



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI QUANTUM DOT'LARIN ZEBRA
BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822)
ÜZERİNDE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

NUR KALUÇ

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nagihan Gülsoy

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FARKLI QUANTUM DOT'LARIN ZEBRA
BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822)
ÜZERİNDE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

NUR KALUÇ

(72014006)

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nagihan Gülsoy

İSTANBUL, 2020

TEŞEKKÜR

Öncelikle, doktora tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY'a; Tez izleme komitelerimde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU GEZGİNCİ ve Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a, Sayın Jüri üyelerim Prof. Dr. Lütfiye ERYILMAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Özal MUTLU'ya;

Tez çalışması boyunca özellikle deneysel aşamalarımnda yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Irmak BİLGİSEVEN'e; Hem laboratuvar imkanlarını paylaşan hem de tez çalışması süresince manevi desteklerini esirgemeyen Maltepe Üniversitesi (MAU) Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Ranan GÜLHAN AKTAŞ hocama; merkez Müdür Yardımcısı Dr. Zeynep AKBULUT, Hatice MARAŞ, Damla KAYALI ve Reyhan ULUGÖL'e; en kritik aşamalarda hem teknik hem de manevi olarak destek veren MAU Tıp Fakültesi'nden Lab.Tek.Rana KIZILKAYA ve Üsküdar Üniversitesi SHMYO Müdür Yardımcısı Öğr. Gör. Ömer Faruk KARASAKAL'a; MAU Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden, Vet. Hek. Barış KANBUROĞLU ve Vet. Hek. Necdet ALTINER'e; MAU Tıp Fakültesi Hastanesi'nden Sayın Başhekim Doç. Dr. David Terence THOMAS ve Başhekim Yardımcısı Doç. Dr. M. Erinç SİTAR hocalarıma;

Tez sürecimin en kritik aşaması olan yayınlanma sürecinde ve her zor anımda yanımda olarak manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen MAU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Pınar Buket DEMİREL'e

Tez çalışmam süresince ve de öncesinde, her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bana bu çalışmayı tamamlayabilme gücü veren değerli ailem; annem Nilgün KALUÇ'a, bana okuma ve yazmayı öğreten ablam Pelin Zeynep KALUÇ'a; Sayın BAŞARAN, TERZİ, GEDİK ve ŞENERZE ailelerine;

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) (Proje No: FEN-C-DRP-120917-0538 ve FEN-A-200716-037 ve Bilim İnsanı Destekleme Programı 2211-C Öncelikli Alanlar kapsamında verdikleri destek için TÜBİTAK'a;

Ve son olarak, doktora eğitimim sırasında aramızdan ayrılan sevgili babam merhum gazeteci Sayın Tefik Cengiz KALUÇ'a
Teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2020

Nur KALUÇ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
YENİLİK BEYANI.....	viii
SEMBOLLER	ix
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Nanomateriyaller.....	2
1. 2. Nanotoksikoloji.....	4
1. 3. Quantum Dot'lar	6
1.3.1. Quantum Dot'ların yapısı ve kullanım alanları	7
1.3.2. Quantum Dot'ların toksisitesi.....	11
1.3.3. Kadmiyum içermeyen Quantum Dot'lar	13
1.4. Bir model organizma olarak zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)	14
1.5. Tez çalışmasında ifadeleri incelenen biyomarkör proteinler	15
1.5.1. Isı Şoku proteini 90 (Hsp90).....	16
1.5.2. Peroksiredoksin 1 (Prdx1)	17
1.5.3. Rad51 Rekombinaz (Rad51).....	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Deney Kitleri.....	24
2.2. Kullanılan Cihazlar	26
2.3. Quantum Dot'lar ve CdCl ₂	27
2.4. Balıkların Laboratuvar Ortamına Alıştırılması, <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> Deneylerin Kurulması.....	28
2.4.1. Balıklara kimyasal uygulanması	28
2.4.2. Primer hepatosit kültürü eldesi	29
2.5. Akvaryum Suyu, Besiyeri ve Hücre İçi Kadmiyum Miktarlarının Belirlenmesi	31
2.6. Quantum Dot'ların ve CdCl ₂ 'ün Primer Kültürdeki Hepatositler Üzerindeki Sitotoksitesinin Belirlenmesi	32

2.6.1.WST-1 Testi ile çekirdek QD'ler için LC ₅₀ değerinin ve tüm QD'lar ile CdCl ₂ 'nin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi	32
2.6.2.Hücre kültüründe reaktif oksijen türlerinin tespiti.....	34
2.7.Reaktif Oksijen Türlerinin Doku Düzeyinde Belirlenmesi	35
2.8. Comet Analizi	36
2.9. Western Blot Analizi	39
2.10. Histopatolojik Etkilerin Belirlenmesi	44
2.11. İstatistiksel Analiz.....	45
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
3.1. Akvaryum Suyu, Besiyeri, Hücre İçi ve Dokularda Cd ²⁺ Miktarı.....	47
3.2. Hücre Canlılığı.....	52
3.3. Reaktif Oksijen Türleri Birikimi.....	54
3.4. Genotoksik Etkiler	59
3.5. Hsp90, Prdx1 ve Rad51 seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi	66
3.6. Histopatolojik Bulgular.....	78
4. SONUÇLAR.....	93
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ÖZET

FARKLI QUANTUM DOT'LARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) ÜZERİNDE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Quantum dot'lar (QD'lar) 2-10 nm partikül çapında, küresel, gelişmiş optoelektronik özelliklere sahip yarı iletken nanomateriyallerdir. Özgün fizikokimyasal özellikleriyle QD'lar güneş pilleri, lazerler ve televizyon ekranları gibi optik ve elektronik alanlarda kullanım avantajı sağladığı kadar, biyogörüntüleme ve hedeflenmiş ilaç teslimi gibi biyolojik alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımlarına rağmen, klasik bir QD nanomateriyalinin yapısında genellikle kadmiyum bulunmasından dolayı canlılar için toksik olabilmektedirler. Bu nedenle QD kullanımından kaynaklanan toksisiteyi azaltmak için QD molekülüne kabuk veya kaplamalar eklenmiş veya kadmiyum içermeyen QD'lar üretilmiştir. Fakat, hücrenin asidik ortamı nedeniyle, kaplamalar veya kabuklar aşınır ve geriye çıplak bir QD molekülü kalır. Ayrıca QD'ların, içeriğinde bulunan kadmiyum harici diğer bileşenlerinin hücresel ortama salınmasıyla da toksisiteye neden olma ihtimali vardır. Bu nedenlerle çekirdek, çekirdek/kabuk ve kadmiyum içermeyen olmak üzere bu üç tip QD'un risk değerlendirmesi karşılıklı olarak gerçekleştirilmelidir.

Bu tez çalışmasında kadmiyum içeren çekirdek tip QD'lar, çekirdek/kabuk tip QD'lar, kadmiyum içermeyen QD'lar ve CdCl₂'ün toksikolojik risk analizi, bir model organizma olan zebra balığında *in vivo* ve *in vitro* koşullarda karşılaştırmalı olarak gerçekleştirildi. *In vitro* deneyler balık karaciğerlerinden primer hepatosit kültürü elde edilerek, *in vivo* deneyler ise balıkların akvaryum suyu vasıtasıyla bu farklı tiplerdeki QD'larla maruziyeti ile gerçekleştirildi. Sonuçlar, kadmiyum içeren QD'ların primer kültürdeki hepatositlerde hücre ölümüne sebep olduğunu gösterirken, kadmiyum içermeyen QD'lara ve CdCl₂'e maruz kalan hepatositlerde hücre canlılığının korunduğunu göstermektedir. Fakat her ne kadar hücre canlılığında gözlemlenen değişimler birbirinden farklı olsa da, bu materyallerin reaktif oksijen türlerinde (ROT) artışa sebep olduğu hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemlerle belirlendi. Bunlara ilaveten, hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda QD'ların ve CdCl₂'ün, DNA iplik kırıklarını

indüklediği comet analizi ile belirlendi. Ayrıca, western blot analizi ile biyomarkör proteinler olan Hsp90, Prdx1 ve Rad51 ifadeleri incelendi. QD veya CdCl₂'a maruziyet durumunda, bir stres belirteci olan Hsp90'ın artışı, hücrelerde veya dokularda bir stresin oluştuğunu, antioksidan sistem elemanı olan Prdx1 artışı, antioksidan dengenin bozulduğunu ve DNA çift iplik kırıkları tamirinde görev alan Rad51 seviyelerinin azalması ise bu materyallerin DNA hasar tamiri mekanizmasını da etkilediğini göstermektedir. Son olarak, bu nanomateriyallerin akuatik çevrenin en değerli canlı gruplarından biri olan balıklarda hayati öneme sahip olan solungaç ve karaciğer dokularında histopatolojik etkilere sebep olduğu, organizmaya ciddi zararlar verdiği belirlendi.

Yapılan çalışma ile kadmiyum içeren veya içermeyen tüm QD'ların hem sitotoksik hem de genotoksik etkiler meydana getirerek zebra balığı hepatositlerine, solungaçlarına ve karaciğerine zarar verdiği belirlendi. Unutmamalıdır ki, bu materyallerin kullanımıyla ortaya çıkan istenmeyen etkiler, hedef dışı canlıları da son kullanıcılar kadar etkilemektedir ve çevre sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle bu materyaller kontrollü olarak kullanılmalıdır ve atık yönetimleri mutlaka kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirilmelidir.

Temmuz, 2020

Nur KALUÇ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE TOXICOLOGIC EFFECTS OF DIFFERENT TYPES OF QUANTUM DOTS ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822)

Quantum dots (QDs) are spherical semiconductor nanomaterials with 2-10 nm diameter and advanced optoelectronic properties. Owing to their unique physicochemical properties, QDs have advantages in optical and electronic areas such as solar cells, lasers and displays, as well as in biological fields such as bioimaging and targeted drug delivery. Despite these wide usage areas, they can be toxic to living organisms, as cadmium is usually present in the structure of a classic QD nanomaterial. Therefore, in order to reduce the toxicity caused by the usage of QDs, shell or coatings have been coated onto the QD molecule; or cadmium-free QDs have been synthesized. However, because of the acidic environment of the cell, coatings or shells would be degraded and a naked QD molecule would be remained. Moreover, there is also the possibility of causing toxicity by releasing other components to cellular environment, instead of cadmium. For these reasons, the risk assessment of these three types of QD, including the core, core/shell and cadmium free types, should be performed comparatively.

In this thesis, toxicological risk analysis of Cd-based core, Cd-based core/shell, Cd-free QDs and CdCl₂ was comparatively performed in the zebrafish model at both *in vivo* and *in vitro* conditions. *In vitro* experiments were performed by establishing a primary hepatocyte culture from liver, and *in vivo* experiments were conducted by directly exposure of fish to these different types of QDs via aquarium water. Results showed that cadmium-containing QDs lead to cell death in primary cultured zebrafish hepatocytes, while hepatocytes exposed to cadmium-free QDs and CdCl₂ remained viable. However, while the effects on the cell viability differs, it was determined by both *in vivo* and *in vitro* methods that these materials resulted in an increase of reactive oxygen species (ROS). In addition, we observed that both QDs and CdCl₂ induced DNA strand breaks both *in vivo* and *in vitro*, determined by comet analysis. Moreover, regulation of biomarker proteins; Hsp90, Prdx1 and Rad51 were determined by western blot analysis. In response to QDs

or CdCl₂, we observed an upregulation in Hsp90, a stress biomarker, implies that a stress occurred in cells or tissues; upregulation of the antioxidant system protein Prdx1, indicates that the antioxidant balance is impaired; and downregulation of Rad51, which involves in the repair of DNA double strand breaks, showed that these materials also affected the DNA repair mechanism. Lastly, it was determined that these materials resulted in histopathological effects in the gill and liver tissues, which have vital importance for fish, one of the most valuable organisms of the aquatic environment, and induced serious damage.

In this study, we determined that both cadmium containing and cadmium free QDs damage zebrafish hepatocytes, gills and liver by triggering both cytotoxicity and genotoxicity. It should not be forgotten that the undesirable effects caused by the use of these materials can affect non-targeted organisms as much as the end users, and negatively affect the environmental health. For this reason, these materials should be used in a controlled manner and waste management should be carried out in accordance with the rules.

July, 2020

Nur KALUÇ

YENİLİK BEYANI

FARKLI QUANTUM DOT'LARIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) ÜZERİNDE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLLENMESİ

Quantum Dot'ların (QD'lar) benzersiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde mikron boyutlu maddelere göre üstün avantajlar sunması, hem üretiminin hem de kullanım alanlarının gün geçtikçe artmasına yol açmıştır. Optik ve elektronik alanlarda kullanımının yanı sıra, biyolojik uygulamalar ve sağlık sektöründe de kullanılmaya başlanması neticesinde, bu moleküllerin hem insanlarla hem de hedef dışı organizmalarla teması artmakta olup, ekolojik risk değerlendirmesinin farklı organizmalarda ve detaylı analizlerle gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Her ne kadar QD toksisitesini azaltmak amacıyla gerçekleştirilen yaklaşımların ürünü olan çekirdek/kabuk tip QD veya kadmiyum içermeyen QD'ların üretimi ile bu toksisitenin önüne geçilmek hedeflense de, literatür incelendiğinde çekirdek, çekirdek/kabuk ve kadmiyum içermeyen farklı QD'ların beraber değerlendirildiği bir toksikoloji çalışması bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışması ile literatürdeki bu karşılaştırmalı analizin eksikliği giderilmiş olup, hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemlerin kullanılması ile detaylı bir değerlendirme yapılmıştır.

Bunlara ilaveten, toksikolojik analizlerin yapıldığı çalışmalarda genel olarak *in vitro* sonuçların *in vivo* sonuçların yerini tutmayacağı, etkilerin birbirine yakın olmayacağı kanaati yaygındır. Bu çalışmada hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemler ile QD toksisitesi araştırılarak, aynı zamanda bu yöntemler arasındaki karşılaştırmaya da imkân sunulmuştur. Ayrıca, bu toksisite çalışması ilk kez ergin bir balık türünde *in vivo* olarak gerçekleştirilmiş olup, ulusal ve uluslararası literatüre katkı sağlayacağı ümit edilmektedir.

