değişiklikler ortaya çıktığını göstermektedir. Bu çalışma, test edilen NP'lerin tekli veya karışım halinde, *C. auratus* üzerinde ölümcül olmayan etkilere neden olabildiğini, ancak karışım halinde NP'lerin tek başına eklendiklerinden biraz daha toksik olduğunu göstermektedir (Benavides ve diğ, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Test Edilen Nanoparçacıklar

Bu çalışmada ticari amaçlı olarak üretilen ve boyutları üretici firma tarafından belirtilen üç NP'nin toksik etkileri test edildi. Test edilen NP'lerden selenyum oksit (CeO₂, Nanografi, NG04SO0401) 21 nm boyutludur. Diğer test materyallerinden çinko oksit NP, <100 nm (ZnO, Sigma 544906, ABD) ve demir (III) oksit NP, ise <50 nm (Fe₂O₃, Sigma 544884, ABD) boyutludur. Test edilen NP'lerin 1 µm ve 200 nm ölçekli taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Test edilen nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

Test edilen NP'lerin subletal konsantrasyonlarının olası toksik ve endokrin bozucu etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, *Xenopus laevis* türü kurbağaların metamorfoz dönemi iribaşları, ilgili kimyasallara maruz bırakıldı ve aşağıda belirtilen biyobelirteçler ölçüldü. Testlerde biyokimyasal belirteçler ve gelişim parametreleri kullanılarak olası etkiler değerlendirildi.

3.2 Test Organizmalarının Sağlanması

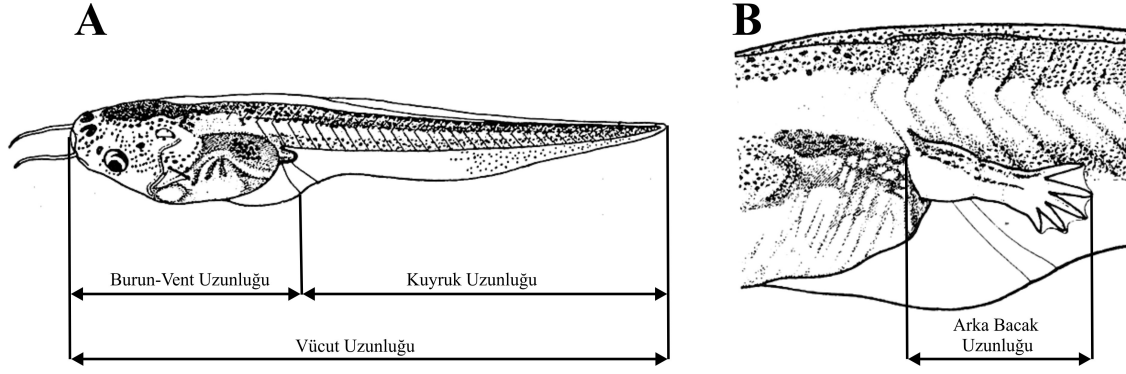
Çalışma kapsamında yapılan deneylerde kullanılan organizmalar, 2000 yılından bu yana laboratuvarımızda yaşatılmakta ve gerektiğinde üretimi yapılmakta olan koloniden sağlandı. Çalışmalar boyunca laboratuvar ortamının sıcaklığı 22 ± 1 °C'de tutuldu ve çalışma ortamında 12:12 gündüz-gece döngüsünde foto-periyot uygulandı.

Yumurta eldesi için dişi ve erkek kurbağalar FETAX çözeltisi ortamına alındı ve bu bireylere uygun dozlarda (erkeler için 500 Unit, dişiler için 600 Unit) insan koriyonik gonadotropin hormonu enjekte edilerek eşeyssel aktiviteler uyarıldı. FETAX çözeltisi, Tip I ASTM suyuna uygun şekilde hazırlandı. Buna göre 1 L distile suda 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO₃, 30 mg KCl, 15 mg CaCl₂, 60 mg CaSO₄.2H₂O ve 75 mg MgSO₄ olacak şekilde FETAX çözeltisi hazırlandı (ASTM, 2003).

Elde edilen döllenmiş yumurtalar 4 gün süreyle, havalandırılan FETAX çözeltisinde gelişimlerinin 46. evresine gelene kadar bekletildi, bu süre içerisinde embriyolar beslenmedi. Sürenin sonunda iribaşlar 4 L, kloru uzaklaştırılmış ve UV ışıktan geçirilmiş çeşme suyu ortamına alındı ve günlük olarak beslenmeye başlandı.

3.3 Amfibi Metamorfoz Testi (AMT)

AMT için 46. evreden sonra iribaşlar, uygun koşullarda Sera-Micron yem ile (Test tarafından önerilmektedir) beslenerek 51. evreye ulaşmaları sağlandı. Testte kullanılacak iribaşların gelişimi OECD 231 nolu testte öngörüldüğü şekilde yapıldı. AMT'ye, stokta yeterli sayıda iribaş 51. evreye ulaştığında başlandı. İribaşların döllenme sonrası 17 günde veya daha kısa sürede istenilen evreye ulaşması sağlandı (Şekil 3.2, Nieuwkoop and Faber' e göre, 51. Evre (Nieuwkoop ve Faber, 1956)).



Şekil 3.2 AMT’de kullanılacak *Xenopus laevis* iribaşlarının görünümü: A) 51. Evre (lateral görünüm), B) 56. Evre (lateral görünüm) (Nieuwkoop ve Faber, 1956).

Deney hayvanlarının gelişim evreleri bir binoküler diseksiyon mikroskobu kullanılarak belirlendi. Evre belirlemek için sodyum bikarbonat (pH 7.0) ile uygun şekilde tamponlanmış 100 mg/L trikain metansülfonat (MS222) iribaşların anestesizinde kullanıldı. İribaşların 51. evreye ulaşmış ulaşmadığı arka bacak morfolojik karakteristikleri mikroskop altında incelenerek belirlendi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Nieuwkoop and Faber’e göre belirgin morfolojik evrendirleme parametreleri

Belirgin morfolojik işaretleri	Gelişim evreleri															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Arka bacak	X	X	X	X	X	X	X									
Ön bacak						X	X	X	X	X						
Kraniyofasiyal yapı										X	X	X	X			
Koku sinir morfolojisi											X	X	X			
Kuyruk uzunluğu													X	X	X	X

İribaşların 51. evreye gelişimi ve 21 gün maruz kalma süresi boyunca, iribaşlar Sera-Micron yem ile her gün, günde 2 kez beslendi. AMT’ye başlandıktan sonra, Çizelge 3.2’de belirtildiği şekliyle, iribaşlar NP konsantrasyonlarına 7 ve 21 gün süreyle maruz bırakıldıktan sonra sağ-kalım, arka bacak uzunluğu, burun-vent uzunluğu ve gelişimsel aşaması kaydedildi. Ayrıca, belirtilen günlerde iribaşların tiroit hormon (TH) ve biyobelirteç enzim düzeyleri ölçüldü. İribaşlar biyobelirteç ölçümlerinden önce, 175 mg/L MS-222 ile anestezi altına alındı.

Çizelge 3.2: Amfibi Metamorfoz Testi için uygulanan deneysel koşullar (OECD, 231 nolu testin bazı kısımları modifiye edildi: *simgesi ile belirtilen kısım orijinal testte bulunmamaktadır)

Test Hayvanı	<i>Xenopus laevis</i> iribaşları		
Larvaların Başlangıç Evresi	Nieuwkoop and Faber'e göre 51. evre		
Maruz bırakma süresi	21 gün		
Larva seçme kriterleri	Gelişim evresi		
Test Konsantrasyonları	En az 3 konsantrasyon		
Maruz bırakma şekli	Statik-yenilemeli		
Birincil Ölçümler/ Belirlenme günleri	Mortalite	Günlük	
	Gelişim Evresi	7. ve 21. gün	
	Arka Bacak Uzunluğu	7. ve 21. gün	
	Burun-Vent Uzunluğu	7. ve 21. gün	
	Yaş Vücut Ağırlığı	7. ve 21. gün	
	*Biyokimyasal Analizler (Tiroit hormon düzeyleri ve biyobelirteç enzim aktiviteleri)	7. ve 21. gün	
Seyreltme Suyu/Laboratuvar Kontrolü	Kloru uzaklaştırılmış çeşme suyu		
İribaş Yoğunluğu	20 İribaş/ test kabı (5 adet/ L)		
Test Çözeltilisi/Test Kabı	4 L (10-15 cm derinlikte)/ Cam (ör., 22.5 cm x14 cm x 16.5 cm)		
Tekrar Sayısı	4 tekrarlı test kapları/ test konsantrasyonu ve kontrol		
Kontrollerde kabul edilebilir ölüm oranı	Her tekrar test kabı için; 10≥		
Besleme	Yem	Sera Micron® ya da eşdeğeri	
	Miktar/Sıklık	Test Günü	Yem miktarı: mg Sera Micron®/ hayvan/ gün
		0-4	30
		5-7	40
		8-10	50
		11-14	70
15-21	80		
Aydınlatma	Fotoperiyot	12 saat aydınlık: 12 saat karanlık	
	Yoğunluk	600 Lux'den 2000 Lux'e	
Su Sıcaklığı	22±1°C		
pH	6.5-8.5		
Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonu	>3.5 mg/L (>%40 Hava Doymunluğu)		
Analitik Kimya Örnek Zamanlaması	Haftada bir kere (4 örnek olay/Test)		

3.4 Biyokimyasal Analizler

Testin 7. gününde ve test süresinin (21. gün) sonunda, her konsantrasyon için 8 iribaş MS222 ile anestezi sonrası ölmeleri sağlandıktan sonra, bu örneklerde TH ve diğer biyobelirteç düzeyleri ölçüldü. İribaş örnekleri çalışmalarının yapılacağı güne değin -80 °C’de derin dondurucuda saklandı. Enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçüm işlemleri, santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin, mikroplyt okuyucu sistem (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak literatürde belirtilen yöntemlerin Güngördü (2013) tarafından belirtilen modifikasyonları dikkate alınarak yapıldı (Güngördü, 2013). TH düzeylerinin belirlenmesi için ayrılan süpernatant örnekleri çalışmalarının yapılacağı güne değin -80 °C’de derin dondurucuda saklandı. MDA analizi için ise farklı iribaşlar kullanıldı.

3.4.1 Tüm vücut homojenatlarının hazırlanması:

TH analizi ve enzim aktivitesi ölçümleri için; homojenizasyona başlanırken, derin dondurucudan alınan ve saklama tüpleri içerisinde bulunan iribaşların buz üzerinde çözünmesi sağlandı ve tartıldılar. Homojenizasyon, toplam iribaş ağırlıklarının 4 katı hacimde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (pH 7.4, 0.1 M potasyum fosfat tamponu içinde: 0.15 M KCl; 1 mM EDTA; 0.05 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) bulunmaktadır) ile bir buz kabında yapıldı. İribaş örnekleri uygun cam tüplerde, buz kabı içinde, bir politron homojenizatör (Ika T25, Germany) kullanılarak, 45 saniye süreyle homojenize edildi. Elde edilen homojenat mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı, homojenatlar 4 °C’de 16,000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj edildi (Allegra 64R, Beckman, ABD). Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak, elde edilen post-mitokondrial fraksiyonda enzim ve TH ölçümleri yapıldı. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz üzerinde tutuldu.

3.4.2 Tiroit hormon analizi

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan süpernatant örneklerinde iribaş tiroit hormon (T3, T4) düzeylerinin ölçülmesi için ticari kitler kullanıldı (T3 için EU403, T4 için EU404, FineTest, China). Ticari kitler, Rekabetçi-ELISA tespit yöntemine dayanmaktadır. Ölçümler kitlerde belirtildiği gibi, özetle aşağıdaki şekilde yapıldı (Şekil 3.3).

1. Aşama: Standart, örnek ve kontrol (boş) mikroplyt kuyucuklarına eklemeyen önce mikroplyt 2 kez yıkandı.

2. Aşama: Her kuyucuğa 50µl Standart veya örnek eklendi. Hemen 50 µl Biotin etiketli antikor her kuyucuğa eklendi, iyice karıştığundan emin olduktan sonra mikroplyet 37 °C’de 45 dakika inkübe edildi

Yıkama adımı: Mikroplyetler 3 kez aspire edildi ve yıkandı.

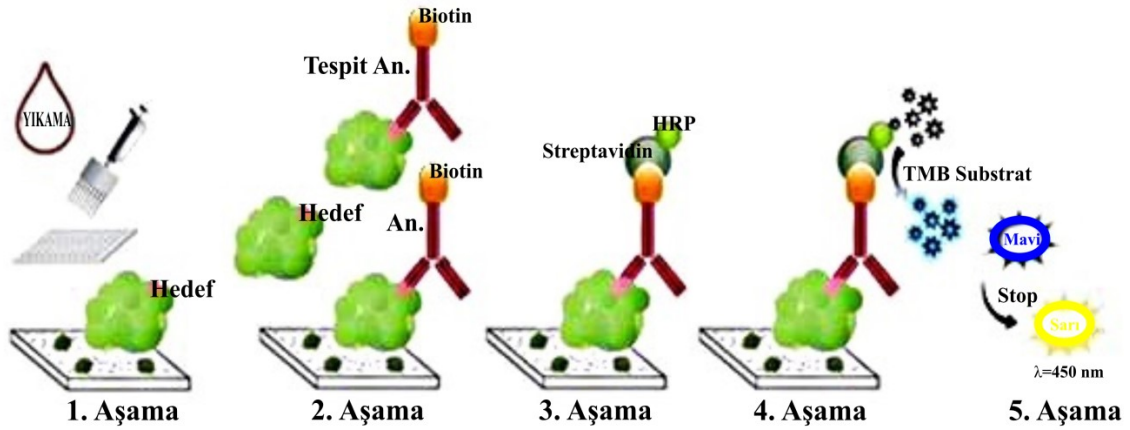
3. Aşama: Her kuyucuğaya 100 µl SABC Çalışma Çözeltisi eklendi ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi

Yıkama adımı: Mikroplyetler 5 kez aspire edildi ve yıkandı.

4. Aşama: 90 µl TMB Substrat çözeltisi mikroplyetlere eklendi. 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi.

5. Aşama: Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve beklenilmeksizin 450 nm’de absorbands okuması yapıldı.

TH düzeyi ile ilgili hesaplamalar kitte belirtilen yöntem uygun şekilde yapıldı.



Şekil 3.3: Tiroit hormon düzeylerinin ölçümünde uygulanan yöntem şeması

3.4.3 Diğer biyobelirteçlerin analizi

3.4.3.1 GST aktivitesi

GST aktivitesi ölçümünde substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Çalışmada Habig ve diğ, (1974)’nin geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Buna göre, 10 µl süpernatant alınarak, içerisinde potasyum fosfat tamponu (0.1 M, 100 µl pH 6.5), redükte glutatyon (2 mM, 100 µl GSH) ve CDNB (20

mM, 10 µl) bulunan ortamda reaksiyon başlatıldı ve 344 nm dalga boyunda 2 dakika süreyle absorban okuması yapıldı. GSH reaksiyonda kofaktör olarak kullanıldı.

3.4.3.2 GR aktivitesi

GR aktivitesi Stephensen ve diğ, (2000) tarafından kullanılan yöntemle saptandı. Reaksiyon çözeltisi 0.1 mM, 150 µl 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 12 mM, 20 µl NADPH ve 20 µl örnek içermektedir. 20 µl, 3.25 mM GSSG'nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon esnasında GS-SG'den GSH oluşumu nedeniyle DTNB miktarı azaldı. DTNB azalışı oda sıcaklığında 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorban değerlerine göre GR aktivitesi hesaplandı (reaksiyon ürünü; 2-nitro-5-thiobenzoat anyonu için $\epsilon=14,151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.4.3.3 CAT Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CAT aktivitesi Aebi (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Enzim aktivitesi, 240 nm dalga boyunda substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) tüketimine bağlı olarak saptandı. Bu amaçla 1 ml'lik kuvartz küvete, 20 µl örnek ve 480 µl 12.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) pipetlendi. 25°C'de 1 dakika süreyle absorban değişimi kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.4.3.4 CaE aktivitesi

CaE aktivitesi belirlenirken, Santhoshkumar ve Shivanandappa (1999) tarafından belirtilen spektrofotometrik yöntem mikroyet okuyucu sisteme uyarlanarak kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde *p*-nitrofenolasetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı. Buna göre mikroyet kuyucuklarına 5 µl örnek pipetlendikten sonra ortama 250 µl, 0.05 M trizma 7.4 eklendi. 3 dakikalık inkübasyon sonrasında ortama 5 µl PNPA (karışımdaki konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde) eklenerek reaksiyon başlatılacaktır. 405 nm dalga boyunda 2 dakika boyunca absorban okuması yapıldı.

3.4.3.5 AChE aktivitesi

AChE aktivitesi ölçümünde Ellman ve diğ, (Ellman ve diğ, 1961) tarafından geliştirilen yöntemin, Özmen ve diğ, (1998) tarafından modifiye edilmiş şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde asetiltiokolün iodyd substrat olarak kullanıldı. İribaşlardan elde edilen süpernatant toplam reaksiyon karışımında 10 µl olacak şekilde mikroyet

çukurlarına pipetlendi. Süpernatantın üzerine son reaksiyon karışımında 0.701 mM asetiltiyokolin iyodür (ACTI) ve 0.136 mM DTNB olacak şekilde, trizma tamponu içerisinde (0.1 M, pH 8.0) hazırlanmış karışımdan 200 µl ilave edildi. 25 °C'de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi kaydedildi.

3.4.3.6 MDA düzeyi

MDA düzeyi Botsoglou ve diğ, (1994)'nin yöntemi modifiye edilerek belirlendi . Diğer biyobelirteçlerden farklı olarak MDA analizinde farklı iribaşlar kullanıldı. Homojenizasyon, yukarıda belirtildiği şekilde toplam iribaş ağırlıklarının 4 katı hacimde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu ile bir buz kabında yapıldı. 500 µL homojenat 10 mL hacimli, kapaklı cam tüplerde 1.5 mL reaksiyon karışımı (toplam hacim 150 mL olacak şekilde; 7.5 g trikloroasetik asit, 0.188 g thiobarbitürik asit, 1.02 ml HCl ve distile su) ile 30 dk 100 °C'de inkübe edildi (ağız sıkı kapalı). İnkübasyon sonrası örnekler 15000 rpm de 10 dk süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant örnekleri her mikroyet çukuruna 250 µL olacak şekilde pipetlendi. 532 nm'de absorbans okuması yapıldı. Elde edilen bu değerlerden örnekler için MDA düzeyi hesaplandı (reaksiyon ürünü için $C=1.56 \times 10^5 M^{-1} c^{-1}$).

3.4.3.7 Toplam protein miktarı tayini

İribaş homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda toplam protein miktarları Bradford (1976) yöntemine göre, mikroyet okuyucu sistemi kullanılarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikroyet kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µL Bradford çözeltisi eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen değerler BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, örnekteki toplam protein miktarları saptandı. Tüm örneklerden elde edilen toplam protein değerleri, elde edilen enzim aktivite değerleri ile birlikte, spesifik enzim aktivitesi değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.

3.5 Test Çözeltilerinde Bazı Fiziko-kimyasal Parametrelerin Saptanması

Çalışmada maruz bırakma süresince, çözeltilerin pH, sıcaklık ve iletkenlikleri periyodik olarak ölçüldü (YSI, model 556).

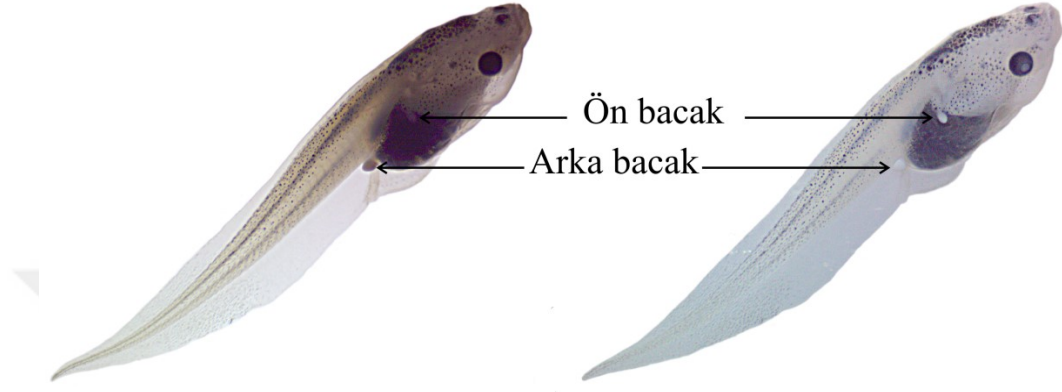
3.6 İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar:

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi için GraphPad Prism 5 programı (USA) kullanıldı. Biyobelirteçlerin istatistiksel analizi için, veriler başlangıçta sırasıyla Bartlett ve Kolmogorov-Smirnov testleri ile varyansların homojenliği ve normallik dağılımları açısından test edildi. Parametrik olmayan veriler Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi ve ardından Dunn çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Parametrik veriler, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından Bonferroni testi kullanılarak analiz edildi.



4. BULGULAR

Her bir nanoparçacık (NP) için ayrı ayrı olmak üzere farklı zamanlarda AMT'ler yapıldı. AMT'lere başlanmadan önce rastgele seçilen 30 iribaş için gelişim evresi ve gelişim düzeyi tespit edildi. İribaşların teste uygunluğu Şekil 4.1'de belirtilen özellikler dikkate alınarak yapıldı.



Şekil 4.1: AMT'de kullanılan 51. evre iribaşlarının stereo mikroskop altında farklı aydınlatmalardaki görüntüsü

Ölçüm sonuçlarına göre AMT için testin başlangıcında Fe_2O_3 , ZnO ve CeO_2 NP'lere maruz bırakılmadan önce iribaşların ortalama uzunluğu ve gelişim evreleri sırasıyla 24.11 (± 0.38) mm ve 51. evre (min.: 50-maks.: 52); 28.91 (± 0.42) mm ve 51. evre (min.: 50-maks.: 52); 29.18 (± 0.37) mm ve 52. evre (min.: 51-maks.: 53) olarak belirlenmiştir. Bu değerler kullanılan iribaşların test için gerekli özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

4.1 Fizikokimyasal Bulgular

Yapılan AMT'ler süresince, maruz bırakma ortamının pH, sıcaklık ve iletkenlik değerleri periyodik olarak ölçüldü (Çizelge 4.1). Belirtilen parametrelerin *X. laevis* için önerilen değerleri sırasıyla 6.5-8.5, 20-23 °C ve 0.05-2.0 mS/cm'dir. Sonuçlara göre hem uygulamanın başlangıcında hem de uygulamadan 24 saat sonra sıcaklık, iletkenlik ve pH değerleri *X. laevis* için önerilen aralıkta kalmıştır.