SEMBOLLER

%	: Yüzde
ζ	: Zeta
°C	: Santigrat Derece
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
Ag ₂ S	: Gümüş Sülfür
Ag ₂ Se	: Gümüş Selenid
dH ₂ O	: Distile su
Cd	: Kadmiyum
CdCl ₂	: Kadmiyum Klorür
CdS	: Kadmiyum Sülfür
CdSe	: Kadmiyum Selenid
CdSe/ZnS	: Kadmiyum Selenid/Çinko Sülfür
CdTe	: Kadmiyum Tellür
-COOH	: Karboksilik Asit
Cu	: Bakır
CuSO ₄	: Bakır Sülfat
CuInS ₂	: Bakır İndiyum Sülfid
CuInS ₂ /ZnS	: Bakır İndiyum Sülfid/Çinko Sülfür
CuInZnS/ZnS	: Bakır İndiyum Çinko Sülfür/Çinko Sülfür
DCF	: Diklorofloresin
DCFH-DA	: Diklorofloresin Diasetat
EtBr	: Etidyum Bromür
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidroklorik Asit
InP	: İndiyum Fosfit
InP/ZnS	: İndiyum Fosfit/Çinko Sülfür
InAs/InP/ZnSe	: İndiyum Arsenid/İndiyum Fosfit/Çinko Selenid
KCl	: Potasyum Klorür
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mg	: Miligram

mL	: Mililitre
NaCl	: Sodyum Klorür
NaH₂PO₄	: Monosodyum Fosfat
nm	: Nanometre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
-OH	: Hidroksil iyonu
pH	: Hidrojenin Gücü
pKa	: Asitlik Sabiti
pM	: Pikomolar
S	: Kükürt
SO²⁻	: Sülfür Dioksit Anyonu
WS₂	: Tungsten disulfid
Zn	: Çinko
ZnO	: Çinko Oksit
ZnS	: Çinko Sülfür
ZnS–AgInS₂	: Çinko Sülfür- Gümüş İndiyum Sülfid
ZnSe/InP/ZnS	: Çinko Selenid/İndiyum Fosfit/Çinko Sülfür

KISALTMALAR

1-Cys	: 1- Sistein
2-Cys	: 2- Sistein
2-dG	: 2-deoksi-D-glukoz
8-OHdG	: 8-Okso-2'-deoksiguanozin
BER	: Baz Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri
BSA	: Sığır Serum Albümini
CAT	: Katalaz
CatL	: Katepsin L-benzer Protein
Cys-S_pH	: Peroksidatik Sistein
Cys-SOH	: Sistein-Sülfenik Asit
Cys-S_R	: Katalitik Sistein
Cys-SOOH	: Sistein- Sülfenik Asit
Cys-SOOOH	: Sistein- Sülfonik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSB	: Çift İplik Kırıkları
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
FBS	: Fötal Sığır Serum
GPB	: Granüler Biyokalıcı Partiküller
GP_x	: Glutasyon Peroksidaz
GSTP1	: Glutasyon S-Transferaz Pi 1
HMA	: Yüksek Kaynama Noktalı Agaroz
HR	: Homolog Rekombinasyon
HSP	: Isı Şoku Proteini
HSP60	: Isı Şoku Proteini 60
HSP70	: Isı Şoku Proteini 70
HSP90	: Isı Şoku Proteini 90
HSP100	: Isı Şoku Proteini 100
L-15	: Leibovitz's L-15 Medyumu

LC₅₀	: Ölümcül konsantrasyon % 50
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LED	: Işık Yayan Diyot
LMA	: Düşük Kaynama Noktalı Agaroz
MER	: Yanlış Eşleşme Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MS-222	: Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate
MTT	: 3- (4,5-dimethyl thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium
NER	: Nükleotid Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Tamiri
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleşimi
NIH	: ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü
Nrf2	: Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2 (Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2)
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PBS	: Fosfat Tamponu
Prdx	: Peroksiredoksin
Prdx1	: Peroksiredoksin 1
Prdx2	: Peroksiredoksin 2
Prdx6	: Peroksiredoksin 6
QD	: Quantum Dot
RAD50	: Rad50 Rekombinaz
RAD51	: Rad51 Rekombinaz
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RPA	: Replikasyon Protein A
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick End Labeling
UV	: Ultraviyole
WST-1	: Suda Çözünebilir Tetrazolyum-1

ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil 1.1. Quantum Dot'ların genel görünümü.	7
Şekil 1.2. Bir Quantum Dot nanopartikülünün genel yapısı (Rzagalinski ve Strolb, 2009'den).	8
Şekil 1.3. Quantum Dot'ların sentezi sırasında ayarlanabilen çekirdek boyutuna göre değişen floresan özellikleri (Wegner ve Hildebrandt, 2015'den).	9
Şekil 1.4. Farklı tip QD'ların genel yapıları.	10
Şekil 1.5. DNA çift iplik kırıklarının homolog rekombinasyon veya homolog olmayan uç birleşimi yolları ile onarılması (Sullivan ve Bernstein, 2018'den).	22
Şekil 2.1. Tez çalışma planı.	23
Şekil 2.2. MS-222 ile anestezi edilen zebra balıkları.	29
Şekil 2.3. Primer kültüre alınan Zebra Balığı hepatositlerinin faz kontrast mikroskobu altındaki görünümü.	31
Şekil 2.4. İyon ölçüm cihazı ve yazılımı kullanılarak örneklerde bulunan iyon miktarlarının hesaplanması.	32
Şekil 2.5. WST-1 testi ile hücre canlılığını belirlemek üzere 96 kuyucuklu standart plakalara ekilen hepatositlerin mikropilaka üzerindeki yerleşimi ve uygulama grupları.	33
Şekil 2.6. Hücrelerde biriken reaktif oksijen türleri miktarlarını belirlemek üzere 96 kuyucuklu siyah plakalara ekilen hepatositlerin mikropilaka üzerindeki yerleşimi ve uygulama grupları.	35
Şekil 2.7. <i>İn vivo</i> ve <i>in vitro</i> deneylerden elde edilen örneklerdeki DNA kırıklarını belirlemek üzere gerçekleştirilen comet analizinin uygulama basamakları.	39
Şekil 2.8. SDS-poliakrilamid jel hazırlık aşamaları.	41
Şekil 2.9. SDS-PAGE elektroforezi ve blotlama işleminin uygulama basamakları.	43

Şekil 2.10.	Nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirilen proteinler arasında hedef proteinlerin tespit edilebilmesi amacıyla gerçekleştirilen bloklama, primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyon ve ECL çözeltisi kullanılarak görüntülenmesi.	44
Şekil 3.1.	Besiyerlerinde belirlenen $[Cd^{2+}]$ konsantrasyonları (μM).	48
Şekil 3.2.	0, 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ Cd-QD'lar ve $CdCl_2$ içeren akvaryum sularında bulunan $[Cd^{2+}]$ konsantrasyonları (nM).	49
Şekil 3.3.	24 saat süre ile Cd-QD'lara ve $CdCl_2$ 'e maruz kalan hepatositlerde $[Cd^{2+}]$ birikimi.	50
Şekil 3.4.	24 saat süre ile Cd-QD'lara ve $CdCl_2$ 'e maruz kalan balıkların karaciğer ve solungaç dokularında $[Cd^{2+}]$ birikimi.	51
Şekil 3.5.	24 saat süre ile 25, 50 ve 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalan zebra balığı hepatositlerinin canlılığında meydana gelen değişimler.	53
Şekil 3.6.	Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalan zebra balıklarının karaciğer dokularındaki % ROT birikimi.	55
Şekil 3.7.	Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularındaki %ROT birikimi.	56
Şekil 3.8.	Primer kültüre alınan zebra balığı hepatositlerinin 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalması sonucu hücrelerde belirlenen %ROT birikimi.	59
Şekil 3.9.	Akvaryum suyu (100 $\mu g/L$) ve besiyeri (100 $\mu g/mL$) aracılığıyla QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalan balıklara ait solungaç ve karaciğer dokularından elde edilen hücreler ve <i>in vitro</i> primer hepatositlere ait komet görüntüleri.	60
Şekil 3.10.	Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya $CdCl_2$ 'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında gözlemlenen %kuyruk DNA miktarları.	61

Şekil 3.11. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında gözlemlenen % kuyruk DNA miktarları.	62
Şekil 3.12. Primer kültüre alınan hepatositlerde gözlemlenen %kuyruk DNA miktarları.	64
Şekil 3.13. 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Hsp90 kat artışları.	68
Şekil 3.14. 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Prdx1 kat artışları.	73
Şekil 3.15. 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Rad51 kat artışları.	76
Şekil 3.16. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek tip QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler.	81
Şekil 3.17. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler.	82
Şekil 3.18. Akvaryum suyu vasıtasıyla kadmiyum içermeyen QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler.	83
Şekil 3.19. Akvaryum suyu vasıtasıyla CdCl ₂ 'e maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler.	84
Şekil 3.20. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek tip QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler.	88
Şekil 3.21. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler.	89
Şekil 3.22. Akvaryum suyu vasıtasıyla kadmiyum içermeyen QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler.	90

Şekil 3.23. Akvaryum suyu vasıtasıyla CdCl_2 'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler.	91
Şekil 3.24. Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile QD'lara ve CdCl_2 'e maruz kalan balıklara ait deri dokuları	92



TABLÖLAR

	SAYFA NO
Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, sarf malzemeleri ve deney kitleri	24
Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	26
Tablo 2.3. Tez çalışmasında kullanılan QD'ların çalışmadaki isimleri, zeta potansiyeli, nanopartikül çapı ve marka bilgileri	27
Tablo 3.1. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında meydana gelen histopatolojik etkiler.	78
Tablo 3.2. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl ₂ 'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik etkilerin değerlendirilmesi.	85

1. GİRİŞ

Doğada bulunan her canlı, çok çeşitli şekillerde nano ölçekli maddelere maruz kalmaktadır. Nanomalzemelerin artan yüzey alanı/hacim oranı ve daha bir çok üstün fiziksel özellikleri sayesinde mikron boyutlu emsallerinden farklı etkiler göstererek teknolojik avantajlar sağlasa da, doğayı ve canlı yaşamını olumsuz etkilemektedir (Gavrilescu ve ark., 2018).

Nanomateriyaller arasında önemli bir yere sahip olan Quantum Dot'lar, genellikle 2-10 nm arası boyutlara ve özgün fizikokimyasal özelliklere sahip floresan parçacıklardır (Ghasemi ve ark., 2009). Temel olarak optik, elektronik ve biyolojik uygulamalarda kullanım alanı bulan bu nanomateriyaller, genellikle çekirdek yapılarında kadmiyum bulundurmaktadır ve canlılar üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedir (Gui ve ark., 2017; Manikandan ve ark., 2019; Reshma ve Mohanan, 2019). Bu nedenle hem kadmiyumdan kaynaklı toksisiteyi azaltmak hem de materyalin aşınmasını korumak amacıyla çekirdek yapısının etrafı bir kabukla sarılmıştır. Fakat yapılan çalışmalar bu kabuk yapısının toksisiteyi engellemede başarılı olmadığını göstermiştir. Bunun dışında, toksisiteyi azaltmak amacıyla farklı bir yaklaşım olarak, materyalin çekirdeğinde kadmiyum yerine farklı metaller kullanarak kadmiyum içermeyen QD'lar sentezlenmiştir. Her ne kadar kadmiyum içeren QD'lara göre sayıca az olsa da, yapılan toksisite çalışmaları bu materyallerin de artan konsantrasyonlarda toksik etkilere yol açtığını göstermektedir (Filali ve ark., 2020).

Her ne kadar nanoteknoloji bizlere bir çok alanda benzersiz avantajlar sunuyor olsa da, canlılarla etkileşim halinde olan bu teknolojinin ürünü nanomateriyallerin, toksikolojik risk değerlendirmesi ve atık yönetimi uygun bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Klasik bir QD genellikle sadece çekirdek yapısında bulunmaktadır ve bu yapının üzerine kabuk veya ligantlar eklenerek farklı çeşitlerde QD'lar elde edilebilmektedir. Literatürde Quantum Dot'ların toksisitesini azaltmak amacıyla gerçekleştirilen yaklaşımların ürünü olan iki tip (çekirdek/kabuk ve kadmiyum içermeyen) QD'un, çekirdek tip QD'lar ile beraber karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmalar bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında geniş kullanım alanlarına sahip farklı tip QD'ların hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda toksikolojik açıdan değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, yukarıda bahsedilen üç farklı tip QD ve toksisitenin Cd^{2+} ile ilişkisini belirlemek amacıyla $CdCl_2$; hem direkt olarak akvaryum suyu vasıtasıyla zebra balıklarına, hem de primer

kültür yöntemi ile elde edilen zebra balığı hepatositlerine uygulanarak sitotoksik ve genotoksik etkiler belirlendi. Ayrıca, western blot analizi ile biyomarkör proteinlerdeki değişimler ortaya konularak ve *in vivo* deneyler için histopatolojik değerlendirme yapılarak karşılaştırmalı bir toksikolojik analiz gerçekleştirildi. Tez çalışmasından elde edilen verilerin bu materyallerin toksikolojik risk değerlendirmesine ve ayrıca insan ve çevre sağlığında gerekli önlemlerin alınmasına katkıda bulunacağı ümit edilmektedir.

1. 1. Nanomateriyaller

Kelime olarak Yunanca'da cüce anlamına gelen “nano” ve “malzeme”den türeyen nanomateriyaller, herhangi bir boyutu 100 nm'den az olan, doğal olarak meydana gelen veya endüstriyel olarak üretilmiş partiküllerdir (Maher, 2018). Bu nanomateriyallerin keşfi ve kullanımı doğrultusunda nanoteknoloji alanı doğmuştur. Amerika Çevre Koruma Ajansı, (EPA) nanoteknolojinin tanımını şu şekilde yapmaktadır “Nanoteknoloji, yaklaşık 1-100 nm uzunluğunda bir skalada, atomik, moleküler veya makromoleküler araştırma ve teknoloji geliştirme; küçük boyutları nedeniyle yeni özellikleri ve işlevleri olan yapıların, cihazların ve sistemlerin yaratılması ve kullanılması; ve atomik ölçekte maddeyi kontrol veya manipüle etme yeteneğidir” (Morris ve ark., 2011).

Kelime olarak nanoteknoloji; 1974 yılında Tokyo Üniversitesi'nden Norio Taniguchi tarafından konulmuş olmasına rağmen, modern nanoteknoloji 1965 Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feynman'ın ürünüdür. Feynman, Caltech'teki 1959 Amerikan Fizik Topluluğu toplantısında, “There is Plenty of Room at the Bottom” başlıklı bir konferans vermiştir (Feynman, 1960). Maddeyi atom seviyesinde manipüle etme kavramını tanıttığı bu konferansta, bu yöntemle elde edilecek olan ürünlerin, halihazırda kullanılan formlarına göre çok daha güçlü kimyasal özelliklere sahip olabileceğini vurgulamıştır. Feynman ayrıca, atomları istediğimiz gibi manipüle etmek amacıyla nano ölçekli makineler kullanarak veya mekanik manipülasyonlar ile kimyasal sentez yapmanın da mümkün olduğunu ileri sürmüştür. Bu yeni fikir, yeni düşünce biçimlerini göstermiş ve ileriki araştırmalar ile Feynman'ın varsayımlarının doğru olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle Feynman, modern nanoteknolojinin babası sayılmaktadır (Hulla ve ark., 2015). Nanoteknolojinin altın çağı ise Kroto ve arkadaşları tarafından fullerenerin keşfi ile başlamış olup, günümüzde her yıl tonlarca nanopartikül,

nanokristal, nanorod, nanotüp gibi nano boyutlu malzeme üretilmektedir (Kroto, 1987; Piccinno ve ark., 2012; Islam ve ark., 2019).

Her ne kadar modern nanoteknoloji araştırmaları 1900'lü yıllara dayansa da, doğada nanoskalada birçok doğal partikül ve nano ölçekte çalışan moleküler makineler bulunmaktadır. Bu tür moleküler makinelerin en iyi bilinen biyolojik örneği, dikkate değer bir nano ölçekli düzenleyici olan ribozomdur. Ribozom, çevresindeki binlerce çözünmüş maddeye rağmen, aminoasitleri oldukça spesifik bir sırada bir araya getiren ve %99,9'dan daha yüksek bir doğruluk oranıyla çalışan nano ölçekli bir protein fabrikası gibidir. Benzer şekilde, nanoyapılara güzel bir örnek olarak dünyanın günlük rutininde yer alan bir eylem olarak fotosentez de verilebilir. Her kloroplastın içerisinde tilakoid olarak adlandırılan disklerdeki ışığa duyarlı pigmentler, fotonları toplayarak fotosentetik reaksiyon merkezlerine gönderir. Bu reaksiyon merkezleri yaklaşık 10,000 atomdan oluşan nano yapılarıdır ve fotosentez ile su ve şeker molekülü oluşturur (Schodek ve ark., 2009). Bunlara ilaveten, midyelerde bulunan ve yüzeye tutunmalarını sağlayan oldukça kuvvetli "byssus" iplikleri, gekkoların duvar ve tavanlara tutunmasını sağlayan parmak yapıları, dayanıklı ve elastik yapıya sahip örümcek ağları, sert ve dayanıklı gergedan boynuzları gibi nano yapılar, farklı canlılarda bulunmaktadır (Schodek ve ark., 2009). Canlı organizmaların dışında; tatlısulardaki kolloid maddeler, atmosferdeki volkanik tozlar, toprağın aşınmasıyla oluşan, doğal yangınlar sonucu ortaya çıkan nanopartiküller, deniz suyunun buharlaşmasıyla oluşan nano ölçekli tuz, toprakta bulunan humik maddeler de doğal yollarla ortaya çıkan nanomateriyallerdir (Redwood ve ark., 2005; Rosenkranz, 2010). Ayrıca antropojenik aktivite ile istemsizce oluşarak doğaya karışan, örneğın araba egzozları veya lastiklerinin aşınması ile meydana gelen nanomateriyaller ise doğa için endişe verici hal almaktadır (Handy ve ark., 2008).

Doğal olarak oluşan veya sentetik olarak üretilen nanopartiküller, farklı şekillere ve içeriklere sahip olabilirler. Bu fizikokimyasal özellikler de nanopartiküllerin farklı uygulamalarda kullanım çeşitliliğini sağlar (Prajitha ve ark., 2019). Kimyasal yapılarına göre EPA, nanomateriyalleri karbon bazlı, metal bazlı, kompozit nanomateriyaller, dendrimerler ve Quantum Dot'lar (QD'lar) olarak sınıflandırmaktadır (Morris ve ark., 2011). Bu nanomateriyaller arasında QD'lar, diğer sınıflara göre farklı yapıları sayesinde benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip olup, hem nanoteknoloji hem de nanotoksikoloji açısından önemli bir yere sahiptir (Juzenas ve ark., 2008).

Nano ölçeekte boyutlara sahip malzemelerin hem fiziksel ve hem de kimyasal özellikleri, nano boyutta olmayan atalarına göre farklılık gösterir. Bu farklılıkları sayesinde güneş koruyucu ürünlerde ultraviyole (UV) koruması, yakıt katkı maddeleri veya antimikrobiyal maddeler gibi bir çok tüketici ürününde kullanımı yaygınlaşmaktadır (Jennings ve ark., 2015).

Nanoteknolojik ürünlerin normal boyutlu malzemelere göre gelişmiş manyetik, katalitik, optik, elektriksel ve mekanik özellikleri nedeniyle birçok ticari alanda kullanıldığı görülmektedir. Bunun sonucu olarak insanlar doğrudan veya dolaylı olarak nanomateriyallere maruziyet ile yüz yüze gelmiştir. Teorik olarak, nanopartiküller doğaya su, toprak, bitkiler, bitki yiyen ve topraktan su içen organizmalar aracılığıyla ulaşır (Al-Salim ve ark., 2011). Boyutlarının çok küçük olmasına rağmen hacimlerine göre yüzey alanlarının çok fazla artmış olmasından dolayı yüksek reaktif özellik gösteren bu parçacıklar, karşı karşıya geldikleri biyolojik sistemlere ve çevreye zararlı olmaktadır (Oberdorster ve ark., 2005).

1. 2. Nanotoksikoloji

Nanotoksikoloji, nano boyutlu yapıların potansiyel toksik etkileriyle ilgilenen ve bu alandaki bilgi eksikliğinin giderilmesi amacıyla gelişmiş toksikolojinin yeni bir dalıdır (Ramakrishna ve Rao, 2011).

Genel olarak, nanomateriyallerin mikron boyutlu ana materyallerine göre yüksek toksisite göstermesinin sebebi, çok yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması nedeniyle artan reaktifliğidir (Moreno-Horn ve Gebel, 2014). Her ne kadar nanomateriyalin toksisitesini artıran özelliklerin başında küçük boyutlu olması gelse de, toksisite nanomateriyalin tüm fizikokimyasal özellikleri ile ilişkilidir. Boyuta ek olarak, toksisiteyi etkileyen fizikokimyasal özellikler; sahip olduğu yüzey kaplamaları, pozitif veya negatif yük, morfoloji, stabilite ve aşınma, plazmonik özellikler ve bant aralığı faktörüdür (Singh ve ark., 2019). Çok küçük boyutlu olmaları hücre zarından geçebilme ve ayrıca dokulara daha hızlı nüfuz edebilme özelliklerini sağlayarak toksisitenin mikron boyutlu ana malzemeye göre artmasını sağlamaktadır (Gidwani ve Singh, 2013). Ayrıca, nanomateriyallerin kan-beyin bariyeri, plasenta, deri ve yumurta zarı gibi bir çok biyolojik bariyerden geçebildiği de bildirilmiştir (Kashiwada, 2009; Tsou ve ark., 2017; Muoth ve ark., 2016; Nafisi ve Maibach, 2018).

Nanomateriyalin toksisitesini fizikokimyasal özellikleri belirlediği için, bu özelliklerle toksisiteyi ilişkilendirebilmek amacıyla nanotoksikoloji çalışmalarında nanomateriyalin boyut, yük ve şekil gibi özellikleri mutlaka ortaya konması gerekmektedir (Elsaesser ve Howard, 2012). Ayrıca, nanomateriyalin yüzeyi direkt olarak hücresel ortamlarla etkileşim halinde olduğu için partikül yüzeyi nanotoksikolojide ayrı bir önem taşır. Nano-biyolojik etkileşimi artıran en önemli faktör, yukarıda bahsedilen yüksek hacim/boyut oranının kimyasal reaktiviteyi artırmasıdır (Nel ve ark., 2009). Biyolojik sistemlerde bu nanomateriyaller fizikokimyasal özelliklerine göre ortamda bulunan protein gibi biyomolekülleri etrafına sararak “korona” yapısını oluşturmaktadır. Bu sebeple nano-biyolojik etkileşiminde nanomateriyalin fizikokimyasal özellikleri ve dolayısıyla protein korona yapısı göz önüne alınmalıdır (Lynch ve ark., 2009). Şekil, yüzey, yük, yüzeyde bulunan fonksiyonel gruplar, hidrofilik veya hidrofobik olma durumu da protein korona yapısında varyasyonlara sebep olarak toksisiteyi etkilemektedir (Rahman ve ark., 2013).

Nanopartiküllerin hangi yolla hücreye alındığının bilinmesi, hücre içerisindeki kaderini ve biyolojik cevabını belirlediği için oldukça önemlidir (Panariti ve ark., 2012). Nanopartiküller hücreye direkt olarak hücre zarından geçerek veya endositoz aracılığıyla girmektedir. Boyut, şekil, yük, esneklik ve yüzeyde bulunan hedef gruplar gibi fizikokimyasal özellikler nanomateriyallerin hücreye alınımını etkilemektedir (Donahue ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda, boyut ve kümeleşme durumunun, altın nanopartiküllerinin hücreye alınımını oldukça etkilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalardan birinde, 50 nm çapındaki küresel altın nanopartiküllerinin insan servikal kanser hücrelerine (HeLa) alınımının, 14 ve 74 nm çapında ve yine küresel olan altın nanopartiküllerine göre çok daha fazla miktarlarda olduğu gözlemlenmiştir (Chithrani ve ark., 2006). Ayrıca, nanomateriyalin fizikokimyasal özellikleri kadar hücre tipi de alınım sürecinde etkilidir. Nanopartikülün morfolojisi endositozu etkilediğinden, farklı şekillere sahip nanopartiküllerin hücreye alım yolları değişmektedir. Hem partikül morfolojisinin hem de hücre tipinin etkisine örnek olarak, Albanse ve Chan’ın çalışmasında HeLa ve insan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücreleri (A549) tek tek dağılmış halde bulunan altın nanopartiküllerini kümeleşme gösterenlere kıyasla hücre içerisine çok daha fazla aldığını göstermiş, fakat başka bir kanser hücre hattı olan MDA-MB-435 (insan meme kanseri hücre hattı) hücrelerinde ise bu durumun tam tersine kümeleşme gösteren

partiküllerin hücreye alınımının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Albanese ve Chan, 2011).

Bunlara ilaveten, nanopartikülün yüzey yükü de toksisiteyi etkileyen parametrelerden biridir. Yük, genellikle zeta potansiyeli ölçümünden yola çıkılarak tahmin edilir. Zeta potansiyeli (ζ), kolloidal halde bulunan parçacığın elektrokinetik potansiyelidir ve bir nanopartikülün belirli bir sıvı içerisinde ölçülen zeta potansiyeli, bulunan ortamdaki yüzey yükünü ifade eder (Danohue ve ark., 2019). Coulomb yasasına göre, katyonik nanopartiküllerin negatif yüke sahip olan plazma membranına elektrostatik olarak bağlanması ve hücre içerisinde birikiminin artmasının çok daha muhtemel olmasına rağmen, negatif yüke sahip nanopartiküllerin de hücre membranını aşabildiği ve hücrelerde birikime sebep olabildiği gösterilmiştir (He ve ark., 2010).

Nanomateriyaller teknolojik süreçler için büyük potansiyel sunmasına rağmen toksikolojik açıdan risk barındırmaktadır. Neyse ki bu yeni teknolojinin toksikolojik yönden ve güvenlik açısından araştırılması için gerekli girişimler çok erken ve yoğun olarak yapılmaya başlanmıştır. Ancak, nanotoksikoloji alanında 6 binden fazla yayın olmasına rağmen, bazı temel sorular hala yanıtlanamamıştır (Gebel ve ark., 2014). Risk değerlendirmesini kolaylaştırmak için, Gebel ve arkadaşları nanomateriyalleri maruz kalma yolu ve etki mekanizmasını temel alarak 3 kategoride sınıflandırmıştır. **Kategori 1**, toksisitesi iyon salınımı veya yüzeyindeki fonksiyonel gruplar gibi bileşiğin kendi spesifik kimyasal özelliği aracılığıyla meydana gelen nanomateriyalleri içermektedir. **Kategori 2**, spesifik bir geometriye sahip, yüksek en-boy oranlı sert, biyokalcı, solunabilir, fibröz nanomateriyallerdir. **Kategori 3** ise solunabilir, granüler, biyokalcı partiküllerdir (GPB'ler). Bu granüler nanopartiküller solunum yoluyla alındıktan sonra, akciğer inflamasyonu, sekonder mutajenite ve en sonunda akciğer kanserine yol açmaktadır (Gebel ve ark., 2014). Quantum Dot'lar ise, Gebel ve arkadaşlarının sınıflandırmasına göre, Kategori 1'de yer almaktadır.

1. 3. Quantum Dot'lar

Çeşitli endüstriyel ve biyomedikal alanlarda yaygın olarak kullanılan önemli nanopartikül gruplarından biri Quantum Dot'lardır (Reshma ve Mohanan, 2019). Teknik olarak QD'lar iyi tanımlanmış, değişken sayıda ve ayrık kuantum halinde elektronlar

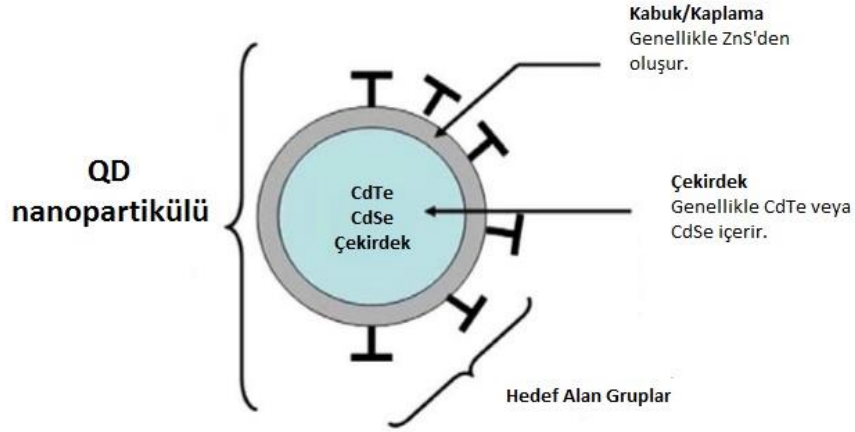
içeren; elektronik özellikler açısından ise ana molekül ile temel parçacık arasında olan küçük kristaller olarak ifade edilmektedir (Shukla, 2014) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Quantum Dot'ların genel görünümü (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/quantum-dots.html>).