Çizelge 4.1: AMT'ler süresince ortamların sıcaklık, iletkenlik ve pH değerleri

NP'ler Kons.		Uygulamanın 0. saati			Uygulamanın 24. saati		
		Sıcaklık (°C)	pH	İletkenlik (mS/cm)	Sıcaklık (°C)	pH	İletkenlik (mS/cm)
Fe ₂ O ₃	Kontrol	21.7 ± 0.5	7.8 ± 0.1	0.350 ± 0.023	21.3 ± 0.5	7.9 ± 0.1	0.360 ± 0.015
	0.001	21.6 ± 0.6	7.9 ± 0.1	0.351 ± 0.024	21.3 ± 0.5	8.1 ± 0.2	0.361 ± 0.015
	0.01	21.8 ± 0.5	8.0 ± 0.1	0.353 ± 0.025	21.4 ± 0.5	8.1 ± 0.1	0.362 ± 0.015
	0.1	21.6 ± 0.5	8.0 ± 0.1	0.354 ± 0.028	21.4 ± 0.6	8.0 ± 0.2	0.365 ± 0.015
	1	21.6 ± 0.6	7.9 ± 0.1	0.359 ± 0.029	21.4 ± 0.4	8.0 ± 0.2	0.373 ± 0.018
ZnO	Kontrol	21.7 ± 0.3	7.8 ± 0.1	0.544 ± 0.025	21.4 ± 0.5	8.1 ± 0.1	0.557 ± 0.018
	0.0001	21.7 ± 0.3	7.9 ± 0.1	0.543 ± 0.021	21.3 ± 0.5	8.1 ± 0.1	0.553 ± 0.017
	0.001	21.6 ± 0.3	7.8 ± 0.2	0.551 ± 0.021	21.4 ± 0.4	7.8 ± 0.1	0.559 ± 0.036
	0.01	21.7 ± 0.3	7.9 ± 0.2	0.548 ± 0.021	21.4 ± 0.4	8.0 ± 0.1	0.566 ± 0.016
	0.1	21.6 ± 0.2	7.9 ± 0.1	0.542 ± 0.020	21.3 ± 0.4	8.1 ± 0.1	0.554 ± 0.016
	1	21.6 ± 0.3	7.9 ± 0.1	0.541 ± 0.018	21.4 ± 0.4	8.1 ± 0.1	0.551 ± 0.014
CeO ₂	Kontrol	21.8 ± 0.5	7.9 ± 0.1	0.554 ± 0.017	21.4 ± 0.4	8.0 ± 0.1	0.575 ± 0.013
	0.001	21.8 ± 0.5	7.8 ± 0.1	0.552 ± 0.014	21.3 ± 0.5	7.9 ± 0.1	0.571 ± 0.011
	0.01	21.8 ± 0.5	7.8 ± 0.1	0.552 ± 0.017	21.4 ± 0.5	7.9 ± 0.1	0.574 ± 0.015
	0.1	21.8 ± 0.6	7.9 ± 0.1	0.554 ± 0.018	21.3 ± 0.5	8.1 ± 0.1	0.574 ± 0.016
	1	21.6 ± 0.6	8.0 ± 0.1	0.551 ± 0.017	21.1 ± 0.5	8.2 ± 0.1	0.568 ± 0.015

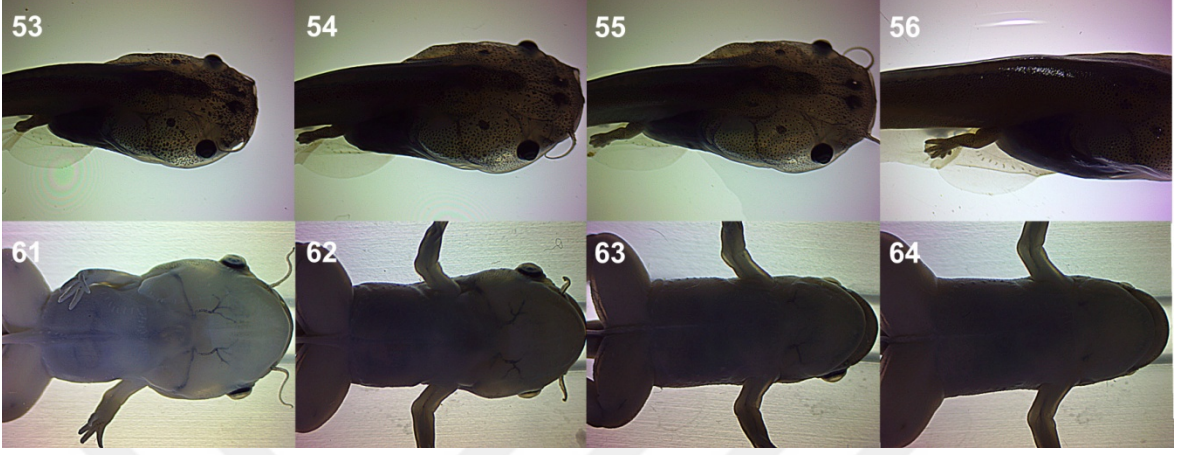
4.2 Fe₂O₃ NP'ler ile İlgili Bulgular

Bu çalışmada, AMT için NP'lere maruz bırakma süreçleri öncesi, iribaşların 17 gün içinde 51. gelişim evresine ulaşmaları sağlandı. Uygun sayıda 51. evre iribaşı AMT'de kullanıldı.

4.2.1 Fe₂O₃ NP'ler ile ilgili gelişim bulguları

Fe₂O₃ NP uygulamasında, 7 ve 21 günlük uygulamaların sonunda kontrol gruplarında ortalama gelişim evresi, arka bacak uzunluğu, burun-vent uzunluğu ve yaş vücut ağırlığı, sırasıyla 53.9-61.8, 2.87-13.60 mm, 16.13-18.17 mm ve 0.343-0.883 g olarak belirlenmiştir. 0.001-1 mg/L aralığında Fe₂O₃ konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda gelişim parametreleri açısından 7 gün sonunda kontrolden istatistiksel olarak farklı herhangi bir değişiklik belirlenmedi. 7 günlük uygulamanın sonunda en yüksek ve en düşük gelişim safhası 53 ve 55 olarak belirlendi (Şekil 4.2). 21 günlük uygulamada ise 0.001 mg/L Fe₂O₃ NP uygulaması büyüme evresi açısından geriliğe (evre 60.9), yaş vücut

ağırlığı (0.993 g) bakımından ise bir artışa neden oldu (Çizelge 4.2). Diğer istatistiksel fark ise 1 mg/L Fe₂O₃ NP uygulaması ile kontrol grubu karşılaştırıldığında NP uygulamasında iribaşlarda büyüme evresi (61.2) açısından gerilik olarak belirlendi.



Şekil 4.2: AMT’de 7 ve 21 günlük uygulamalarda yaygın görülen gelişim evreleri

Çizelge 4.2: AMT kapsamında Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarının gelişim özellikleri

Uygulama Süresi	Kons (mg/L)	<i>n</i>	Ölçülen Birey Sayısı	Gelişim Evresi	Arka Bacak Uzunluğu (mm)	Burun-Vent Uzunluğu (mm)	Yaş Vücut Ağırlığı (g)
7 gün	Kontrol	80	20	53.9 ± (53-55)	2.87 ± 0.14	16.13 ± 0.37	0.343 ± 0.022
	0.001	80	20	54.1 ± (53-55)	3.02 ± 0.10	16.60 ± 0.24	0.371 ± 0.017
	0.01	80	20	53.9 ± (53-54)	2.54 ± 0.08	15.24 ± 0.23	0.289 ± 0.014
	0.1	80	20	54.1 ± (54-55)	2.96 ± 0.12	15.57 ± 0.30	0.319 ± 0.019
	1	80	19	54.0 ± (54-54)	2.87 ± 0.09	15.98 ± 0.24	0.354 ± 0.018
21 gün	Kontrol	80	28	61.8 ± (61-64)	13.60 ± 0.29	18.17 ± 0.28	0.883 ± 0.031
	0.001	80	28	60.9 ± (60-62) ***	12.83 ± 0.26	18.76 ± 0.35	0.993 ± 0.037 *
	0.01	80	28	61.6 ± (60-64)	12.60 ± 0.25	17.87 ± 0.38	0.867 ± 0.037
	0.1	80	28	61.6 ± (60-63)	13.13 ± 0.35	18.36 ± 0.31	0.957 ± 0.036
	1	80	28	61.2 ± (59-64) *	13.88 ± 0.37	18.05 ± 0.28	0.873 ± 0.038

Maruz bırakmadan önce 25 iribaşın ortalama uzunluğu ve gelişim evreleri sırasıyla 24.11 (± 0.38) mm ve 51.32 evre (minimum: 50-maksimum: 52) olarak belirlenmiştir.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.2.2 Fe₂O₃ NP'ler ile biyobelirteç bulguları

Çalışmada 0.01-1 mg/L aralığında Fe₂O₃ NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda kontrolle kıyaslandığında önemli düzeyde GST inhibisyonu (%29'un üzeri) belirlendi. En düşük konsantrasyon olan 0.001 mg/L konsantrasyonu da %14 GST inhibisyona neden olmakla birlikte bu inhibisyon düzeyi istatistiksel açıdan önemli bulunmadı ($p>0.05$). Diğer yandan, 0.1-1 mg/L konsantrasyonları ise MDA düzeyinde artışa neden oldu (Çizelge 4.3). Kontrol grubunda MDA düzeyi 12.56 nmol/g iken 0.1 ve 1 mg/L Fe₂O₃ uygulamaları için sırasıyla 20.12 ve 25.16 nmol/g düzeyinde belirlenmiştir. MDA düzeyindeki bu artış kontrolle karşılaştırıldığında önemli bulunmuştur ($p<0.05$). 21 günlük uygulamanın sonunda ise Fe₂O₃ NP uygulama grupları ile kontrol grubu kıyaslandığında biyobelirteç düzeyleri açısından hiçbir farklılık belirlenmemiştir.

Çizelge 4.3: AMT kapsamında Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarının biyobelirteç düzeyleri

Uygulama Süresi	Kons. (mg/L)	n	GST ^a	GR ^a	CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a	T3 ^c	T4 ^c
7 gün	Kontrol	8	141.2 ± 6.64	16.26 ± 0.90	39.74 ± 2.29	12.56 ± 0.54	290.5 ± 14.82	52.48 ± 3.13	3.02 ± 0.24	21.78 ± 2.95
	0.001	8	121.4 ± 7.72	15.07 ± 0.62	35.82 ± 1.80	16.58 ± 1.43	257.7 ± 10.02	49.36 ± 3.99	3.48 ± 0.79	26.91 ± 9.09
	0.01	8	93.0 ± 11.45	** 16.70 ± 1.40	38.16 ± 2.56	16.30 ± 1.65	266.8 ± 15.33	50.60 ± 3.75	4.14 ± 0.48	26.62 ± 7.67
	0.1	8	99.9 ± 8.65	** 15.12 ± 0.55	40.62 ± 0.76	20.12 ± 0.82	** 252.9 ± 7.00	50.87 ± 2.82	3.47 ± 0.88	29.04 ± 8.63
	1	8	99.8 ± 6.52	** 16.87 ± 0.83	44.48 ± 2.62	25.16 ± 1.42	*** 274.8 ± 12.28	58.65 ± 3.67	4.42 ± 1.05	32.05 ± 10.50
21 gün	Kontrol	8	69.70 ± 6.12	9.50 ± 0.42	21.81 ± 1.54	39.69 ± 7.15	223.8 ± 10.3	36.96 ± 2.01	4.29 ± 0.33	21.21 ± 9.84
	0.001	8	87.29 ± 8.93	11.12 ± 0.62	26.40 ± 1.72	20.73 ± 4.74	248.4 ± 15.8	41.90 ± 2.61	3.59 ± 0.63	22.70 ± 1.81
	0.01	8	90.13 ± 7.69	11.79 ± 0.54	25.57 ± 1.10	21.58 ± 2.99	231.3 ± 8.8	43.54 ± 2.37	4.14 ± 0.58	37.45 ± 5.31
	0.1	8	71.12 ± 10.42	9.29 ± 0.81	22.16 ± 1.77	26.00 ± 6.70	218.5 ± 12.6	42.13 ± 2.01	4.59 ± 1.11	20.57 ± 4.61
	1	8	74.42 ± 7.62	9.51 ± 0.76	23.33 ± 1.81	75.59 ± 27.98	198.2 ± 12.9	40.62 ± 3.21	4.52 ± 0.82	26.78 ± 6.46

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/g ± standart hata olarak ifade edildi.

^c: Troid hormon düzeyleri ng/g ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.3. ZnO NP'ler ile İlgili Bulgular

4.3.1 ZnO NP'ler ile ilgili gelişim bulguları

ZnO NP uygulamasında, 7 ve 21 günlük uygulamaların sonunda kontrol gruplarında ortalama gelişim evresi, arka bacak uzunluğu, burun-vent uzunluğu ve yaş vücut ağırlığı sırasıyla 54.2-62.3, 3.13-15.87 mm, 16.88-17.52 mm ve 0.374-0.792 g olarak belirlenmiştir. Çalışmada 0.0001-1 mg/L aralığında ZnO NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda, 1 mg/L uygulaması, gelişim evresi (53.4), arka bacak uzunluğu (2.13 mm), burun-vent uzunluğu (3.65 mm) ve yaş vücut ağırlığı (0.211 g) bakımından geriliğe neden oldu. 21 günlük uygulama sonunda ise yine 1 mg/L uygulaması gelişim evresinde (58.2) arka bacak uzunluğunda (8.61 mm) ve yaş vücut ağırlığında (0.667 g) geriliğe neden oldu (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: AMT kapsamında ZnO NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriolarının gelişim özellikleri

Uygulama Süresi	Kons (mg/L)	<i>n</i>	Ölçülen Birey Sayısı	Gelişim Evresi	Arka Bacak Uzunluğu (mm)	Burun-Vent Uzunluğu (mm)	Yaş Vücut Ağırlığı (mg)
7 gün	Kontrol	80	20	54.2 ± (54-55)	3.13 ± 0.08	16.88 ± 0.20	0.374 ± 0.013
	0.0001	80	20	54.1 ± (53-55)	2.98 ± 0.11	16.83 ± 0.27	0.375 ± 0.019
	0.001	80	20	54.5 ± (54-55)	3.39 ± 0.10	18.40 ± 0.27	0.449 ± 0.015 **
	0.01	80	20	54.5 ± (54-55)	3.23 ± 0.09	17.71 ± 0.23	0.409 ± 0.013
	0.1	80	20	54.4 ± (53-55)	3.23 ± 0.12	17.75 ± 0.33	0.425 ± 0.023
	1	80	20	53.4 ± (53-54) *	2.13 ± 0.08 ***	13.65 ± 0.35 ***	0.211 ± 0.015 ***
21 gün	Kontrol	80	28	62.3 ± (61-64)	15.87 ± 0.23	17.52 ± 0.31	0.792 ± 0.039
	0.0001	80	28	62.5 ± (61-64)	15.44 ± 0.29	17.54 ± 0.37	0.827 ± 0.046
	0.001	80	28	62.5 ± (61-64)	15.65 ± 0.26	16.98 ± 0.19	0.759 ± 0.023
	0.01	80	28	62.6 ± (61-64)	15.35 ± 0.26	16.78 ± 0.18	0.744 ± 0.023
	0.1	80	28	62.4 ± (60-64)	15.13 ± 0.26	16.70 ± 0.27	0.758 ± 0.031
	1	80	28	58.2 ± (57-60) ***	8.61 ± 0.50 *	17.06 ± 0.24	0.667 ± 0.036 *

Maruz bırakmadan önce 27 iribaşın ortalama uzunluğu ve gelişim evreleri sırasıyla 28.91 (±0.42) mm ve 51.32 evre (minimum: 50-maksimum: 52) olarak belirlenmiştir.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.3.2 ZnO NP'ler ile biyobelirteç bulguları

Çalışmada, 1 mg/L ZnO NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda hem 7 gün sonunda hem de 21 gün sonunda kontrolle kıyaslandığında önemli düzeyde GST, GR ve CAT indüksiyonu belirlendi. 7 günlük uygulama için GST, GR ve CAT enzimlerin kontrol grubunda aktiviteleri 126.1, 15.06 ve 32.36 nmol/dak/mg protein olarak belirlenirken 1 mg/L ZnO NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda sırasıyla 333.8, 31.41 ve 47.19 nmol/dak/mg protein olarak belirlendi. Ayrıca, 7 günlük uygulama için 0.001 mg/L ve üzeri konsantrasyonlar, 21 günlük uygulama için ise 0.1 ve 1 mg/L ZnO NP konsantrasyonları CAT aktivitesinde indüksiyona neden oldu (Çizelge 4.5). Konsantrasyon ilişkili olmamakla birlikte 7 gün süreyle uygulanan ZnO NP konsantrasyonları AChE aktivitesinde artışa neden olurken, 0.001 mg/L ZnO NP konsantrasyonu kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düzeyde indüksiyona neden oldu ($p<0.05$).

Çizelge 4.5: AMT kapsamında ZnO NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarının biyobelirteç düzeyleri

Uygulama Süresi	Kons. (mg/L)	<i>n</i>	GST ^a	GR ^a	CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a	T3 ^c	T4 ^c
7 gün	Kontrol	8	126.1 ± 8.6	15.06 ± 0.75	32.36 ± 1.33	15.44 ± 0.97	356.9 ± 8.2	48.40 ± 3.44	8.50 ± 1.55	43.50 ± 6.32
	0.0001	8	135.3 ± 6.9	17.19 ± 0.87	36.95 ± 1.93	14.17 ± 0.64	375.2 ± 18.7	56.73 ± 4.79	4.70 ± 0.59	22.84 ± 6.49
	0.001	8	152.9 ± 8.8	18.89 ± 0.81	40.85 ± 2.65 *	17.23 ± 0.90	366.9 ± 19.4	65.47 ± 3.98 *	6.93 ± 0.71	34.91 ± 5.33
	0.01	8	153.9 ± 4.8	16.60 ± 0.52	45.39 ± 1.77 ***	19.92 ± 0.95	365.1 ± 7.8	57.74 ± 3.32	8.57 ± 1.22	42.19 ± 10.24
	0.1	8	151.4 ± 9.8	15.69 ± 0.52	42.47 ± 1.32 **	20.69 ± 1.49	344.1 ± 16.2	59.39 ± 4.94	6.12 ± 0.81	26.40 ± 5.50
	1		333.8 ± 32.7 ***	31.41 ± 2.42 *	47.19 ± 2.19 ***	17.63 ± 2.23	368.5 ± 20.3	58.38 ± 3.08	5.84 ± 0.51	34.41 ± 5.57
21 gün	Kontrol	8	52.40 ± 3.37	8.65 ± 0.41	20.06 ± 2.03	24.05 ± 1.53	166.8 ± 4.6	39.99 ± 2.63	6.12 ± 1.20	57.74 ± 15.72
	0.0001	8	66.29 ± 6.50	9.38 ± 0.52	22.43 ± 1.44	26.11 ± 3.04	172.8 ± 8.0	35.30 ± 1.33	4.57 ± 1.00	50.00 ± 11.15
	0.001	8	70.87 ± 6.02	9.12 ± 0.47	22.38 ± 1.16	26.46 ± 4.47	151.6 ± 5.5	35.30 ± 1.81	5.92 ± 1.13	57.48 ± 16.52
	0.01	8	50.87 ± 4.09	7.57 ± 0.34	22.57 ± 0.71	16.10 ± 1.23	147.3 ± 2.9	35.37 ± 2.83	5.96 ± 1.04	68.16 ± 25.69
	0.1	8	63.22 ± 2.54	9.14 ± 0.13	26.47 ± 1.15 **	19.64 ± 2.48	157.2 ± 7.9	36.45 ± 1.78	6.71 ± 0.60	91.89 ± 26.04
	1		109.10 ± 8.84 *	12.34 ± 0.87 *	27.19 ± 1.19 **	24.15 ± 2.40	166.6 ± 5.6	34.09 ± 1.30	4.70 ± 1.36	68.49 ± 28.43

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/g ± standart hata olarak ifade edildi.

^c: Troid hormon düzeyleri ng/g ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve *** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.4 CeO₂ NP'ler ile İlgili Bulgular

4.4.1 CeO₂ NP'ler ile gelişim bulguları

CeO₂ NP uygulamasında, 7 ve 21 günlük uygulamaların sonunda kontrol gruplarında ortalama gelişim evresi, arka bacak uzunluğu, burun-vent uzunluğu ve yaş vücut ağırlığı sırasıyla 54.6-62.3, 4.08-18.49 mm, 20.18-19.27 mm ve 0.606-1.043 g olarak belirlenmiştir. Çalışmada 0.001-1 mg L aralığında CeO₂ NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda herhangi bir değişiklik belirlenmezken, 21 günlük uygulamanın sonunda 0.001 mg/L konsantrasyonu kontrolle kıyaslandığında arka bacak uzunluğunda (20.41 mm) artışa neden oldu ($p<0.05$) (Çizelge 4.6).



Çizelge 4.6: AMT kapsamında CeO₂ NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarının gelişim özellikleri

Uygulama Süresi	Kons (mg/L)	<i>n</i>	Ölçülen Birey Sayısı	Gelişim Evresi	Arka Bacak Uzunluğu (mm)	Burun-Vent Uzunluğu (mm)	Yaş Vücut Ağırlığı (mg)
7 gün	Kontrol	80	20	54.6 ± (54-55)	4.08 ± 0.14	20.18 ± 0.27	0.606 ± 0.021
	0.001	80	20	55.1 ± (54-56)	4.20 ± 0.15	20.44 ± 0.25	0.627 ± 0.023
	0.01	80	20	54.9 ± (54-56)	4.42 ± 0.15	20.98 ± 0.29	0.691 ± 0.031
	0.1	80	20	55.0 ± (54-56)	4.22 ± 0.15	21.04 ± 0.23	0.697 ± 0.027
	1	80	20	54.8 ± (54-56)	4.10 ± 0.16	20.46 ± 0.33	0.646 ± 0.036
21 gün	Kontrol	80	28	62.3 ± (60-64)	18.49 ± 0.36	19.27 ± 0.28	1.043 ± 0.043
	0.001	80	28	62.2 ± (61-64)	20.41 ± 0.48 *	19.65 ± 0.25	1.136 ± 0.047
	0.01	80	28	62.5 ± (62-64)	19.45 ± 0.55	19.34 ± 0.34	1.086 ± 0.058
	0.1	80	28	62.5 ± (61-64)	19.15 ± 0.53	19.82 ± 0.34	1.129 ± 0.054
	1	80	28	62.3 ± (61-64)	18.68 ± 0.37	19.26 ± 0.29	1.038 ± 0.043

Maruz bırakmadan önce 30 iribaşın ortalama uzunluğu ve gelişim evreleri sırasıyla 29.18 (±0.37) mm ve 52.17 evre (minimum: 51-maksimum: 53) olarak belirlenmiştir.