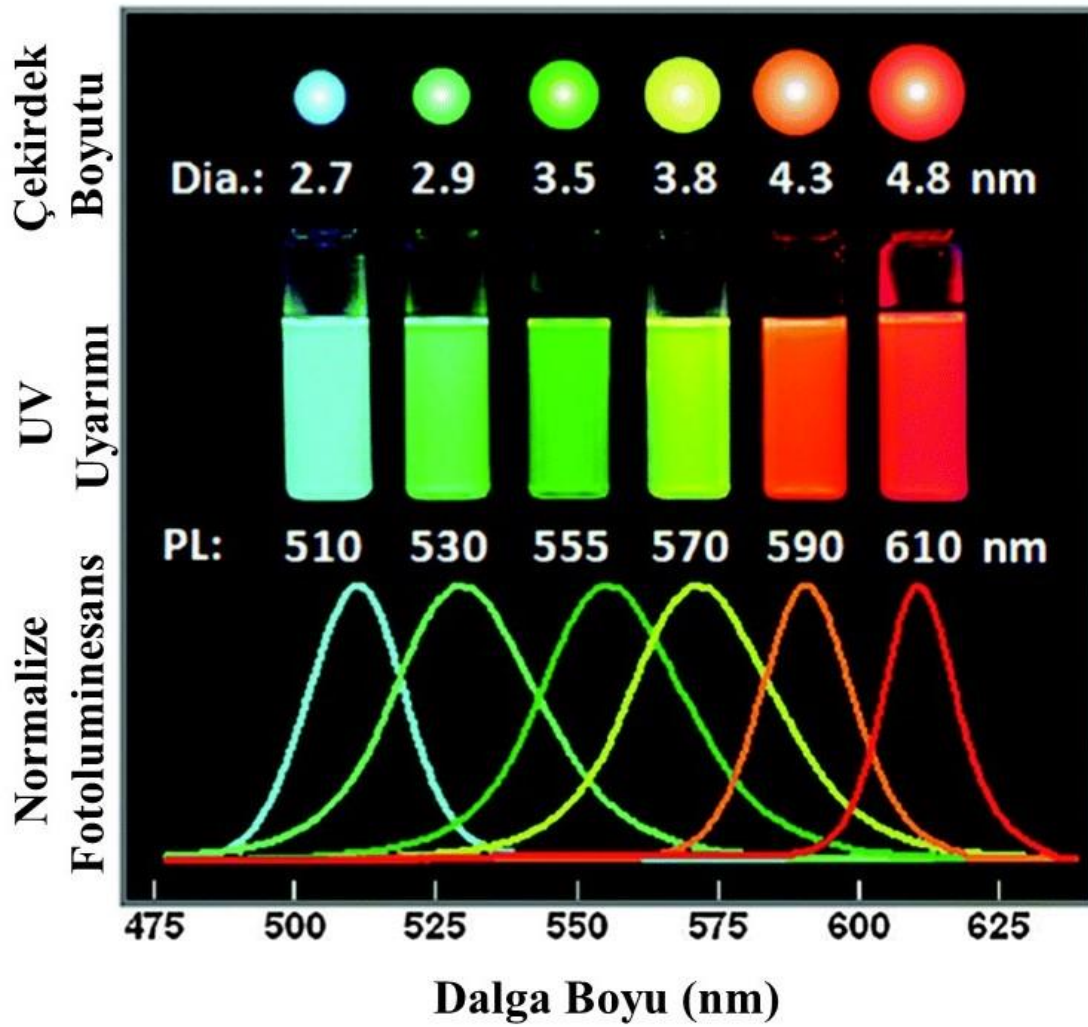
1.3.1. Quantum Dot'ların yapısı ve kullanım alanları

Quantum dot'lar genellikle 2-10 nm çapında olan küresel yapılı nanopartiküllerdir. Yapı olarak yarı iletken bir çekirdek, çekirdeği saran bir kabuk ve bir kapsül, fonksiyonel grup veya ligantlardan oluşmaktadır (Ghasemi ve ark., 2009). Bu yapılardan esas olan ve her QD'ta bulunan yapı çekirdektir. Bu inorganik yapıli çekirdek, yarı iletkenlikten ve temel optik özelliklerden sorumlu olup genellikle kadmiyum içermektedir (Bottrill ve Green, 2011). Kabuk yapısı ise hem bu çekirdeğin pasivasyonunu sağlar, hem de foto-ağarmayı engelleyerek kuantum verimi ve ışımaya kaybını önlemeden sorumlu olur. Son olarak, kapsül veya ligant yapıları ise hidrofobik etkileşimler veya kovalent bağlar kurarak, peptid, karbohidrat, DNA fragmanları gibi moleküllerle biyokonjugasyonu sağlar. Ayrıca, bu yapılar kolloidal stabilite, çözünürlük, parçacık boyut dağılımı gibi temel parametreleri belirler, parçacık morfolojisini kontrol altına alır ve kümeleşmeyi önler. Bir QD'un şematik görünümü Şekil 1.2.'deki gibidir (Rzigalinski ve Strolb, 2009'dan).



Şekil 1.2. Bir Quantum Dot nanopartikülünün genel yapısı (Rzagalinski ve Strolb, 2009'dan).

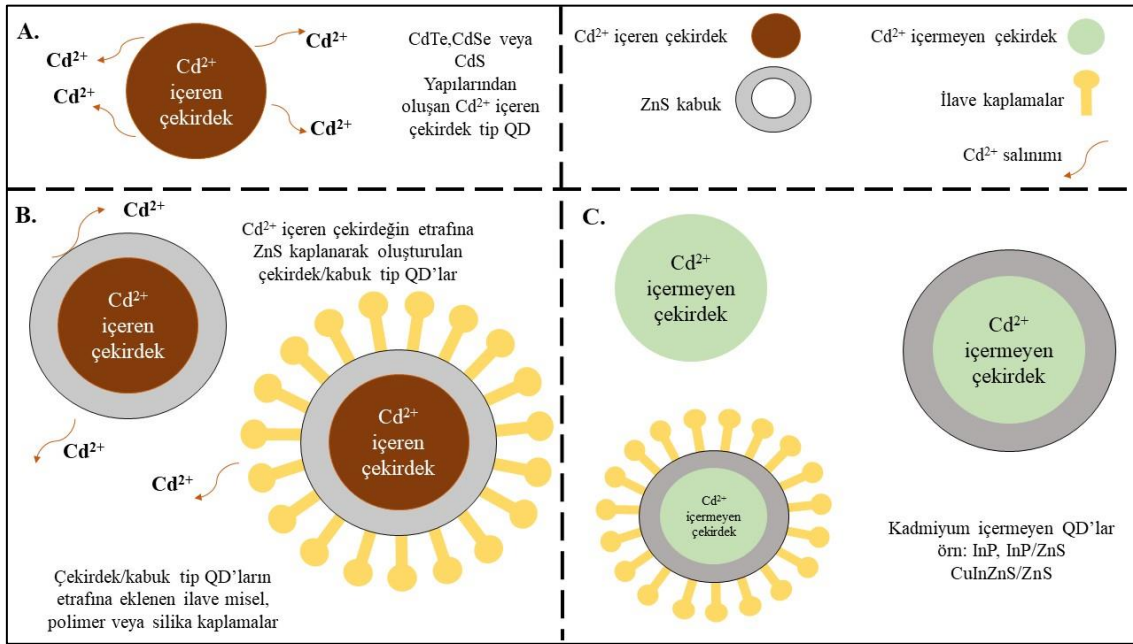
Quantum Dot'ların bir çok alanda kullanılmasına olanak veren, özgün fizikokimyasal özellikleri ve floresanlığıdır. Bu özgün özelliklerin başında gelen, hem boyutla hem de kimyasal yapısıyla ayarlanabilir ışık emisyonu; ayrıca geniş absorbisyon ve dar emisyon aralığına sahip olma özelliğidir (Barroso, 2011). Yukarıda da bahsedildiği gibi, QD'ların boyutları genellikle 2 ile 10 nm arasındadır. Sentezi sırasında boyutu ayarlanarak, floresanlık ultraviyole, görünür ve yakın kızılötesi dalga boyu aralığına ayarlanarak bu aralıklarda ölçüm yapılmasına olanak sağlar (Dabbousi ve ark., 1997) (Şekil 1.3). Ayrıca, sadece boyut ile değil, çekirdeğin kimyasal yapısı ile de ışık emisyonu ayarlanabilmektedir. Örneğin emisyon dalga boyları, kadmiyum sülfat için (CdS) mavi ultraviyole, kadmiyum selenyum için (CdSe) görünür bölge ve kadmiyum tellüryum (CdTe) için ise far red/ yakın kızılötesi bölgeye gelmektedir (Mongillo, 2007). Ayrıca QD'lar geniş absorbisyon dalga boyuna ve 20 nm kadar dar bir emisyon dalga boyuna sahiptir. Bu özellikleri sayesinde farklı emisyon dalga boyuna sahip QD'lar tek bir dalga boyuyla uyarılarak emisyon dalga boylarında çakışma olmayacağından eş zamanlı olarak emisyonların tespit edilmesine olanak sağlar (Jaiswal ve Simon, 2004)



Şekil 1.3. Quantum Dot'ların sentezi sırasında ayarlanabilen çekirdek boyutuna göre değişen floresan özellikleri (Wegner ve Hildebrandt, 2015'den).

Diğer bölümde daha detaylı bahsedileceği gibi, Quantum Dot'ların toksik olmasının en önemli sebeplerinden biri kadmiyum içermesidir. Kadmiyum içeren QD çekirdeğinden kaynaklanan toksisitenin azaltılması amacıyla, çekirdeğin ZnS kabuk ile sarılması ile oluşan çekirdek/kabuk yapıları QD'lar üretilmiştir (örn: CdSe/ZnS QD'lar) (Şekil 1.4). Ancak, ZnS kabuk her ne kadar Cd^{2+} salınımını azaltmış olsa da (Reshma ve Mohanan, 2019), yapılan çalışmalar bu ZnS kabuğun aşınması ile yine Cd^{2+} salınımının olduğu ve toksisitenin ortadan kalkmadığını göstermiştir (Lovrić ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2006). Çekirdek kaynaklı Cd^{2+} iyon salınımının önüne geçebilmek için bu QD'lar, ZnS kabuk dışında ayrıca biyouyumlu polimerler ile de enkapsüle edilmiştir. Fakat her ne olursa olsun bu kaplamaların her biri hücresel ortamda degrade olabileceği ve geriye

çıplak QD çekirdeği kalacağından (Lovrić ve ark., 2005), kadmiyum içermeyen QD'lar sentezlenmiştir (örn: InP, InP/ZnS, CuInS₂, CuInS₂/ZnS, CuInZnS/ZnS, Ag₂S, Ag₂Se, ZnS–AgInS₂ (ZAIS) ZnSe/InP/ZnS, InAs/InP/ZnSe, Silikon, ZnO, WS₂) (Xu ve ark., 2016) (Şekil 1.4). Her ne kadar kadmiyum içermiyor olsalar da, farklı kimyasal kompozisyona sahip bu QD'ların bir kısmı toksikolojik açıdan değerlendirilmiştir ve konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir (Soenen ve ark., 2014).



Şekil 1.4. Farklı tip QD'ların genel yapıları. **A.** Kadmiyum içeren çekirdek tip QD'lar. **B.** Kadmiyum içeren çekirdek/kabuk tip QD'lar ve ilave kaplamalar kullanılarak üretilen formları. **C.** Farklı çeşitlerde kadmiyum içermeyen QD'lar.

Uzun yıllardan beri, QD'lar, boyutlarının ve bileşenlerinin ayarlanması ile oluşan özgün optik ve elektriksel özellikleri nedeniyle biyolojik olmayan uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomedikal alanda, QD'lar geleneksel organik boyalar ve floresan bileşiklere göre birçok avantaj sunmakta olup bu alanda da kullanılmaya başlanmıştır (Wagner ve ark., 2019). QD'lar organik florokromlar veya floresan boyalardan üstün özelliklere sahiptir. Organik florokromlara kıyasla QD'ların en önemli avantajları kısaca; geniş absorpsiyon spektrumuna karşın dar eksitasyon spektrumuna sahip olmaları, floresan uyarılma ömrünün daha uzun olması, tespit etme hassasiyeti ve foto-ağarmaya karşı dayanıklılıklarının daha fazla olması ve çoklu kullanımı sayesinde

aynı anda birden fazla molekülün görüntülenmesine olanak sağlamasıdır (Wagner ve ark., 2019; Jaiswal ve ark., 2004).

Bunlara ilaveten, QD'lar floresan probalar olarak da kullanılabilir. *In vivo* etiketleme, arka plandaki biyomoleküllerin bol miktarda bulunmasından dolayı yüksek derecede spesifiteye ihtiyaç duyar. Aksi takdirde yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. QD'lar ile konjuge edilmiş olan spesifik proteinler ve antikorlar, *in vivo* uygulamalarda spesifik etiketleme sağlayabilmektedir (Kloepfer ve ark., 2003; Zhu ve ark., 2004; Jaiswal ve ark., 2004). Hücreleri QD'lar ile etiketlenmiş proteinler ile işaretlemenin spesifikliğı ve kolaylığı, bu tekniğın birçok araştırmacı tarafından kullanılabilir, ulaşılabilir ve pratik kılmıştır (Jaiswal ve ark., 2004). Ayrıca, farklı dalga boylarında ölçüme olanak sağlaması ile, aynı anda birden çok tümör belirtecının görüntülenmesine imkan vermekte, ve böylece kanser hücrelerini saptama spesifitesini artırmaktadır (Erdoğan, 2013).

QD'ların elektronik alanında kullanılmasına bir örnek olarak yeni nesil güneş enerji pilleri de verilebilir. Güneş enerjisini elektrik enerjisine dönüştürmek için yapılan teorik hesaplamalara göre, güneş ışığının %93'ünden daha fazlası elektrik enerjisine dönüştürülebilir (Badawi ve ark., 2013; Eychmüller ve ark., 1993; Aktürk, 2013).

Güneş enerji pillerinin yanı sıra, son yıllarda QD'lar, klasik LED ekranlara göre oldukça doygun renklere sahip Quantum Dot televizyonlarda kullanılarak da günlük hayatımıza girmiştir. Klasik bir LED ekranda, nano formda olmayan yarı iletkenler sadece tek bir renkte ışıma yapabilmektedirler. Araştırmacılar QD'ların ayarlanabilir ve nano boyutlu bir yarı iletken olma özelliğinden yararlanılarak, yayması istenen kesin rengi ayarlayabilmekte ve böylece ultra verimli ve süper doygun renklere sahip televizyon ekranları üretebilmektedir (Bourzac, 2013).