*, ** ve *** : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

4.4.2 CeO₂ NP'ler ile ilgili biyobelirteç bulguları

Yapılan çalışmada 7 gün süreyle uygulanan CeO₂ NP konsantrasyonlarının tamamı GR ve CaE aktivitelerinde azalmaya neden olurken, 1 mg/L CeO₂ NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlardaki GR ve CaE inhibisyonu kontrol gurubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Ayrıca 0.01 ve 0.1 mg/L konsantrasyonları da CaE inhibisyonuna neden oldu ($p<0.05$). Benzer şekilde, uygulanan bütün konsantrasyonlar MDA düzeyinde azalmaya neden olurken 0.1 ve 1 mg/L konsantrasyonlarının neden olduğu azalma istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0.05$). MDA düzeyi kontrol grubunda 18.15 nmol/g olarak belirlenirken 1 mg/L ZnO NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 13.48 nmol/g olarak belirlendi.

Çalışmanın 21 günlük uygulaması sonucunda ise en düşük CeO₂ NP konsantrasyonunun (0.001 mg/L) iribaşlarda istatistiksel olarak kontrolle kıyaslandığında MDA düzeyinde (32.65 nmol/g) %37 artışa, en yüksek CeO₂ NP konsantrasyonu (1 mg/L) ise MDA düzeyinde (13.61 nmol/g) %43 azalışa neden oldu (Çizelge 4.7). CeO₂ NP'lere 21 gün süreyle maruz bırakılan iribaşlarda T3 konsantrasyonu konsantrasyon ilişkili olarak artmıştır. Ancak sadece en yüksek CeO₂ NP konsantrasyonuna (1 mg/L) maruz bırakılan iribaşlardaki T3 konsantrasyonu (9.89 ng/g) kontrol grubuyla (5.74) istatistiksel olarak kıyaslandığında önemli çıkmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 4.7: AMT kapsamında CeO₂ NP'lere maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarının biyobelirteç düzeyleri

ygulama Süresi	Kons (mg/L)	n	GST ^a	GR ^a	CAT ^a	MDA ^b	CaE ^a	AChE ^a	T3 ^c	T4 ^c
7 gün	Kontrol	8	95.7 ± 4.43	13.56 ± 0.40	40.03 ± 1.57	18.15 ± 1.52	329.2 ± 10.27	43.98 ± 3.08	8.34 ± 0.65	63.64 ± 7.77
	0.001	8	109.3 ± 3.65	13.49 ± 0.47	41.66 ± 2.16	15.86 ± 1.48	308.8 ± 11.92	49.83 ± 2.46	10.75 ± 1.61	82.32 ± 9.51
	0.01	8	95.9 ± 5.74	13.19 ± 0.30	39.88 ± 1.54	15.34 ± 0.63	290.4 ± 9.07 *	43.13 ± 1.74	9.14 ± 1.53	62.86 ± 11.17
	0.1	8	99.7 ± 5.88	13.09 ± 0.55	43.06 ± 1.38	13.97 ± 0.60 *	290.1 ± 9.46 *	44.11 ± 2.58	8.44 ± 2.05	66.48 ± 16.39
	1	8	91.7 ± 3.84	11.20 ± 0.64 **	40.54 ± 1.40	13.48 ± 0.98 *	279.0 ± 7.79 **	41.77 ± 2.28	6.99 ± 1.65	59.63 ± 6.48
21 gün	Kontrol	8	47.6 ± 1.43	8.35 ± 0.40	24.48 ± 0.51	23.91 ± 1.96	177.1 ± 7.65	34.69 ± 0.83	5.74 ± 0.31	21.64 ± 1.84
	0.001	8	50.3 ± 3.21	8.32 ± 0.53	27.63 ± 1.46	32.65 ± 2.77 *	176.9 ± 9.74	36.30 ± 1.46	6.80 ± 0.96	31.73 ± 5.02
	0.01	8	52.8 ± 2.72	8.79 ± 0.44	29.94 ± 1.09	23.63 ± 1.67	173.0 ± 6.87	39.73 ± 3.10	6.66 ± 0.99	40.48 ± 9.05
	0.1	8	45.0 ± 3.53	8.27 ± 0.47	25.46 ± 0.68	17.59 ± 2.28	179.8 ± 14.07	33.06 ± 1.92	7.88 ± 0.97	42.74 ± 5.73
	1	8	45.0 ± 2.35	9.14 ± 0.45	29.31 ± 3.01	13.61 ± 1.29 **	177.1 ± 3.38	36.65 ± 2.06	9.89 ± 1.32 *	35.28 ± 5.58

^a: Enzim aktivitesi nmol/dak /mg protein ± standart hata olarak ifade edildi.

^b: MDA miktarı nmol/g ± standart hata olarak ifade edildi.

^c: Tiroit hormon düzeyleri ng/g ± standart hata olarak ifade edildi.

*, ** ve ***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ düzeyinde önemliliği göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, evsel, endüstriyel ve tarımsal kimyasallar (poliklorlu bisfenoller, bromlu alev geciktiriciler, polibromlu difenil eterler, ftalatlar, pestisitler, ağır metaller, ilaçlar, nanomateryaller vb.) gibi birçok kimyasal insan faaliyetleri nedeniyle ekosistemlere girmekte ve onları olumsuz etkilemektedir. (Boxall, 2004; Sharma ve Bhattacharya, 2017; Thambirajah ve diğ, 2019). Olumsuz çevresel etkileri belirlenen kimyasalların üretimi ve kullanımı zamanla sınırlandırılmakta veya kullanımları yasaklanmaktadır (USEPA, 2009). Belirtilen kimyasalların yanı sıra nanomateryallerin insan ve çevre sağlığı üzerindeki etkileri bu teknolojik ürünlerin üretimi ve kullanımını da tartışmaya açmaktadır. Bu çalışmada üretim ve kullanımları gittikçe artan NM'lerden olan ticari üç NP'nin *X. laevis* metamorfozu üzerine toksik ve endokrin bozucu etkileri çeşitli biyokimyasal ve gelişim biyobelirteçleri kullanılarak değerlendirildi. Daha önce yapılmış çalışmalar dikkate alınarak, belirtilen NP'lerin yüksek ve toksik etkileri de çeşitli yönlerden çalışıldığından, bu çalışmada test edilen NP'lerin çevrede bulunması daha muhtemel subletal konsantrasyonlarının sub-akut etkileri değerlendirildi. Bu amaçla amfibi metamorfoz testinde (OECD-239) belirtilen protokole göre 21 gün süreyle CeO₂ ve Fe₂O₃'ün 0.001-1 mg/L aralığında dört ve ZnO'nun ise 0.0001-1 mg/L aralığında beş subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılan metamorfoz dönemi kurbağa iribaşlarında, toksik ve endokrin bozucu etkiler değerlendirildi.

Yapılan AMT'ler süresince, maruz bırakma ortamının sıcaklık, iletkenlik ve pH değerleri, *X. laevis* için önerilen değerler olan sırasıyla 6.5-8.5, 20-23 °C ve 0.05 -2.0 mS/cm değerlerinin aralığında yer almaktadır (Reed, 2005).

5.1 Fe₂O₃ NP Toksisitesi ile İlgili Değerlendirmeler

Wang ve diğ, (2016) yaptıkları derleme çalışmasında Fe_xO NP'lerin çevrede bulunma düzeylerini Avrupa Birliği ve Çin için değerlendirilmişlerdir. Belirtilen çalışmaya göre Avrupa Birliği ülkelerinde, havada 0.29 ng/m³, yüzey sularında 29 ng/L, atık su arıtma tesisi çıkış sularında ise 2.2 µg/L Fe_xO NP belirlenmiştir. Bu NP'lerin doğal ve

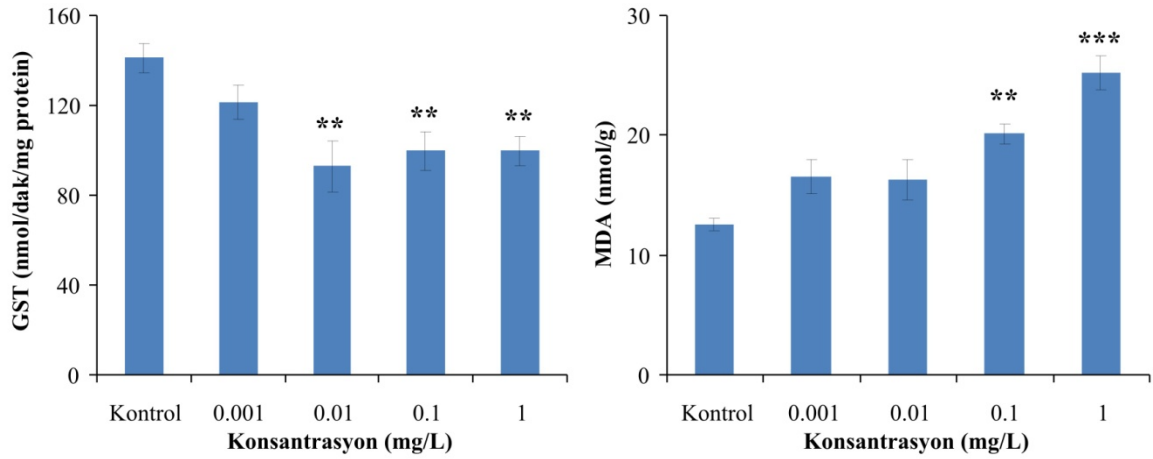
kentsel toprakta yıllık artış oranı ise 0.094 µg/kg/yıl olarak belirlenmiştir. Çin için ise aynı değerler sırasıyla havada 0.76 ng/m³, yüzey sularında 55 ng/L, atık su arıtma tesisi çıkış sularında ise 3.4 µg/L olarak belirlenmiştir. Bu NP'lerin doğal ve kentsel toprakta yıllık artış oranı ise 0.25 µg/kg/yıl olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan hareketle, çalışmamızda test ettiğimiz en düşük Fe₂O₃ NP konsantrasyonu (1 µg/L) yüzey sularında belirlenen Fe_xO NP düzeyine kıyasla yüksek olsa bile, atık su arıtma tesisi çıkış sularında çevreye verilen sularda belirlenen değerlere göre daha düşüktür. Çalışmamızda diğer konsantrasyonlardan farklı olarak en düşük Fe₂O₃ NP konsantrasyonuna (1µg/L) 21 gün süreyle maruz bırakılan iribaşlarda büyüme evresi açısından bir gerilik, yaş vücut ağırlığı bakımından ise bir artış belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Aynı uygulama grubu için T3 düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark belirlenmemişse de T3 düzeyinde kontrolle kıyaslandığında görülen azalma TH düzeyinin baskılandığı ve bundan kaynaklı metamorfozun gerilediği sonucuna varılabilir.

Pek çok metabolik ve detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesinin, ksenobiyotiklerin toksik etkileri nedeniyle indüklendiğinden veya inhibe olduğundan enzim aktiviteleri birçok laboratuvar ve saha toksikoloji çalışmasında biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadır (van der Oost ve diğ, 2003; Venturino ve diğ, 2003). Biyobelirteç değerlerine göre, diğer iki NP'de olduğu gibi Fe₂O₃ NP'ler de ilk 7 gün, 21 günlük uygulamaya göre daha çok etkilenmişlerdir. Bunun sebeplerinden biri, büyüme ve farklılaşma ile NP'lerin etkiledikleri biyokimyasal süreçlerin farklılaşması veya uzun süreli maruz kalma ile bir tür savunma mekanizmasının gelişmiş olması düşünülebilir. 7 günlük uygulamada GST inhibisyon gerçekleşirken MDA düzeyindeki artış gerçekleşmiştir, 21 günlük uygulamada ise her iki biyobelirteç düzeyinin de normale (kontrol düzeyine) dönmesi bu iddiayı desteklemektedir.

Özgür ve diğ, (2018) yaptıkları bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda (50-800 mg/L aralığı) Fe₃O₄ NP'lerin (30 nm) 4 °C'de 24 saat boyunca gökkuşağı alabalıklarında *in vitro* etkisini değerlendirmişlerdir. Uygulama sonucunda 100 mg/L ve üzeri konsantrasyonlar SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı düşüğe neden olurken ($p<0.05$), 400 ve 800 mg/L konsantrasyonları ise MDA ve toplam glutatyon (tGSH) düzeylerinde anlamlı artışa neden olmuştur. Çalışmamızda da 0.1-1 mg/L Fe₂O₃ konsantrasyonları MDA düzeyinde artışa neden oldu (Çizelge 4.3, Şekil 5.1). Kontrol grubunda MDA düzeyi 12.56 nmol/g iken 1 mg/L Fe₂O₃ NP uygulamasında kontrolle kıyaslandığında MDA düzeyindeki artış %100 oranında gerçekleşmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda, ROT'lere karşı bir

savunma olarak, vücut SOD ve GR gibi temel antioksidan enzimler ürettiği, SOD ve GR aktivitelerinde gözlenen artışın iribaşlarda üretilen MDA'yı temizlemek için geliştirilmiş bir girişim olduğu düşünülmektedir (Eriyamremu ve diğ, 2008).

Bu çalışmada 0.01-1 mg/L aralığında Fe₂O₃ konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda kontrole kıyaslandığında önemli düzeyde (%29'un üzeri) GST inhibisyonu belirlendi (Çizelge 4.3). GST ve CaE, detoksifikasyona dahil oldukları ve ilk hücrel savunma hattının önemli parçaları oldukları için, ksenobiyotiklere maruz kalan sucul faunayı izlemek için yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerdir (Gungordu, 2013; Lajmanovich ve diğ, 2019). GST aktivitesinin inhibisyonu, sırasıyla doğrudan veya dolaylı olarak metalin enzim üzerindeki etkisi veya ROT'lerin GST genlerini düzenleyen enzimlerle etkileşimi yoluyla olduğu düşünülmektedir (Anila ve diğ, 2021).



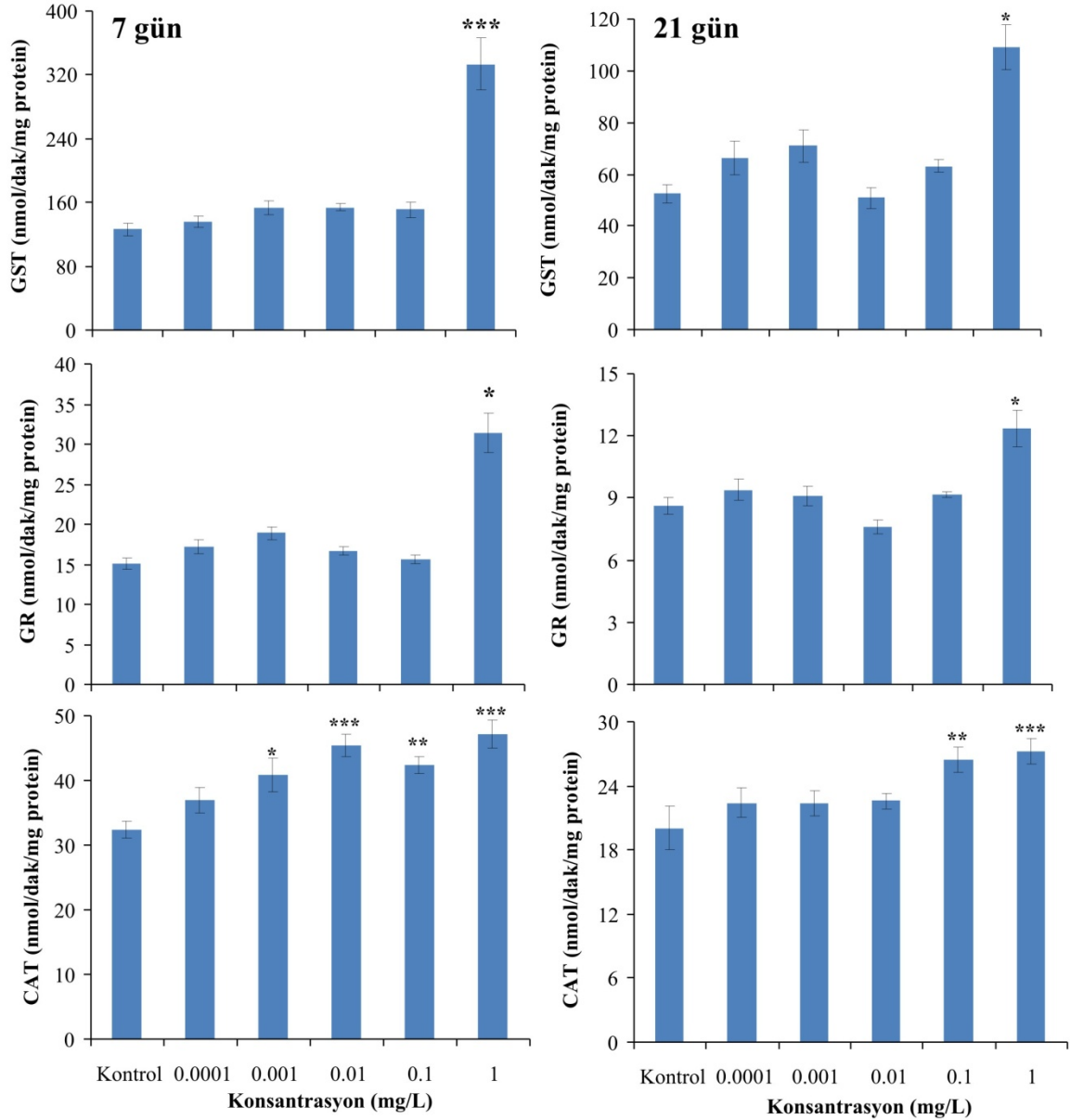
Şekil 5.1: Yedi günlük Fe₂O₃ uygulamasında GST ve MDA düzeyleri (Çizelge 4.3'te verilen verilerden hazırlanmıştır)

5.2 ZnO NP Toksikitesi ile İlgili Değerlendirmeler

ZnO NP'lerin çevresel konsantrasyonlarının modellenmiş tahminleri, yüzey sularında 0.001 ila 0.058 mg/L, toprakta 0.24 ila 0.661 mg/kg ve atık su arıtma tesisi atıklarında 0.22 ila 1.42 mg/L arasında değişmektedir ve konsantrasyonlarında sürekli artış olması beklenmektedir (Gottschalk ve diğ, 2009). Çalışmamızda test edilen değerler hem yüzey sularında bulanabilecek en düşük konsantrasyonu hem de 1 mg/L gibi görece yüksek bir subletal konsantrasyonu içermektedir.

Çalışmamızda 0.0001-1 mg/L aralığında ZnO NP konsantrasyonlarına maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda, 1 mg/L uygulaması, gelişim evresi, arka bacak

uzunluğu, burun-vent uzunluğu ve yaş vücut ağırlığı bakımından geriliğe neden oldu. 21 günlük uygulama sonunda ise yine 1 mg/L uygulaması, arka bacak uzunluğu, ve yaş vücut ağırlığı bakımından geriliğe neden oldu. (Çizelge 4.4). Çalışmada 1 mg/L ZnO NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda hem 7 gün sonunda hem de 21 gün sonunda kontrolle kıyaslandığında önemli düzeyde GST, GR ve CAT indüksiyonu belirlendi (Çizelge 4.5, Şekil 5.2). Birçok çalışma, bazı NM'lerin toksisitesinin, süperoksit anyon, hidroperoksil radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali dahil olmak üzere ROT'lerin oluşumuna bağlı olduğunu göstermiştir (Klaunig ve Kamendulis, 2008). CuO NP'lere kısa süreli maruz kalmanın balıklarda oksidatif strese neden olduğu, bunun sonucunda da serbest radikallerin aşırı üretimi ve bozulmuş homeostaz nedeniyle böbrek, karaciğer ve solungaçta GST, SOD ve CAT gibi enzimlerin aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Gupta ve diğ, 2016).



Şekil 5.2: Yedi ve yirmi bir günlük ZnO uygulamasında GST, GR ve CAT düzeyleri (Çizelge 4.5'te verilen verilerden hazırlanmıştır)

GST indüksiyonu, biyolojik sistemlerin güvenli olmayan bir ortama maruz kalmaktan kaynaklanan stresin kısmen veya tamamen üstesinden gelmesine izin veren bir adaptasyon olarak düşünülebilir (Liu ve diğ, 2006). Daha önce Cd(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂, ve CuSO₄ metal tuzlarının 46. evre *X. laevis* iribaşlarında etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada metal tuzlarının her üçü de GST indüksiyonuna neden olurken, kadmiyum ve kurşun tuzları GR indüksiyonuna da neden olmuşlardır (Gungordu ve diğ, 2010). Metallerin bu etkisi, ROT üretimine yol açan oksidatif reaksiyonları katalizleme kapasiteleriyle ilişkili olabilir. GSH'nin metallere bağlandığı bilindiğinden, GST'nin

detoksifikasyon rolü, GSH'nin metallere konjugasyonunu katalizlemesi ile ilişkilendirilmektedir (Hellou ve diğ, 2012).

Ayrıca, 7 günlük ZnO NP uygulaması için 0.001 mg/L ve üzeri konsantrasyonlar, 21 günlük uygulama için ise 0.1 ve 1 mg/L ZnO konsantrasyonları CAT aktivitesinde indüksiyona neden oldu (Çizelge 4.5). Diğer yandan, 7 günlük 0.001 mg/L ZnO NP konsantrasyonu kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli düzeyde AChE indüksiyona neden oldu ($p<0.05$). AChE'nin yaygın olarak bilinen işlevi sinir sinyali iletdikten sonra postsinaptik membranda asetilkolin uyarımının kesintiye uğramasını sağlamak iken, AChE'nin erken embriyogenez sırasında beyin ve sinir sisteminin geliştirilmesinde de rol oynadığı bilinmektedir (Venturino ve diğ, 2003). Önceki çalışmalar ayrıca TH'nin sinir sisteminin normal gelişimi için gerekli olduğunu ve *X. laevis*'te omurilikteki nörogenezi düzenlediğini göstermiştir (Schlosser ve diğ, 2002; Tindall ve diğ, 2007). Bu açıdan, AChE aktivitesindeki artış, ZnO NP'lerin sinir sistemi gelişimi üzerine etkisi ile ilgili olabilir.

5.3 CeO₂ NP Toksikitesi ile İlgili Değerlendirmeler

CeO₂ NP'lerin yüzey sularında giderek arttığı, Avrupa yüzey sularında tahmin edilen çevresel konsantrasyonun yaklaşık 0.76 ng/L olduğu bildirilmiştir (Sendra ve Blasco, 2018). Çevresel sularda bulunması muhtemel konsantrasyon, çalışmamızda test ettiğimiz en düşük konsantrasyondan (1µg/L) düşük olsa bile kullanımlarına bağlı olarak çevresel sularda bulunan CeO₂ NP konsantrasyonlarında artış olması beklenmektedir.