1.3.2. Quantum Dot'ların toksisitesi

Quantum Dot toksisitesi, diğer nanopartiküllerin de olduğu gibi, genel olarak fizikokimyasal özellikleri ile ilişkili birçok parametreye dayanmaktadır. Toksikolojik değerlendirme için boyut, şekil, konsantrasyon, yük, redoks aktivitesi, yüzey kaplamaları ve mekanik stabilitesi gibi parametreler dikkate alınmalıdır. Bu parametrelerin oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip olmasından dolayı bu alandaki toksikolojik araştırmaların büyük

bir problemi olmuştur. Günümüz literatüründe bulunan QD'ların toksikolojik açıdan incelendiği yayınlarda çok çeşitli QD'ların kullanılıyor olması ve dolayısıyla değişken fizikokimyasal parametreler sebebiyle karşılaştırma yapmak oldukça zorlaştırmaktadır (Rzigalinski ve Strobl, 2009).

QD toksisitesinin primer kaynağı, çekirdekte bulunan kadmiyumdur. QD'ların toksisitesine ilişkin yapılan çalışmaların önemli bir çoğunluğunda toksisitenin çekirdekten salınan Cd^{2+} ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Derfus ve ark., 2004; Kirchner ve ark., 2005a; Wuister ve ark., 2004; Cho ve ark., 2007; Kirchner ve ark., 2005b). Ayrıca, CdTe veya CdSe çekirdeğe sahip QD'lar oldukça reaktiftir ve ışık ve hava oksidasyonuna oldukça açıktır. Bu sebeple hücre içinde serbest radikaller oluştururlar ve bu durum toksisitesi için başka bir primer mekanizma olarak kabul edilir (Rzigalinski ve Strobl, 2009). QD'lar ışığa maruz kaldıklarında serbest radikal oluşturma kapasitesi oldukça artmaktadır. Bu durumda ışıktan gelen bir foton QD'un elektronlarını uyarır ve uyarılmış elektron moleküler oksijene aktarılır. Böylece singlet oksijen oluşur ve su veya diğer biyomoleküller ile reaksiyona girerek serbest radikal oluşumunu başlatır (Bakalova ve ark., 2004; Lovrić ve ark., 2005).

QD çekirdeğinden kaynaklanan toksisitenin önüne geçilmesi amacıyla, ZnS kabuk ve diğer maddelerle enkapsüle edilen QD'lar ile yapılan çalışmalar bu kaplamaların toksisiteyi azalttığını gösterse de, bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, ZnS kabuğun iyon kanallarındaki bozunmaları ve serbest radikal oluşumunu azalttığı belirtilmiştir (Bakalova ve ark., 2004; Chan ve ark., 2006; Derfus ve ark., 2004; Kirchner ve ark., 2005b). Her ne kadar ZnS kabuk veya diğer kaplayıcı materyallerin toksisiteyi azalttığı görülse de, bu kaplamalar bir süre sonra hücre ortamda bozunmaya başlayacak ve geriye QD'un çekirdeği kalacaktır (Lovrić ve ark., 2005). Ayrıca bu veriyi destekler şekilde, ZnS kabuğun zamana bağlı olarak aşındığı hücre içerisinde floresan yoğunluğunun azalması ile ortaya konmuştur (Zhang ve ark., 2006). Bunun dışında, ZnS kabuğun da ışık ve hava oksidasyonuna tabii olduğu (Derfus ve ark., 2004), serbest radikal ürettiği ve bu sebeple sitotoksisiteyi tamamen engelleyemediği de bildirilmiştir (Green ve Howman, 2005). Üstelik bu çalışmalarda, ZnS kabuğun da elektronlarının uyarılması ile serbest radikal oluşturduğu ve hava veya su varlığında SO^{2-} radikali ürettiği gösterilmiştir.

Son olarak QD'ların toksisitesini etkileyen faktörlerden biri de QD yüzeyine eklenen fonksiyonel gruplardır. Genellikle bu fonksiyonel grupların eklenmesinin sebebi QD'u hücre veya doku grubuna hedeflemektir. Aslında bu hedefleme QD'u istenilen dokuya yönlendirerek hedef dışı dokularda oluşabilecek toksisiteyi önleyebileceği düşünülmektedir. Her ne kadar QD'ların bu amaçla kullanımıyla ilgili hem *in vivo* hem de *in vitro* detaylı çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da, çalışmaların çoğu hedef dışı dokulara olan etkileri ve toksikolojik değerlendirmelerini kapsamamaktadır. Bu kaplamaların ne kadar stabil olduğu, organizmada ne kadar süre kaldığı, degrade olup olmayacağı ve diğer dokulara tekrar dağılım gösterip göstermeyeceği de ayrıca araştırılmalıdır (Rzigalinski ve Strobl, 2009).

1.3.3. Kadmiyum içermeyen Quantum Dot'lar

QD'lar ile gerçekleştirilen toksisite çalışmalarının çoğunda, QD'ların toksisitesinin altında yatan sebebin genel olarak çekirdeğinde bulunan kadmiyum olduğu vurgulanmıştır. Bu sebeple QD'lardan kaynaklanan toksisitenin önüne geçmek amacıyla genel olarak iki strateji izlenmiştir. Bunlardan birincisi, QD çekirdeğini ZnS kabuk ile sarmak, ve hatta kabuğun üzerine ilave kaplamalar geliştirmek olmuştur (Riveros ve ark., 2016; Ju ve ark., 2013). Fakat her ne olursa olsun QD'ların üzerindeki kaplamalar biyolojik bir ortama girdiğinde belli bir süre sonunda aşınacak, geriye kadmiyum içeren çıplak bir çekirdek kalacağı belirtilmektedir (Lovrić ve ark., 2005).

Toksisiteyi azaltmak amacıyla ortaya konan ikinci yaklaşım ise QD çekirdeğinde kadmiyum yerine farklı elementler kullanarak benzer optoelektronik ve fiziksel özellikleri sağlayabilen kadmiyum içermeyen QD'ları sentezlemektir (Pons ve ark., 2010). Bu yaklaşımın ürünü olan kadmiyum içermeyen QD'lar, geleneksel QD'lara göre oldukça yenidir. Fakat aynı kadmiyum içeren QD'lardaki gibi hücresel ortamda bu materyal aşınarak, çekirdekte bulunan farklı elementlerin hücresel ortama sızmasıyla toksisiteye sebep olabileceği düşünülmektedir.

Kadmiyum içermeyen QD'ların toksikolojik değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaların çoğu, hücre canlılığı üzerinden değerlendirilmiştir. Bu canlılık genellikle formazan kristallerinin ölçümüne dayanan bir test olan MTT yöntemi ile değerlendirmiştir. Bir çok farklı hücre hattı ile yapılan bu çalışmaların sonuçları, kadmiyum içeren QD'lar için sitotoksik olduğu bilinen konsantrasyonlarda, Cd

içermeyen QD'ların hücre canlılığını önemli derecede etkilemediğini göstermektedir (Shinchi ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2014; Yong ve ark., 2010; Guo ve ark., 2014; Xie ve ark., 2008). Fakat, sadece hücre canlılığına dayanan yöntemler toksisite araştırmalarında yeterli olmayıp, daha detaylı inceleme gerektirmektedir. Örneğin, zebra balığı karaciğer hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, InP/ZnS QD'larının kadmiyum içeren QD'lara göre her ne kadar daha düşük toksisite gösterdiği ortaya konulmuş olsa da, mRNA düzeyinde yapılan incelemelerde bu QD'ların da metal homeostasisini düzenleyen genlerin ekspresyonunda değişimlere sebep olduğu belirlenmiştir (Tang ve ark., 2013a). Bunların dışında kadmiyum içermeyen InP/ZnS QD'ların apoptoz ve nekroz, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, laktat dehidrogenaz (LDH) salınımı ve toksisite ile ilişkilendirilen bazı mRNA transkriptlerinin ekspresyonlarını da etkilediği hem *in vitro* yöntemlerle farklı hücre hatlarında, hem de *in vivo* yöntemlerle *Drosophila melanogaster* türünde gösterilmiştir (Brunetti ve ark., 2013). Bununla beraber, yine kadmiyum içermeyen ZnSe/ZnS ve InP/ZnS QD'ların toksisitesinin birlikte değerlendirildiği farklı bir *in vitro* çalışmada, bu iki nanomateryalin de insan umbilikal vena epitel hücrelerine (HUVEC) toksik olduğu bildirilmiştir (Soenen ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar bütün olarak değerlendirildiğinde, kadmiyum içermeyen QD formülasyonlarının, test edilen canlıların veya hücre hatlarının oldukça çeşitli olması, toksik cevabın da farklı olabileceğini göstermektedir. Bu yüzden bu materyaller farklı hücre hatları ve farklı canlılarda toksikolojik açıdan incelenmeli, farklı tip QD'ların aynı çalışmada karşılaştırılması gerçekleştirilmelidir. Bu amaçla yapılan tez çalışmasında, bu üç farklı tip QD'un sebep olduğu toksisitenin tek bir model organizma ve aynı parametreler üzerinden değerlendirilerek karşılaştırılabilmesi hedeflenmektedir.

1.4. Bir model organizma olarak zebra balığı (*Danio rerio*)

Anavatanı Bangladeş ve Hindistan'ın kuzeydoğusunun yerel havzaları olan Zebra balığı, Cyprinidae ailesine ait tropikal bir kemikli balıktır (Barman, 1991; Spence ve ark., 2006). Bu türün sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Regnum: Animalia

Phylum: Chordata

Classis: Actinopterygii

Ordo: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Genus: Danio

Species: *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

Zebra balığı (*Danio rerio*), yaklaşık 40 yıldır biyolojik araştırmalarda tercih edilen, özellikle genetik, rejenerasyon ve toksikoloji çalışmalarında güçlü bir model organizma olarak tercih gören bir tatlısu akvaryum balığıdır (Li ve ark., 2017). Bakım ve manipölasyon kolaylığı, verimlilik, hızlı gelişme, küçük boyut, uygun kültür koşulları, üreme ve larva bakımındaki kolaylıklar gibi bir çok avantajıyla, hem *in vivo* hem de *in vitro* toksikolojik çalışmalar için yaygın olarak kabul gören bir modeldir (Padilla ve Glaberman, 2020). Ayrıca, metabolik enzimlerinin %50'den fazlasının zebra balığı ve insanlar arasında korunmuş olması, zebra balığı araştırmalarının insan çalışmaları için büyük bir referans değerine sahip olmasını sağlar (Li ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2017).

Günümüzde zebra balığı, nörolojik bozukluklar (Gawel ve ark., 2019; Demin ve ark., 2019; Fontana ve ark., 2019), hematoloji (Zizioli ve ark., 2019), nanotıp (Sieber ve ark., 2019), endokrinoloji (Vancamp ve ark., 2019), metabolik hastalıklar (Zhang ve Hamza, 2019) ve kanser (Wrighton ve ark., 2019) gibi bir çok alandaki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakta olan bir model organizmadır. Bunlara ilaveten zebra balığı, genotoksisite ve nanoekotoksisite çalışmalarında da uygun bir model olarak kullanılmaktadır (Akan, 2012; Gülsoy ve ark., 2015; Haque ve Ward, 2018)

Bunlara ilaveten, ekotoksikolojik değerlendirmeler için Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) kimyasal maddelerin biyotik sistemlere etkisini belirlemek amacıyla önerdiği balık testleri bulunmaktadır. OECD, zebra balığının bu testlerde kullanılacak türler arasında avantajlı olduğu belirtmiştir (OECD, 2014).

1.5. Tez çalışmasında ifadeleri incelenen biyomarkör proteinler

Biyolojik belirteçler olarak da adlandırılan biyomarkörler, biyolojik bir aktivite veya işlemin varlığını tespit ederek durumun ortaya konmasını sağlayan göstergelerdir (Alharbi, 2020). Çeşitli kirleticiler veya kimyasallar canlı organizmalar üzerinde biyokimyasal, fizyolojik veya histolojik değişimlere sebep olarak anormallikler meydana getirmektedirler. Bahsedilen bu değişimler, biyolojik gösterge veya biyo-belirteç anlamına gelen biyomarkör terimi ile ifade edilmektedir. Biyomarkörlerden saha veya

laboratuvar çalışmalarında bitki, hayvan ve mikroorganizmaların kimyasala maruz kalma durumunu veya kimyasaldan ne şekilde etkilendiğinin ortaya konması amacıyla yararlanılmaktadır (Huggett ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında QD'ların ve CdCl₂'ün, çevresel toksikolojide önemli birer belirteç olan ısı şoku proteini 90 (Hsp90), peroksiredoksin 1 (Prdx1) ve Rad51 rekombinaz (Rad51) ifadelerine olan etkileri araştırıldığı için aşağıda ayrıntılı bilgi sunulmuştur.

1.5.1. Isı Şoku proteini 90 (Hsp90)

Çeşitli antropojenik aktiviteler sonucu doğal ortama binlerce farklı madde salınmaktadır. Salınan bu maddeler nedeniyle farklı sistematik gruplara ait canlılar akut ve kronik stresle yüz yüze gelmektedir. Bu akut veya kronik stres durumları hücreye zarar verebilir ve homeostazisini bozabilir. Bu nedenle organizmalar, stres kaynaklı hasarı azaltmak, hücrel homeostaziyi sürdürmek ve yeniden kurmak amacıyla hücrel strese tepki vermek amacıyla bir yol geliştirmişlerdir. Stres durumlarına karşı hücrenin vereceği tepki yolları, çevresel stres durumlarında rol oynamaktadır ve memeliler de dahil olmak üzere taksonlar arasında yüksek oranda korunmaktadır. Stresörler, spesifik genleri hedefleyerek strese tepki yollarını aktive ederler (Gupta ve ark., 2010). Bu strese tepki yollarından biri olan “ısı şoku tepkisi”, birçok proteinin kesintisiz sentezi ile karakterize olan, ısı şoku proteinlerinin rol oynadığı başlıca strese tepki yollarından biridir (Westerheide ve Morimoto, 2005).

Isı şoku tepkisi ilk olarak 1962 yılında *Drosophila melanogaster* türünde keşfedilmiştir (Ritossa, 1962). Ritossa'nın, *D. melanogaster* türüne ait larvalara yüksek sıcaklık veya farklı kimyasal ajanlar uygulamasının ardından tükürük bezlerinde bulunan politen kromozomlarda bir dizi “puff” aktivasyonu gözlemlemiştir. Daha sonra, Tissières ve ark. (1974) *Drosophila*'nın ısı şokuna maruz kalmasının, “ısı şoku proteinleri” (HSP'ler) veya “stres proteinleri” olarak adlandırılan bir dizi yeni proteinin senteziyle sonuçlandığını gözlemlemiştir. HSP'ler yalnızca ısı artışı durumunda yani “ısı şoku” uygulamasında değil, soğuk şoku, pestisit, solvent, ağır metal, patojenik enfeksiyon veya protein hasarına neden olabilecek herhangi bir ani değişiklik gibi çevresel stres altında organizmaları hasardan korumak ve hasarlı proteinleri işlevsel üç boyutlu yapılarına geri kazandırmada da önemli rol oynamaktadır (Liu ve ark., 2016).