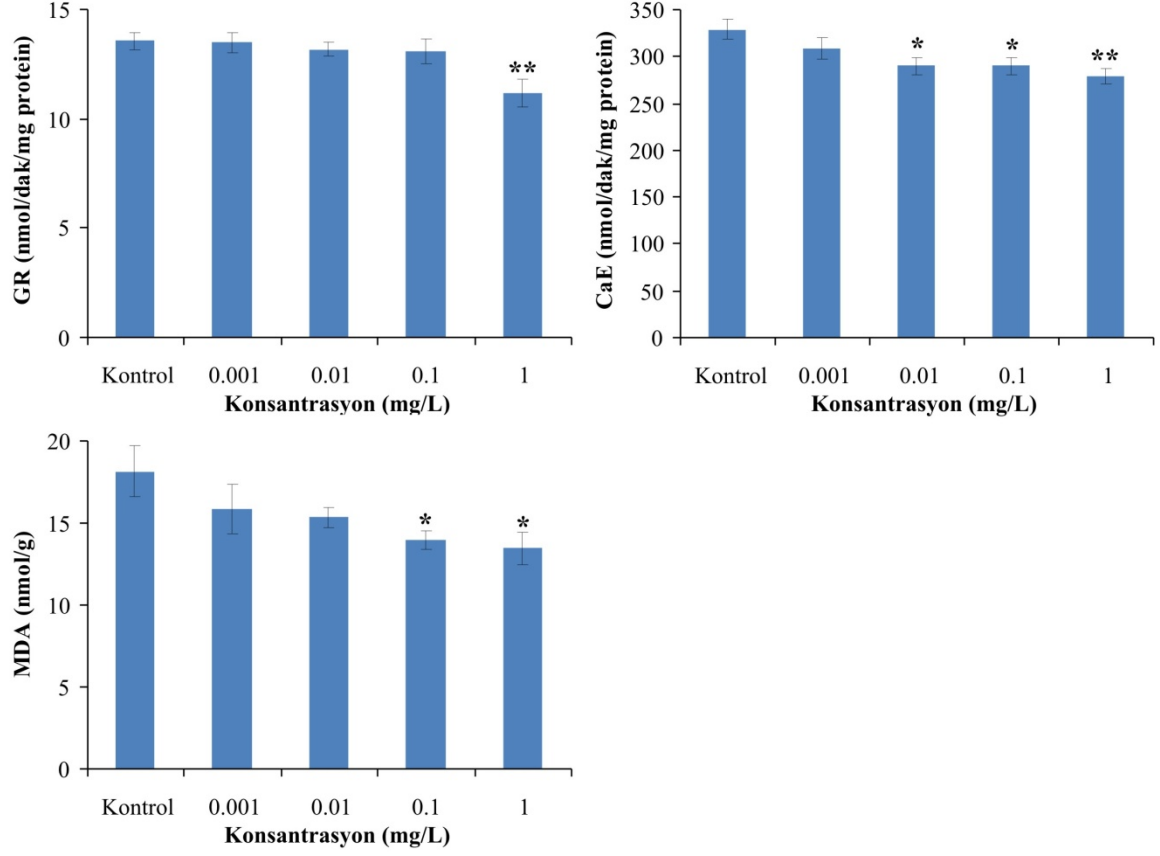
CeO₂ NP ekotoksikolojik etkileri bakteriler (Thill ve diğ, 2006), karasal omurgasızlar (Roh ve diğ, 2010) , bitkiler (Zhao ve diğ, 2012), algler (Manier ve diğ, 2013) ve amfibiler (Bour ve diğ, 2015) gibi farklı biyolojik modellerle ortaya konulmuştur. Belirtilen çalışmalar su kontaminasyonu durumunda maruz kalmanın sadece pelajik organizmaları değil, aynı zamanda bentik organizmaları da etkileyeceğini göstermektedir. Ancak belirtilen çalışmalar akut etkileri ortaya koymakta, akut etkilere neden olmayan, çevrede olma ihtimali daha yüksek konsantrasyonlara kronik maruz kalma durumunda bu NP'lerin neden olabilecekleri etkiler çoğunlukla göz ardı edilmektedir.

Bour ve diğ, (2015) boyutları farklı iki CeO₂ NP'nin 0.1 ile 10 mg/L arasında 5 farklı konsantrasyona maruz bırakılan *X. laevis* embriyolarında ölüm oranı, büyüme inhibisyonu ve genotoksik etkileri değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, en yüksek konsantrasyonlarda bile,

kısa maruziyetlerden sonra akut toksisite oluşmadığını ortaya koymaktadır. Bir tür CeO₂ NP'nin en yüksek konsantrasyonunda 12 günlük maruziyetten sonra *X. laevis* larvalarında %35 ölüm oranı gözlenmiştir. *X. laevis* larva büyümesi, her iki NP'nin 1 mg/L konsantrasyonunca inhibe edilmiştir. *X.laevis*'te hiçbir genotoksik etki gözlenmemiştir.

Çalışmamızda 0.001-1 mg/L aralığında CeO₂ NP konsantrasyonuna maruz bırakılan iribaşlarda 7 gün sonunda ölçülen büyüme parametreleri açısından herhangi bir değişiklik belirlenmezken, 0.001 mg/L konsantrasyonu kontrolle kıyaslandığında arka bacak uzunluğunda artışa neden oldu ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). Tiroit hormonlarının kurbağa iribaşlarında metamorfoz için gerekli olduğu bilinmektedir. Pestisitler ve metaller de dahil olmak üzere birçok kimyasal, TH'ler üzerinde akut veya kronik etkiler gösterir ve TH dengesindeki bir değişiklik kurbağa iribaşlarında fizyolojik değişikliklere neden olur (Lajmanovich ve diğ, 2019; Miyata ve Ose, 2012). Yüksek düzeydeki endojen T4'ün gelişmeyi klimaksa çıkardığı bilinmektedir, ancak kurbağa yavrularına metamorfozu tamamlamak için daha aktif T3 hormonu gerektiğinden, metamorfozun ilerlemesi durmaktadır (Brown ve Cai, 2007). Bu nedenle, çevreye verilen maddelerin toksik etki göstermemesi veya toksik konsantrasyonun çok altında olması canlı gelişimi ve ekosistem açısından olumsuz sonuçlar doğurabilir. Maruz kalınan konsantrasyonun büyümei indüklemesi ekosistem canlı elemanları arasında dengenin biri lehine bozulmasına yol açabilir.

Diğer yandan test edilen CeO₂ NP'ler letal değilken, 7 gün süreyle uygulana CeO₂ NP konsantrasyonlarının tamamı GR ve CaE aktivitelerinde azalmaya neden oldu ve 1 mg/L CeO₂ NP konsantrasyonunun iribaşlarda neden olduğu GR inhibisyonu kontrol gurubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 5.3) ($p<0.05$). GR aktivitesindeki azalma, pro oksidatif etkinin bir sonucu olan GSH'nin tükenmesinden kaynaklanabilir (yani, redoks durumunu korumak için daha fazla GSH sentezleme olasılığı olmadığında) (Anila ve diğ, 2021).



Şekil 5.3: Yedi günlük CeO₂ uygulamasında GR, MDA ve CaE düzeyleri (Çizelge 4.7’de verilen verilerden hazırlanmıştır)

Sonuç olarak test edilen NP’lerin subletal konsantrasyonlarına sub-akut maruziyet *X. laevis* iribaşlarında toksik ve endokrin bozucu etkilere neden olmuştur. Çalışmada biyobelirteç olarak seçilen GST, GR ve CAT enzimleri ve MDA düzeyi test edilen NP konsantrasyonlarının neden olduğu oksidatif stresi yansıtmaya açısından uygun biyobelirteçlerdir. TH düzeyleri ve gelişim parametreleri belirtilen NP’lerinin test edilen konsantrasyonların etkilerini yansıtmaya açısından daha az etkili olmuşlardır. ZnO NP diğer NP’lere kıyasla daha toksik bulunmuştur. Çalışmada biyobelirteçlerde görülen değişimler, organizmaların güvenli olmayan bir ortama maruz kalmaktan kaynaklanan stresle baş etmeye yönelik bir adaptasyonu olarak düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aguilar-Perez, K. M., Aviles-Castrillo, J. I., Ruiz-Pulido, G., Medina, D. I., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2021). Nanoadsorbents in focus for the remediation of environmentally-related contaminants with rising toxicity concerns. *Science of the Total Environment*, 779, 146465.
- Anila, P. A., Sutha, J., Nataraj, D., & Ramesh, M. (2021). In vivo evaluation of Nanopalladium toxicity on larval stages and adult of zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 765.
- ASTM. (2003). *American Society for Testing and Materials, Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), E1439-98*. In: *ASTM Standards on Biological Effects and Environmental Fate. Vol. 11.05. Philadelphia, PA, 447-457*.
- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I. O., & Rivera, H. F. (2013). Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 15(1), 225-233.
- Babalola, O. O., Truter, J. C., Archer, E., & van Wyk, J. H. (2020). Exposure impacts of environmentally relevant concentrations of a glufosinate ammonium herbicide formulation on larval development and thyroid histology of *Xenopus laevis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 717-725.
- Babalola, O. O., & van Wyk, H. J. (2021). Exposure Impacts of Diquat dibromide herbicide formulation on amphibian larval development. *Heliyon*, 7(4), e06700.
- Bacchetta, R., Santo, N., Fascio, U., Moschini, E., Freddi, S., Chirico, G. (2012). Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*, 6(4), 381-398.
- Baig, N., Kammakam, I., & Falath, W. (2021). Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821-1871.
- Bauer, S., Park, J., Faltenbacher, J., Berger, S., von der Mark, K., & Schmuki, P. (2009). Size selective behavior of mesenchymal stem cells on ZrO₂ and TiO₂ nanotube arrays. *Integr Biol (Camb)*, 1(8-9), 525-532.
- Benavides, M., Fernandez-Lodeiro, J., Coelho, P., Lodeiro, C., & Diniz, M. S. (2016). Single and combined effects of aluminum (Al₂O₃) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24578-24591.
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M. L., Bistoni, M. D., Ame, M. V. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial

formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, 67, 88-97.

- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid-Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931-1937.
- Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E. (2015). Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels - Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere*, 120, 230-236.
- Boxall, A. B. (2004). The environmental side effects of medication. *EMBO Rep*, 5(12), 1110-1116.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brown, D. D., & Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Dev Biol*, 306(1), 20-33.
- Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 40(14), 4374-4381.
- Buchholz, D. R. (2015). More similar than you think: Frog metamorphosis as a model of human perinatal endocrinology. *Developmental Biology*, 408(2), 188-195.
- Chen, X., & Mao, S. S. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical Reviews*, 107(7), 2891-2959.
- Chen, Y. S., Hung, Y. C., Liao, I., & Huang, G. S. (2009). Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, 4(8), 858-864.
- Choi, J. S., Kim, R. O., Yoon, S., & Kim, W. K. (2016). Developmental Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*): A Transcriptomic Analysis. *Plos One*, 11(8).
- Connolly, M., Fernandez, M., Conde, E., Torrent, F., Navas, J. M., & Fernandez-Cruz, M. L. (2016). Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. *Science of the Total Environment*, 551-552, 334-343.
- Couderq, S., Leemans, M., & Fini, J. B. (2020). Testing for thyroid hormone disruptors, a review of non-mammalian in vivo models. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 508.
- Dang, Z. (2019). Endpoint sensitivity in Amphibian Metamorphosis Assay. *Ecotoxicol Environ Saf*, 167, 513-519.

- Degitz, S. J., Holcombe, G. W., Flynn, K. M., Kosian, P. A., Korte, J. J., & Tietge, J. E. (2005). Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. *Toxicol Sci*, *87*(2), 353-364.
- EC. (2012). European Commission: Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee-Second Regulatory Review on Nanomaterials (Document 52012DC0572).
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*, 88-95.
- EPA. (2019). *Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1100: Amphibian Metamorphosis (Frog)*. from USEP Agency website.
- Eriyamremu, G. E., Osagie, V. E., Omoregie, S. E., & Omofoma, C. O. (2008). Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *71*(1), 284-290.
- Fahmy, B., & Cormier, S. A. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, *23*(7), 1365-1371.
- Fort, D. J., Mathis, M. B., Hanson, W., Fort, C. E., Navarro, L. T., Peter, R. (2011). Triclosan and thyroid-mediated metamorphosis in anurans: differentiating growth effects from thyroid-driven metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*, *121*(2), 292-302.
- Frohlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 5577-5591.
- Furlow, J. D., & Neff, E. S. (2006). A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *17*(2), 38-45.
- Ge, Y. M., Ren, F., Chen, L. L., Hu, D. F., Wang, X. R., Cui, Y. L. (2021). Bisphenol A exposure induces apoptosis and impairs early embryonic development in *Xenopus laevis*. *Environmental Pollution*, *280*.
- Genix, A. C., & Oberdisse, J. (2018). Nanoparticle self-assembly: from interactions in suspension to polymer nanocomposites. *Soft Matter*, *14*(25), 5161-5179.
- Glaberman, S., Kiwiet, J., & Aubee, C. B. (2019). Evaluating the role of fish as surrogates for amphibians in pesticide ecological risk assessment. *Chemosphere*, *235*, 952-958.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, *43*(24), 9216-9222.