İngilizce “Heat Shock Proteins” olarak adlandırılan ısı şoku proteinleri (HSP’ler), hücrel ekspresyon seviyesi yüksek ve oldukça güçlü hücre koruyucu özelliğe sahip moleküler şaperonlardır (Garrido ve ark., 2006). Yukarıda da bahsedildiği gibi akut veya kronik stres durumları proteinlerin hatalı katlanması, protein aggregasyonu veya düzenleyici komplekslerin bozulmasına yol açar. Bu şaperonlar, protein homeostazisinde görev alarak dengenin yeniden kurulmasını sağlar (Mjahed ve ark., 2012). Küçük saldırılara bile duyarlı oldukları için HSP’ler, hücrel tehlikenin erken biyo-göstergesidir ve çevresel stres durumları için biyomarkör olarak kullanılmaya oldukça uygun proteinlerdir (Gupta ve ark., 2010).

Isı şoku proteinleri ailesine ait proteinler isimlerini genellikle moleküler kütlelerinden almaktadırlar. HSP’ler genel olarak 5 ana sınıf olarak gruplandırılmaktadır: küçük Hsp’ler, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve Hsp100 (Gupta ve ark., 2010). Bu sınıflar arasında ısı şok proteini 90 (Hsp90), ökaryotlarda canlılık için gerekli olan bol ve yüksek oranda korunmuş ve substrat seçiciliğine sahip bir moleküler şaperondur (Wandinger ve ark., 2008). Fonksiyonu ise bir grup sitozolik proteinin katlanmasına, yapısal bütünlüğünün korunmasına ve doğru bir şekilde ifade edilmesine katkıda bulunmaktadır. Substratlarının önemli bir kısmı, hücre döngüsü kontrolü ve sinyal iletiminde yer alan proteinlerdir (Picard, 2002). Normal koşullarda Hsp90 memeli hücrelerinde bol miktarda bulunan bir protein olup, çevresel bir stres durumunda sentezleri 3 kattan 5 kata kadar artmaktadır (Welch, 1990).

1.5.2. Peroksiredoksin 1 (Prdx1)

Serbest radikaller, son yörüngesinde eşleşmemiş elektronu bulunan atom veya moleküller olup hücrel metabolizmanın olağan ürünleridir. Eşleşmemiş elektron bulundurmaları nedeniyle kararsız yapıdalardır ve bu yüzden oldukça reaktiflerdir. Çünkü kararlı hale geçebilmeleri için çevresinde bulunan diğer moleküllerden elektron koparırlar ve bu yapıları da birer serbest radikal hale getirerek bir zincir reaksiyonu başlatır, böylece hücreye zarar vermiş olur. Reaktif oksijen veya nitrojen türleri (ROT/RNT), serbest radikal veya non radikal reaktif türleri içerirler ve endojen veya eksojen kaynaklı oluşabilirler. Endojen ROT kaynakları mitokondri, peroksizom veya endoplazmik retikulum gibi oksijen tüketimi fazla olan organellerdir. Eksojen ROT kaynaklarına ise su ve hava kirliliği, ağır metaller, pestisitler, bazı ilaçlar ve ultraviyole

ışınları örnek verilebilir. Kaynağı endojen veya eksojen de olsa, hücrede ROT/RNT miktarlarının antioksidan savunma elemanlarından fazla olması hücrede antioksidan dengenin bozulmasıyla sonuçlanır. ROT/RNT miktarlarının antioksidan savunma elemanlarından fazla olması durumu, hücrelerde oksidatif veya nitrosatif strese neden olur (Phaniendra ve ark., 2015).

Her ne kadar düşük veya orta konsantrasyonlarda ROT/RNT hücresel sinyal yolları gibi önemli hücresel süreçlerde rol oynasa da, hücre içi konsantrasyonu artan bu moleküller hücrelerde oldukça önemli olan nükleik asit, protein ve lipidlere zarar verir (Droge, 2002). Bu nedenle hücre içerisinde ROT ve RNT'nin konsantrasyonlarının hassas bir şekilde ayarlanması gerekmektedir. Bu amaçla hücrelerde enzimatik (peroksiredoksin, askorbat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) veya non-enzimatik (glutatyon, askorbat, karotenoid ve tokoferol) antioksidan sistem elemanları bulunmaktadır (Phaniendra ve ark., 2015).

Peroksiredoksinler, peroksidaz aktiviteleri sayesinde peroksinitrit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve çok daha fazla organik hidroksiperoksitleri detoksifiye ederek hücresel seviyesinin azaltılmasını sağlayan önemli antioksidan özelliklere sahip bir protein ailesi olup 6 ayrı izoforma (Prdx1-Prdx6) sahiptir (Detienne ve ark., 2018). Her ne kadar sitozolde bulunan peroksiredoksinlerin konsantrasyonları aynı göreve sahip olan glutatyonlardan 100 kat daha az olsa da, peroksiredoksinler daha düşük pKa değerlerine sahiptir ve H_2O_2 için hız sabitleri glutatyonlardan 106 kat fazladır. Bunun sonucu olarak, hücrelerdeki H_2O_2 'in %99'undan fazlası glutatyon veya katalaz yerine peroksiredoksinlerle reaksiyona girer (Peskin ve ark., 2007; Winterbourn ve Hampton; 2008; Kwon ve ark., 2012). Bu enzimler peroksitleri parçalamak üzere redoks-aktif sisteinleri kullanır. İlk sınıflandırmaları katalizle doğrudan ilişkili sistein kalıntılarının sayısına bağlı olarak 1-Cys ve 2-Cys olarak iki alt grup şeklinde olsa da, daha sonradan yapılan yapı ve fonksiyon analizleri ile 2-Cys grubu da kendi içerisinde tipik ve atipik olarak ayrılmıştır. Sonuç olarak peroksiredoksinler 1-Cys, atipik 2-Cys ve tipik 2-Cys olarak üç alt grup halinde kategorize edilmiştir (Wood ve ark., 2003).

Peroksiredoksinlerin katalitik mekanizması, içerdikleri sistein kalıntısında bulunan sülfür atomunun substratta bulunan peroksit bağlarına saldırmasına dayanır. Bu görevlerini peroksidasyon, resolüsyon ve geri dönüşüm olarak adlandırılan üç adımda

tamamlarlar. Bu adımlardan her üç Prdx alt grubu için de ortak olan ilk adım peroksidasyondur. Bu aşamada peroksidatik sistein (Cys-S_PH), peroksit substratına saldırır ve sistein-sülfenik aside (Cys-SOH) oksitlenir. İkinci aşama olan resolüsyon, sistein-sülfenik asidin çözünmesi aşaması olup, bu üç Prx sınıfı için ayırt edicidir. Çünkü, tipik veya atipik 2-Cys Prdx sınıflarında peroksidatik sisteinin yanı sıra katalitik sistein de bulunmaktadır (Cys-S_R). Peroksidatik sisteini sülfenik asitten kurtarmak üzere katalitik sistein, -OH molekülünü uzaklaştırır. Fakat bunun sonucu olarak peroksidatik sistein ile katalitik sistein arasında disülfid bağ kurulmuş olur. Geri dönüşüm aşaması ise bu sisteinlerin arasındaki bağı kaldırarak peroksiredoksinin tekrar kullanılabilir hale getirilmesini sağlar. Bu aşamada da hücreye spesifik olan farklı disülfid oksiredüktazlar (örn: Tiyoperoksiredoksinler) sisteinler arasındaki disülfid bağı çözer ve geri dönüşüm aşaması da tamamlanmış olur. 1-Cys peroksiredoksinlerde ise sadece peroksidatik sistein bulunduğundan, hem resolüsyonu hem de geri dönüşümü tiyol içeren herhangi bir indirgeyici molekül gerçekleştirmektedir (Wood ve ark., 2003; Detienne ve ark., 2018; Abbas ve ark., 2019).

Bunlara ilaveten, ortamda bulunan peroksit konsantrasyonunun yoğunluğuna bağlı olarak peroksiredoksin molekülünde gözlemlenen hiperoksidasyon durumu da söz konusudur. Hiperoksidasyon, oksidize olarak peroksidatik sisteinin sistein-sülfenik aside dönüşmüş olmasına rağmen, resolüsyon aşamasına geçmeden tekrar oksidize olarak sistein-sülfenik aside dönüşmesidir (Cys-SOH, Cys-SOOH'a oksitlenir) ve hücre için tehlikeli bir durumdur. Ölüm ucu olarak da adlandırılan bu sülfenik asit uçları, hücre içi peroksit konsantrasyonu çok yüksek seviyelere ulaştığında peroksiredoksin molekülünün resolüsyon aşamasına girmesine fırsat olmadan, hemen tekrar bir peroksit bağına daha saldırmasıyla oluşmaktadır (Veal ve ark., 2018; Detienne ve ark., 2018). Hiperperoksidasyon, 1-Cys ve atipik 2-Cys peroksiredoksinler için geri dönüşümsüz olmasına rağmen, sulfiredoksinler tipik 2-Cys peroksiredoksinler için geri dönüşüm sağlayarak bu moleküllerin tekrar kullanılabilmesine olanak vermektedir (Veal ve ark., 2018; Woo ve ark., 2005; Wood ve ark., 2003). Fakat, hiperoksidize olmuş bir peroksiredoksin tekrar bir peroksit ile tepkimeye girer ve sistein sülfenik asit (Cys-SOOOH) oluşursa, bu molekül sülfiredoksinlerle bile tekrar kullanılabilir hale getirilemez ve bu reaksiyonlarda tekrar kullanılamaz (Rhee ve Woo, 2020).

Peroksiredoksinlerin her ne kadar antioksidan savunma sisteminde rol oynayan proteinler olsa da, ayrıca hücre büyümesi, farklılaşma, embriyonik gelişim, bağışıklık yanıtı, apoptoz, lipid metabolizması ve hücresel homeostaz gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları da modüle eder (Abbas ve ark., 2019). Tez çalışmasında ekspresyon seviyesi incelenen Prdx1, peroksiredoksinlerin tipik 2-Cys alt grubuna dahil olan ve antioksidan görevlerinin yanı sıra tümör baskılayıcı (Cao ve ark., 2009; Neumann ve ark., 2003), DNA oksidasyonuna karşı koruyucu (Egler ve ark., 2005), uzun ömür için gerekli (Neumann ve ark., 2003), omurilik hasarında seviyesi yükselen (Huang ve ark., 2015), vasküler düz kas hücreleri fonksiyon bozukluğunda potansiyel bir koruyucu (Maltese ve ark., 2017), fakat kanser ilerlemesini de uyarabildiği (Riddell ve ark., 2011) belirtilen bir proteindir.

1.5.3. Rad51 Rekombinaz (Rad51)

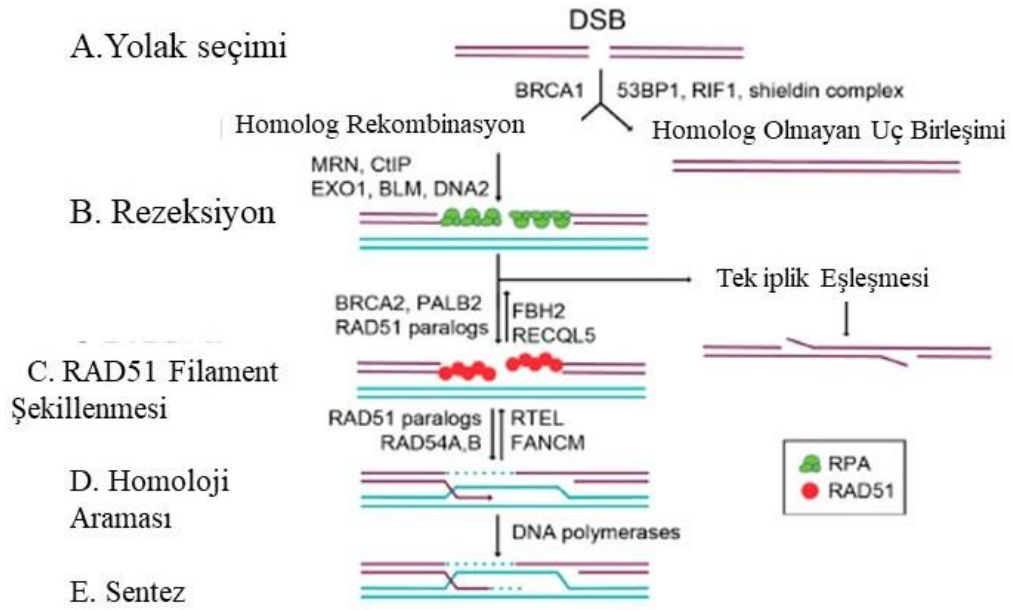
Hücrelerde her gün endojen veya ekzojen etmenler kaynaklı, farklı çeşitlerde DNA hasarları oluşmaktadır. DNA hasarına sebep olan bu etmenlerden endojen yani spontan etmenler yanlış eşleşmeler, insersiyon veya delesyon; deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler; depurinasyon ve depirimidinasyon gibi baz kayıpları; oksidatif hasar; replikasyon hataları olarak sınıflandırılmıştır. Eksojen yani çevresel etmenler ise kimyasal ajanlar, ultraviyole veya iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlardır (Onur ve ark., 2009). Hücreler ise bu hasarlardan arınıp genomik stabiliteyi korumak amaçlı tamir mekanizmaları geliştirmiştir (Laurini ve ark., 2020). Hücrelerde bulunan bu tamir mekanizmaların en önemli özelliği her birinin belirli bir hasar türüne spesifik olmasıdır (Giglia-Mari ve ark., 2011).

Baz eksizyon tamiri (BER), nükleotid eksizyon tamiri (NER), yanlış eşleşme eksizyon tamiri (MER) gibi tamir mekanizmaları DNA'daki hasarlı bazın oligonükleotid parçalarının çıkarılması ve yerine doğru bazın yerleştirilerek oluşan çentiğin ligasyon aracılığıyla kapatılması prensibine dayanan tamir mekanizmalarıdır (Kulaksız ve Sancar, 2007; Onur ve ark., 2009). DNA tek veya çift iplik kırıkları ise replikasyon hataları, ROT, UV/iyonize radyasyon sebebiyle oluşabildiği gibi bir çok genotoksik ajan da bu kırıkların oluşumuna sebep olmaktadır (Caldecott, 2008; Ahnström ve ark., 1973; Chatterjee ve Walker, 2017; Bhattacharjee ve Nandi, 2017). DNA çift iplik kırıkları (DSB), bu hasarlar arasında en zararlısıdır. Çünkü bu kırıkların bir tanesinin bile onarılamaması sonucunda

kromozom kaybı ve hücre ölümü görülebileceği gibi, yanlış onarımı da kromozomal translokasyonlar ve tümör gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Onur ve ark., 2009; Shibata and Jeggo, 2014). Metal içeren nanopartiküllerin ve kadmiyumun da DNA çift iplik kırıkları oluşumunu indükledikleri bilinmektedir (Mahaye ve ark., 2017; Rozgaj ve ark., 2002; Fourie ve ark., 2007; Karlsson, 2010).

DNA çift iplik kırıkları (DSB), homolog olmayan uç birleşimi (Non-homolog End Joining, NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR) olarak adlandırılan iki ayrı yolak ile onarılabilmektedir (Şekil 1.5). Bu yolakların isminden de anlaşılabilir olduğu gibi, NHEJ kırık uçların doğrudan ligasyonunu içerirken, HR her iki kırık ipliğin onarımı için bir şablon olarak kullanacağı sağlam bir homolog sekansa ihtiyaç duyar. Bu yolaklar arasında hangisinin seçileceği ise kırık DNA ucunun yapısına ve hücre döngüsü fazına bağlıdır (Symington ve Gautier, 2011). NHEJ mekanizması genellikle hücrede baskın olan G₁ evresinde tercih edilirken, HR sırasında kalıp iplik olarak homolog kromozomu kullanıldığı için S ve G₂ evrelerinde de görülmektedir ve üstelik HR, NHEJ mekanizmasına göre daha güvenilirdir (Sullivan ve Bernstein, 2018).

Hücre DNA çift iplik kırığı tamiri için HR yolağını seçtiği zaman, MRE, RAD50 ve NBS1 proteinlerinden oluşan MRN kompleksi, DNA'nın kırık uçlarında bağlanarak CtIP proteini tarafından 3' tek iplikli DNA çıkıntıları oluşturmasını sağlar. Böylece kırık tamiri için gerekli rezeksiyon (resection: parça alıp çıkarma) işlemi başlatılmış olur. Bu rezeksiyon işlemi MRN/CtIP kompleksinin EXO1 veya BLM ve DNA2 proteinleri ile işbirliği yapılarak yönetilir ve nükleazlar yeteri kadar parça çıkardığında rezeksiyon işlemi sonlanır. Rezeksiyon sonrası 3' DNA uçlarının degrade olması veya sekonder yapıların oluşmasını engellemek için bu uçlar replikasyon protein A (RPA) ile kaplanır. Daha sonra RAD51 proteini, RPA proteinlerini ile yer değiştirerek DNA uçları üzerinde pre-sinaptik filamenti oluşturur. RAD51 aracı proteinlerinin de yardımı ile bu yapı diğer kopyadaki homolog sekansı aramaya başlar. Sekans bulunduğu zaman heterodubleks isimli yapı oluşur ve kalıp zincirden DNA sentezi başlatılarak kırık bölgesindeki eksik nükleotidler tamamlanır (Sullivan ve Bernstein, 2018).

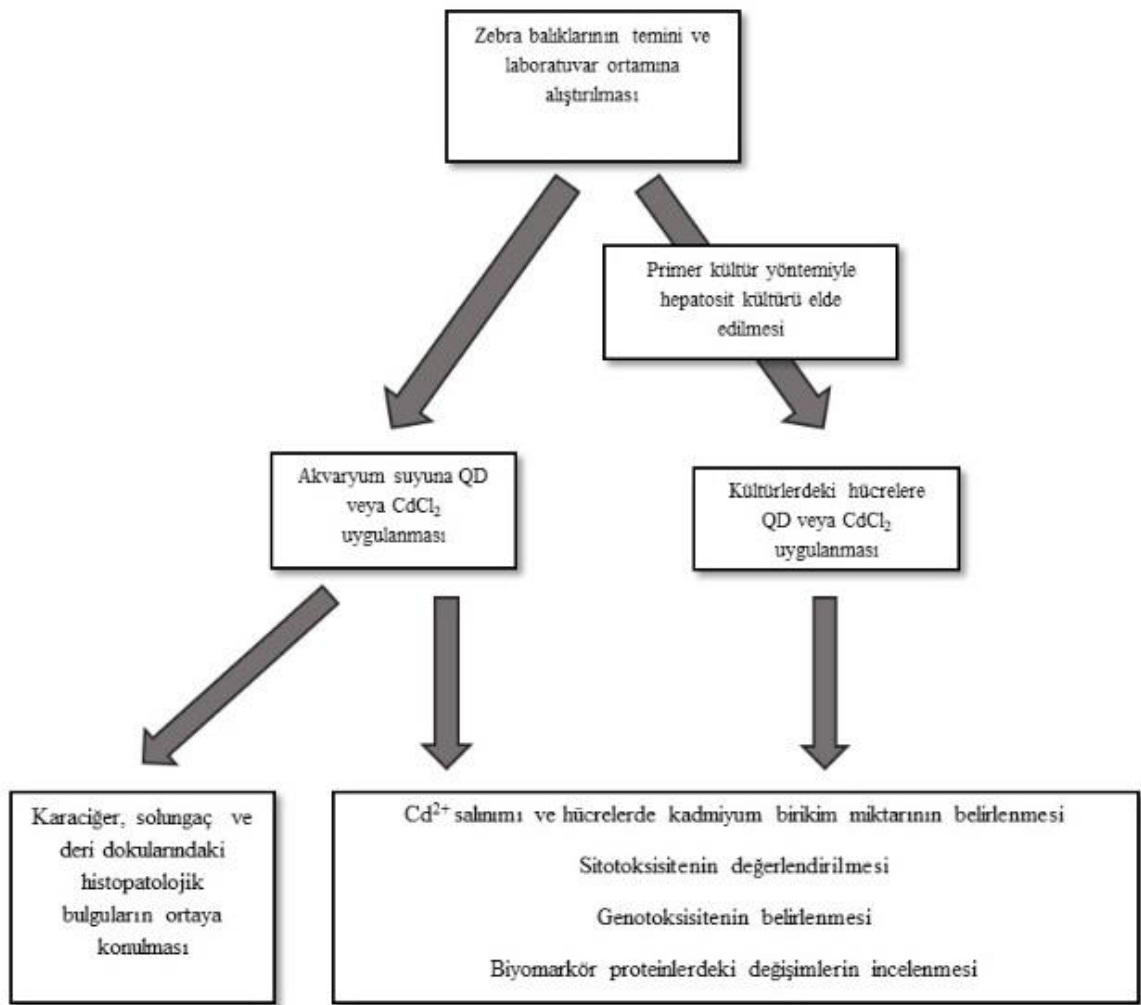


Şekil 1.5. DNA çift iplik kırıklarının homolog rekombinasyon veya homolog olmayan uç birleşimi yolları ile onarılması (Sullivan ve Bernstein, 2018'den).

Rad51 proteini, homolog rekombinasyon sırasında nükleofilament oluşturarak homoloji ve iplik değişimini sağladığı için, DNA hasar onarımı ve genetik stabilitenin sağlanması açısından oldukça önemli rollere sahip bir proteindir (Laurini ve ark., 2020; Conway ve ark., 2004). DNA çift iplik kırıkları tamirinde önemli role sahip olan Rad51 rekombinaz, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda çeşitli ajanların sebep olduğu genotoksisite ile ilişkilendirmek üzere biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2017; Chen ve ark., 2014).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında Quantum Dot (QD) nanomateriyallerinin sadece çekirdek (CdTe), çekirdek/kabuk (CdSe/ZnS) ve kadmiyum içermeyen çekirdek/kabuk (CuInZnS/ZnS) çeşitleri ile kadmiyum tuzunun (CdCl₂) sitotoksik, genotoksik ve histopatolojik etkileri zebra balığı (*D. rerio*) modeli üzerinde araştırıldı. Bu araştırmalar hem primer hepatosit kültürü elde edilerek *in vitro*, hem de direk canlı üzerinde *in vivo* olarak gerçekleştirildi. Deney dizaynı Şekil 2.1’de kısaca özetlendi.



Şekil 2.1. Tez çalışma planı. Farklı özellikteki QD’lar ve CdCl₂’ün balıklardan primer hepatosit kültür hücrelerine *in vitro* ve balıklara direkt olarak akvaryum suyu vasıtasıyla uygulanması ile *in vivo* deneyler gerçekleştirildi. Madde uygulanan balıklar veya hücrelerden alınan örneklerde Cd²⁺ birikimi, sitotoksosite, genotoksosite, biyomarkör proteinlerdeki değişimleri ve histopatolojik değerlendirmelerini gösteren deney akış şeması.

2.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Deney Kitleri

Tezde kullanılan malzemelerin tümü Tablo 2.1’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, sarf malzemeleri ve deney kitleri

Malzeme Adı	Markası
CdTe Quantum Dot’lar	PlasmaChem GMBH
CdSe/ZnS Quantum Dot’lar	Nano Optic Materials, USA
CuInZnS/ZnS Quantum Dot’lar	Nano Optic Materials, USA
Kadmiyum Klorür (CdCl ₂)	Alfa Aesar
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222)	Sigma- Aldrich
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco
Leibovitz's L-15 Medium (fenol red içermeyen)	Gibco
Tripan mavisi çözeltisi (%0,4)	Invitrogen
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco
Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL)	Invitrogen
Gentamisin 10 mg/mL	Sigma- Aldrich
Amfoterisin B 250 µg/mL	Sigma- Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Fosfat Tamponu (PBS) tableti	SantaCruz
Hücre kültürü plakası, 6 kuyulu	SantaCruz
Hücre kültürü plakası, 12 kuyulu	SantaCruz
Hücre kültürü plakası, 96 kuyulu	SantaCruz
96 kuyulu siyah plaka	Nunc
Serolojik pipet, 10 ve 5 mL	SantaCruz
Enjektör filtresi 0,22 µm	SantaCruz
Hücre eleği 70 µm	Falcon
Hücre sayım cihazı lamı	BioRad
Mikrosantrifüj Tüpü, 1.5 mL	SantaCruz
BluCapp 15 mL falkon tüp	CAPP

BluCapp 50 mL falkon tüp	CAPP
Etil Alkol	Merck
Bistüri	IsoLab
Bistüri ucu	Broche
Böcek iğnesi	Bohemia
Suda çözünür tetrazolyum (Water Soluble Tetrazolium, WST-1)	Roche
2'-7'-diklorodihidrofloresan diasetat (H ₂ DCFDA)	Abcam
Coomassie Brilliant Mavisi G-250	Sigma- Aldrich
Fosforik asit (%85)	Sigma- Aldrich
Sığır Serum Albümini (BSA)	Sigma- Aldrich
Tris-HCl	Sigma- Aldrich
KCl	Sigma- Aldrich
MgCl ₂	Sigma- Aldrich
NaH ₂ PO ₄	Sigma- Aldrich
Glukoz	BioLife
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma- Aldrich
Lam	Isolab
Lamel	Isolab
Düşük Kaynama Noktalı Agaroz (LMA)	Sigma- Aldrich
Yüksek Kaynama Noktalı Agaroz (HMA)	Sigma- Aldrich
Hücre Kazıyıcısı	TPP
NaCl	Sigma- Aldrich
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma- Aldrich
NaOH	Sigma- Aldrich
Triton-X	Sigma- Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma- Aldrich
Proteaz İnhibitor kokteyli x100	Sigma- Aldrich
RIPA tamponu	SantaCruz
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma- Aldrich
2-merkapttoetanol	Sigma- Aldrich
Gliserol	Sigma- Aldrich
Bromofenol Mavisi	Sigma- Aldrich

Protein Markörü	PageRuler™, Sigma
Yağsız Süt Tozu	Pınar
Anti-HSP90	Cell Signaling
Anti-PRDX1	Abcam
Anti-RAD51	Cell Signaling
Anti-β-Aktin	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma
WesternBright ECL	Advansa
%10 Formalin	Sigma- Aldrich
Ksilol	Merck
Parafin	Merck
Mikrotom Bıçağı	Leica
Hematoksilen	Merck
Eozin	Merck
Entellan	Merck

2.2. Kullanılan Cihazlar

Araştırmamızda kullanılan tüm cihazlar Tablo 2.2’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Ultrasonik Banyo	Bandelin RK52H
Mikroplaka okuyucu	Biotek Synergy Neo
İnkübatör	Binder
Biyolojik güvenli kabin-Tip 2	Esco
Santrifüj	Nüve
Inverted mikroskop	Olympus CKX31
Şarjlı pipet	Eppendorf
Su banyosu	Thermo Scientific
+4, -20 ve -80°C soğutucular	Arçelik, Bosch
Hücre sayım cihazı	BioRad
Manyetik karıştırıcı	IKA RCT classic

pH metre	Mettler Toledo
Vorteks	IKA RCT
Mikrosantrifüj	Eppendorf
Ultrasonikatör	Bandelin Sonopuls UW 50
Mikro kadmiyum ve referans elektrodları	Lazar Research Laboratories
Nanospektrofotometre	Thermo Scientific
Mini Protean Elektroforez Tankı	BioRad
TransBlot Semidry Blotlama Cihazı	BioRad
Mikrotom	Leica
Işık Mikroskobu	Leica

2.3. Quantum Dot'lar ve CdCl₂

Deneylerde kullanılan QD'ların her birinin suda çözünür olması için karboksilik asit (-COOH) ile termine edilmiş formları tercih edildi. QD'ların parçacık boyut bilgileri üretici firmanın ölçümlerine, zeta potansiyeli ise Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) gerçekleştirilen ZetaSizer analiz sonuçlarına göre, kadmiyum klorür tuzları ile beraber markaları belirtilerek Tablo 2.3'de verildi.

Tablo 2.3. Tez çalışmasında kullanılan QD'ların çalışmadaki isimleri, zeta potansiyeli, nanopartikül çapı ve marka bilgileri.