- Gungordu, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 140-141, 220-228.
- Gungordu, A., Birhanli, A., & Ozmen, M. (2010). Assessment of embryotoxic effects of cadmium, lead and copper on *Xenopus laevis*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(11), 2528-2535.
- Gupta, Y. R., Sellegounder, D., Kannan, M., Deepa, S., Senthilkumaran, B., & Basavaraju, Y. (2016). Effect of copper nanoparticles exposure in the physiology of the common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical, histological and proteomic approaches. *Aquaculture and Fisheries*, 1, 15-23.
- Güngördü, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 140, 220-228.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, 114, 40-50.
- Haynes, V. N., Ward, J. E., Russell, B. J., & Agrios, A. G. (2017). Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms-Current knowledge and suggestions for future research. *Aquatic Toxicology*, 185, 138-148.
- Hellou, J., Ross, N. W., & Moon, T. W. (2012). Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(6), 2007-2023.
- Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T. (2003). Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol*, 133(2), 189-198.
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145-150.
- Khan, S. A. (2020). Chapter 1 - Metal nanoparticles toxicity: role of physicochemical aspects. In M. R. Shah, M. Imran, & S. Ullah (Eds.), *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 1-11): Elsevier.
- Klaassen, C. D., Casarett, L. J., & Doull, J. (2013). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons* (8th ed.). New York: McGraw-Hill Education.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825-1851.

- Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2008). Chemical Carcinogenesis, IN: Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 7th Ed., C.D. Kleessen (Ed.), Mc Graw Hill Pub., pp. 329-379.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Martinuzzi, C. S., Simoniello, M. F., Colussi, C. L. (2019). First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10), e02601.
- Li, M., Li, S. Y., Yao, T. T., Zhao, R. J., Wang, Q. W., & Zhu, G. N. A. (2016). Waterborne exposure to triadimefon causes thyroid endocrine disruption and developmental delay in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 177, 190-197.
- Liu, H., Wang, W. M., Zhang, J. F., & Wang, X. R. (2006). Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 350-354.
- Lopes, S., Ribeiro, F., Wojnarowicz, J., Lojkowski, W., Jurkschat, K., Crossley, A. (2014). Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 190-198.
- Manier, N., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O., & Pandard, P. (2013). Ecotoxicity of non-aged and aged CeO₂ nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 180, 63-70.
- Maynard, A. D., Aitken, R. J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdorster, G. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444(7117), 267-269.
- Miyata, K., & Ose, K. (2012). Thyroid hormone-disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. *Journal of Toxicologic Pathology*, 25(1), 1-9.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346-2353.
- Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. (1956). *Normal Table of Xenopus laevis (daudin): A Systematical and Chronologica Survey of the Development From the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. Amsterdam: North Holland Publishing Co.
- Nikzamid, M., Akbarzadeh, A., & Panahi, Y. (2021). An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., & Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823-839.
- OECD. (2009). *Test Guideline No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems* Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1787/9789264076242-en>

- OECD. (2019). *Test Guideline No. 248: Xenopus Eleutheroembryo Thyroid Assay (XETA), Section 2: Effects on Biotic Systems*
- Oh, W. K., Kim, S., Choi, M., Kim, C., Jeong, Y. S., Cho, B. R. (2010). Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica - titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. *ACS Nano*, 4(9), 5301-5313.
- Opitz, R., Hartmann, S., Blank, T., Braunbeck, T., Lutz, I., & Kloas, W. (2006). Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicological Sciences*, 90(2), 337-348.
- Ozgun, M. E., Ulu, A., Balcioglu, S., Ozcan, I., Koytepe, S., & Ates, B. (2018). The toxicity assessment of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles on physical and biochemical quality of rainbow trout spermatozoon. *Toxics*, 6(4).
- Ozmen, M., Dominguez, S. E., & Fairbrother, A. (1998). Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(2), 194-201.
- Ozmen, M., Gungordu, A., Erdemoglu, S., Ozmen, N., & Asilturk, M. (2015). Toxicological aspects of photocatalytic degradation of selected xenobiotics with nano-sized Mn-doped TiO₂. *Aquatic Toxicology*, 165, 144-153.
- Ozmen, M., Gungordu, A., & Geckil, H. (2020). Ecotoxicity of Nanomaterials in Aquatic Environment. In D. Thangadurai, J. Sangeetha, & R. Prasad (Eds.), *Nanotechnology for Food, Agriculture, and Environment* (pp. 351-377): Springer, Cham.
- Özgünen, T. (1994). *Xenopus laevis' te Deneysel Embriyoloji, Ders Notu*. Adana.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9).
- Prati, M., Biganzoli, E., Boracchi, P., Tesauro, M., Monetti, C., & Bernardini, G. (2000). Ecotoxicological soil evaluation by FETAX. *Chemosphere*, 41(10), 1621-1628.
- Reed, B. T. (2005). Guidance on the housing and care of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. Horsham, UK: RSPCA.
- ReportLinker. (2021). Global Nanotechnology Industry. https://www.reportlinker.com/p0326269/Global-Nanotechnology-Industry.html?utm_source=GNW.
- Rizzo, A. M., Adorni, L., Montorfano, G., Rossi, F., & Berra, B. (2007). Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 146(1), 94-100.
- Roh, J. Y., Park, Y. K., Park, K., & Choi, J. (2010). Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(2), 167-172.

- Saddick, S., Afifi, M., & Abu Zinada, O. A. (2017). Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1672-1678.
- Santhoshkumar, P., & Shivanandappa, T. (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 277-282.
- Santore, R. C., Di Toro, D. M., Paquin, P. R., Allen, H. E., & Meyer, J. S. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(10), 2397-2402.
- Schlosser, G., Koyano-Nakagawa, N., & Kintner, C. (2002). Thyroid hormone promotes neurogenesis in the *Xenopus* spinal cord. *Dev Dyn*, 225(4), 485-498.
- Seabra, A. B., & Haddad, P. S. (2014). Cytotoxicity and Genotoxicity of Iron Oxides Nanoparticles. In N. Durán, S. S. Guterres, & O. L. Alves (Eds.), *Nanotoxicology-Materials, Methodologies, and Assessments* (pp. 265-279): Springer
- Sendra, M., & Blasco, J. (2018). Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles. *Ecological Indicators*, 95, 1053-1067.
- Sharma, S., & Bhattacharya, A. (2017). Drinking water contamination and treatment techniques. *Applied Water Science*, 7(3), 1043-1067.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., & Forlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 431-442.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., & Klabunde, K. J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679-6686.
- Svanholm, S., Safholm, M., Brande-Lavridsen, N., Larsson, E., & Berg, C. (2021). Developmental reproductive toxicity and endocrine activity of propiconazole in the *Xenopus tropicalis* model. *Science of the Total Environment*, 753, 141940.
- Tamschick, S., Rozenblut-Koscisty, B., Ogielska, M., Kekenj, D., Gajewski, F., Kruger, A. (2016). The plasticizer bisphenol A affects somatic and sexual development, but differently in pipid, hylid and bufonid anurans. *Environ Pollut*, 216, 282-291.
- Thambirajah, A. A., Koide, E. M., Imbery, J. J., & Helbing, C. C. (2019). Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 276.
- Thill, A., Zeyons, O., Spalla, O., Chauvat, F., Rose, J., Auffan, M. (2006). Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental Science & Technology*, 40(19), 6151-6156.

- Tierbach, A., Groh, K. J., Schonenberger, R., Schirmer, K., & Suter, M. J. (2018). Glutathione S-transferase protein expression in differentl Stages ofz Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*, *162*(2), 702-712.
- Tindall, A. J., Morris, I. D., Pownall, M. E., & Isaacs, H. V. (2007). Expression of enzymes involved in thyroid hormone metabolism during the early development of *Xenopus tropicalis*. *Biol Cell*, *99*(3), 151-163.
- USEPA. (2009). *U.S. Environmental Protection Agency. Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response*. <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>. Accessed date: 20 May 2020.
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, *13*(2), 57-149.
- Vaseem, M., Umar, A., & Hahn, Y. B. (2010). ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. In: Umar, A., Hahn, Y.-B. (Eds.), *Metal Oxide Nanostructures and their Applications*. American Scientific Publishers, Los Angeles, USA, 1–36.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero de Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich de Schroeder, T. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*, *8*(3-4), 167-186.
- Wang, Y., Deng, L., Caballero-Guzman, A., & Nowack, B. (2016). Are engineered nano iron oxide particles safe? an environmental risk assessment by probabilistic exposure, effects and risk modeling. *Nanotoxicology*, *10*(10), 1545-1554.
- Weltje, L., Simpson, P., Gross, M., Crane, M., & Wheeler, J. R. (2013). Comparative acute and chronic sensitivity of fish and amphibians: A critical review of data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(5), 984-994.
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, *30*(2), 75-83.
- Wiesner, M. R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D., & Biswas, P. (2006). Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, *40*(14), 4336-4345.
- Wu, F., Harper, B. J., & Harper, S. L. (2019a). Comparative dissolution, uptake, and toxicity of zinc oxide particles in individual aquatic species and mixed populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *38*(3), 591-602.
- Wu, G. Z., Zhang, Z., Chen, X., Yu, Q. L., Ma, X. Y., & Liu, L. (2019b). Chemosensitization effect of cerium oxide nanosheets by suppressing drug detoxification and efflux. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*, 301-308.
- Wu, S., Lei, L., Liu, M., Song, Y., Lu, S., Li, D. (2018). Single and mixture toxicity of strobilurin and SDHI fungicides to *Xenopus tropicalis* embryos. *Ecotoxicology Environmental Safety*, *153*, 8-15.

- Xu, Y., Jang, J. H., & Gye, M. C. (2021). 4-Octylphenol induces developmental abnormalities and interferes the differentiation of neural crest cells in *Xenopus laevis* embryos. *Environmental Pollution*, 274.
- Yaoita, Y. (2019). Tail Resorption During Metamorphosis in *Xenopus* Tadpoles. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 143.
- Yologlu, E., & Ozmen, M. (2015). Low concentrations of metal mixture exposures have adverse effects on selected biomarkers of *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 168, 19-27.
- Zhang, H. Y., Ji, Z. X., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R. (2012). Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation. *ACS Nano*, 6(5), 4349-4368.
- Zhang, Y., Li, Y., Qin, Z., Wang, H., & Li, J. (2015). A screening assay for thyroid hormone signaling disruption based on thyroid hormone-response gene expression analysis in the frog *Pelophylax nigromaculatus*. *J Environ Sci (China)*, 34, 143-154.
- Zhao, L. J., Peralta-Videa, J. R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C. Q., Zhang, J. Y. (2012). Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 225, 131-138.
- Zhu, X. S., Zhu, L., Duan, Z. H., Qi, R. Q., Li, Y., & Lang, Y. P. (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 43(3), 278-284.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Eren ARSLAN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2012, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