Materyal	Çalışmada kullanılan ismi	Zeta Potansiyeli (mV)	Nanopartikül Çapı (nm)
CdTe QD	Çekirdek-QD	-14,0	2,55
CdSe/ZnS QD	Çekirdek/kabuk QD	-23,5	4,0
CuInZnS/ZnS QD	Kadmiyum içermeyen QD	-25,4	3,6

In vitro çalışmalar için, hücre canlılığını bölümünde açıklanan yöntemle çekirdek-QD'un zebra balığı hepatositlerinde belirlenen 24 saatlik LC₅₀ değeri (105,9 µg/mL) göz önünde bulundurularak uygulama konsantrasyonları 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL olarak belirlendi. Bu amaçla QD'lar veya CdCl₂, stok çözeltilerinden (25 mg/mL) besiyeri içerisinde seyreltilerek deneylerde kullanıldı. Literatürde zebra balıklarına

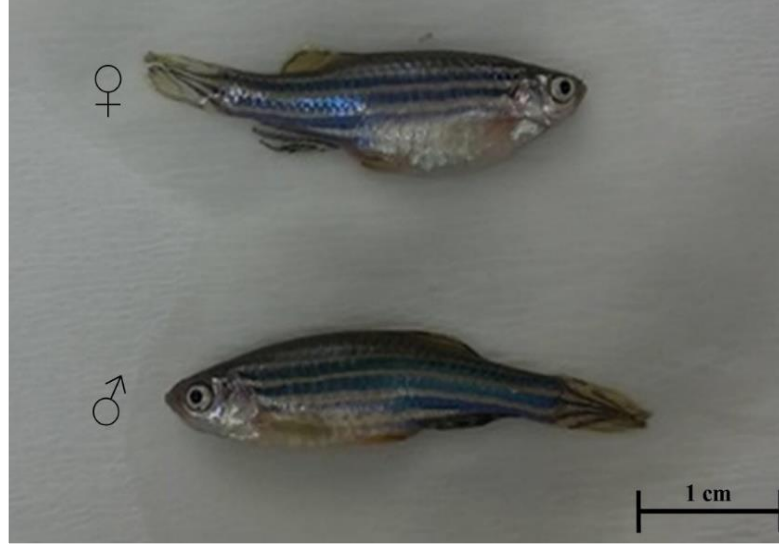
QD'ların uygulandığı bir *in vivo* çalışma bulunmadığından, diğer omurgalı ve omurgasız türlerle yapılan *in vivo* çalışmalar göz önünde bulundurularak *in vitro* konsantrasyonların 1:1000 oranında seyreltilmiş hali olan 25 µg/L, 50 µg/L ve 100 µg/L konsantrasyonları tercih edildi (Louis ve ark., 2010; Ambrosone ve ark., 2012; Leigh ve ark., 2012; Rocha ve ark., 2015). Negatif kontrol olarak *in vitro* çalışmalarda sadece besiyeri, *in vivo* çalışmalarda ise madde ilave edilmeyen akvaryum suyu kullanıldı. Olası bir kümeleşmeyi önlemek için, tüm deneyler öncesinde QD'lar 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda sonike edildi.

2.4. Balıkların Laboratuvar Ortamına Alıştırılması, *In vivo* ve *In vitro* Deneylerin Kurulması

Tez çalışmasında ticari akvaryum satıcılardan (Doğasan Akvaryum, İstanbul) temin edilen, ortalama total boyu $3\pm0,5$ cm ve ortalama ağırlığı $1\pm0,3$ g olan, her iki cinsiyete ait 4-6 aylık ergin zebra balıkları kullanıldı (Şekil 2.2). Balıklar laboratuvara temininden itibaren aktif karbon filtreden geçirilmiş, $28\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, $8,0\pm 0,3$ pH değerinde ve çözünmüş oksijen seviyesi $8,1\pm 0,3$ mg/L olan dinlendirilmiş şebeke suyunda en az 1 hafta bekletilerek günde iki kez pelet yem (Goldy Gran, Sera; Ham protein: % 33,00, ham yağ: % 7,20, ham lif: % 4,80, nem: % 5,40, ham kül: % 5,80) ile beslendi.

2.4.1. Balıklara kimyasal uygulanması

In vivo etkileri belirlemek amacıyla balıklar, 15'er litre su içeren akvaryumlara, her akvaryumda eşit sayıda balık olacak şekilde rasgele yerleştirildi (n=6). Bu akvaryumlara, 25 µg/L, 50 µg/L ve 100 µg/L konsantrasyonlarında kimyasalları elde etmek üzere, 30 dakika sonik banyoda sonike edilen QD'lar veya CdCl₂ ilave edildi. 24 saatlik sürenin sonunda balıklar 500 mg/L ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222) ile anestezi edilerek solungaç, karaciğer ve deri dokuları disekte edildi.



Şekil 2.2. MS-222 ile anestezi edilen zebra balıkları.

2.4.2. Primer hepatosit kültürü eldesi

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan hemen önce, tamamlanmış Lebowintz 15 (L-15) besiyeri ve antibiyotik-antimikotik içeren fosfat tuzlu tampon (PBS) solüsyonları taze olarak hazırlandı. Steril kabin içerisinde hazırlanan bu çözeltilerin içerikleri ve hazırlanışı aşağıda verildi.

Tamamlanmış L-15 besiyeri: %1 penisilin/streptomisin, %1 gentamisin, %2 amfoterisin B, %5 fetal sıgır serumu (FBS), %91 Lebowintz 15 besiyeri. Tüm solüsyon hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı enjektör filtresinden geçirildi. Tamamlanmış besiyeri +4°C’de 1-2 hafta kadar saklanabilmesine rağmen bu çalışmada her deney öncesi taze olarak hazırlandı. Stok antibiyotik, antimikotik ve FBS çözeltileri ise -20°C’da saklandı.

Antibiyotik ve Antifungal ajan ilaveli PBS: PBS solüsyonu 100 mL distile suyun içerisine 1 adet PBS tableti atılıp manyetik karıştırıcıda karıştırılmasının ardından otoklavlanarak hazırlandı. Daha sonra steril kabin içerisinde %1 penisilin/streptomisin, %1 gentamisin, %2 amfoterin B eklenerek antibiyotik ve antifungal ilaveli PBS elde edildi.

Primer hücre kültürü elde edilmesi için, laboratuvar ortamına alınan balıklar etil metanosülfonat (MS-222, 500 mg/L) kullanılarak anestezi edildi. Anestezi sonrası

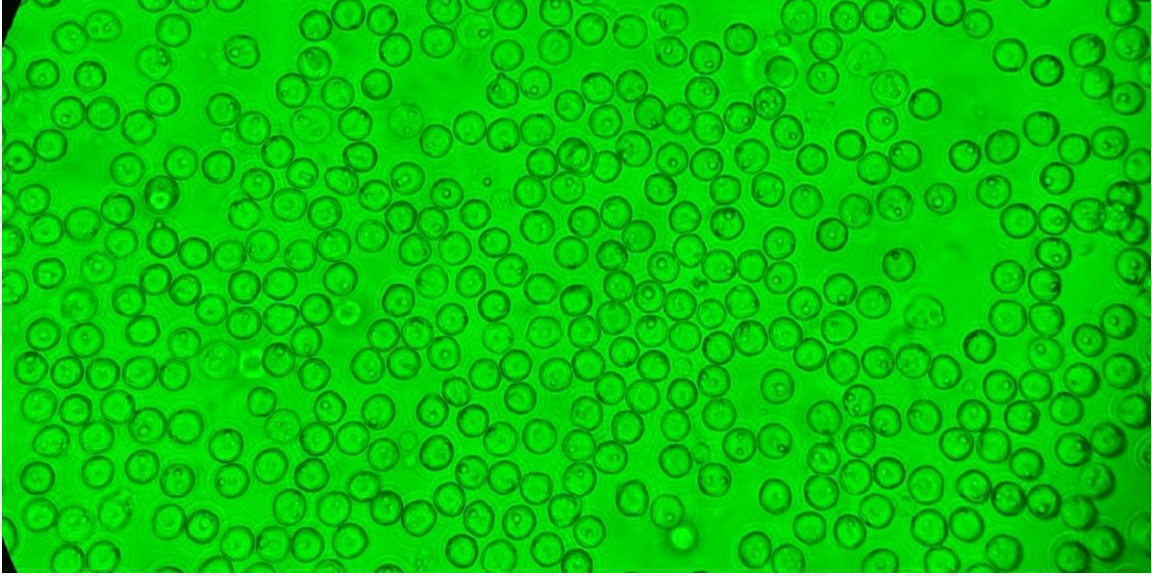
balıkların vücut yüzeyleri %70 etil alkol ile temizlenerek, steril kabine alındı. Balıkların abdomenlerinden kesi açılarak, otoklavlanmış ince pensler ve steril iğneler yardımıyla balığın dış yüzeyine temasından kaçınılarak karaciğerler çıkartıldı. Vakit kaybetmeden buz üzerinde bekletilen, antibiyotik ve antifungal ajanlar ilaveli PBS'e alındı.

Karaciğer dokusu steril petri kabı içerisinde pens yardımıyla küçük parçalara ayrılarak içerisinde %0,5 konsantrasyonunda Tripsin-EDTA çözeltisi bulunan steril behere aktarıldı. Isıticılı manyetik karıştırıcıda 200 devir/dakika (rpm) ve 36°C sıcaklıkta 15 dakika karıştırıldı. Süre sonunda enzimi inaktive etmek için, Tripsin-EDTA hacminin 2 katı kadar tamamlanmış L-15 besiyeri eklendi. Elde edilen bu hücre süspansiyonu hücrelerin birbirlerinden tamamen ayrılmasını sağlamak amacıyla 70 µm por çapına sahip steril naylon elekten geçirildi.

Bu aşamaya kadar olan adımlar karaciğer hücrelerinin izolasyonu olarak adlandırılmaktadır ve bu aşamanın sonunda izolat adı verilen, hepatositler de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerini içeren bir hücre süspansiyonu elde edilmektedir. Genel olarak bir teleost karaciğeri hacmen yaklaşık %80 oranında hepatositlerden oluşmaktadır. Geriye kalan %20'lik kısımda endotel hücreleri, safra kanallarına ait epitel hücreleri, makrofajlar ve yağ hücreleri ve boşluklar bulunmaktadır (Segner, 1998). Her ne kadar bu hücreler hepatositlere oranla az olsalar da, primer hepatosit kültürü elde edilmek isteniyorsa bu hepatositler izolat içerisinde ayrılmalıdır. İzolat içerisinde hepatositleri ayırmanın en basit ve geçerli yöntemi de düşük devirde santrifüj etmektir. Bu nedenle, elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atılarak besiyeri ile resüspanse edilip yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilip toplandı. Son olarak sayılmak ve kültür kaplarına ekilmek üzere 1 mL besiyerinde resüspanse edildi.

Elde edilen temiz hücre süspansiyonundaki hücre miktarını belirlemek üzere süspansiyondan 50 µL örnek alınarak 1:1 oranında %0,4 tripan mavisi ile karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon sonrasında hücre-boya karışımından 10 µL örnek, BioRad TC20 cihazına ait lama yüklendi ve ilgili cihazda hücrelerin sayımı gerçekleştirildi.

In vitro deneyleri gerçekleştirmek üzere, elde edilen hücrelerden istenilen sayıda hücre, deneylere uygun plakalara ekilerek test kimyasallarını içeren veya içermeyen (negatif kontrol) besiyerlerinde 24 saat süre ile inkübe edildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Primer kültüre alınan Zebra Balığı hepatositlerinin faz kontrast mikroskobu altındaki görünümü.

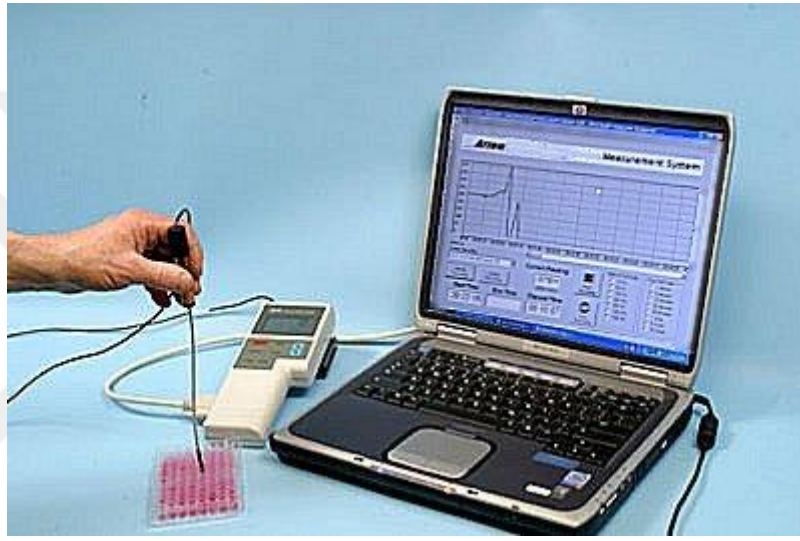
2.5. Akvaryum Suyu, Besiyeri ve Hücre İçi Kadmiyum Miktarlarının Belirlenmesi

QD’lardan kaynaklanan sitotoksik ve genotoksik etkileri hücre içi, besiyeri veya akvaryum suyunda bulunan $[Cd^{2+}]$ miktarları ile ilişkilendirmek için, $[Cd^{2+}]$ miktarları kadmiyum ve mikro referans elektrotlu bir iyon ölçüm cihazı ile, üretici firmanın ve daha önce yapılmış çalışmalardan elde ettiğimiz prosedüre göre aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi (McLean ve ark., 2008; Burgos-Cara ve ark., 2016; Mamet ve ark., 2017).

In vitro çalışmalarda, ilk olarak hücreler 12 kuyulu plakalara kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler, 25, 50 ve 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarında çekirdek tip QD, çekirdek/kabuk tip QD, $CdCl_2$ içeren veya kimyasal içermeyen (negatif kontrol) besiyerlerine maruz bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkandı ve hücre kazıyıcısı ile toplandı. *In vivo* uygulamalar için ise 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında çekirdek tip QD, çekirdek/kabuk tip QD veya $CdCl_2$ içeren ve negatif kontrol olarak hiç madde içermeyen akvaryum suyuna maruz bırakılan balıklar kullanıldı. Uygulama sonunda balıklar MS-222 ile anestezi edilerek baki kılara ait solungaç ve karaciğer dokuları toplandı. Hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylere ait örnekler, ultrasonik prob ile homojenize edildi. Örnekler santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatant toplandı.

Ortamda bulunan $[Cd^{2+}]$ miktarının belirlenmesi amacıyla, hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerden hemen önce, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda çekirdek tip QD, çekirdek/kabuk tip QD veya $CdCl_2$ içeren ve negatif kontrol olarak hiç madde içermeyen besiyerleri veya akvaryum sularından örnekler alındı.

Son olarak, iyon ölçüm cihazı bilgisayara bağlandı. İyon ölçüm cihazına bağlı olan kadmiyum ve referans elektrodları, yukarıda anlatılan şekilde elde edilen örneklerle direkt olarak daldırıldı. Cihaza ait Arrow Ion yazılımı (Lazar Research Laboratories, Inc.) ile örneklerde bulunan $[Cd^{2+}]$ miktarları otomatik olarak hesaplandı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İyon ölçüm cihazı ve yazılımı kullanılarak örneklerde bulunan iyon miktarlarının hesaplanması (<http://www.shelfscientific.com/cgi-bin/tame/newlaz/microionn.tam>).

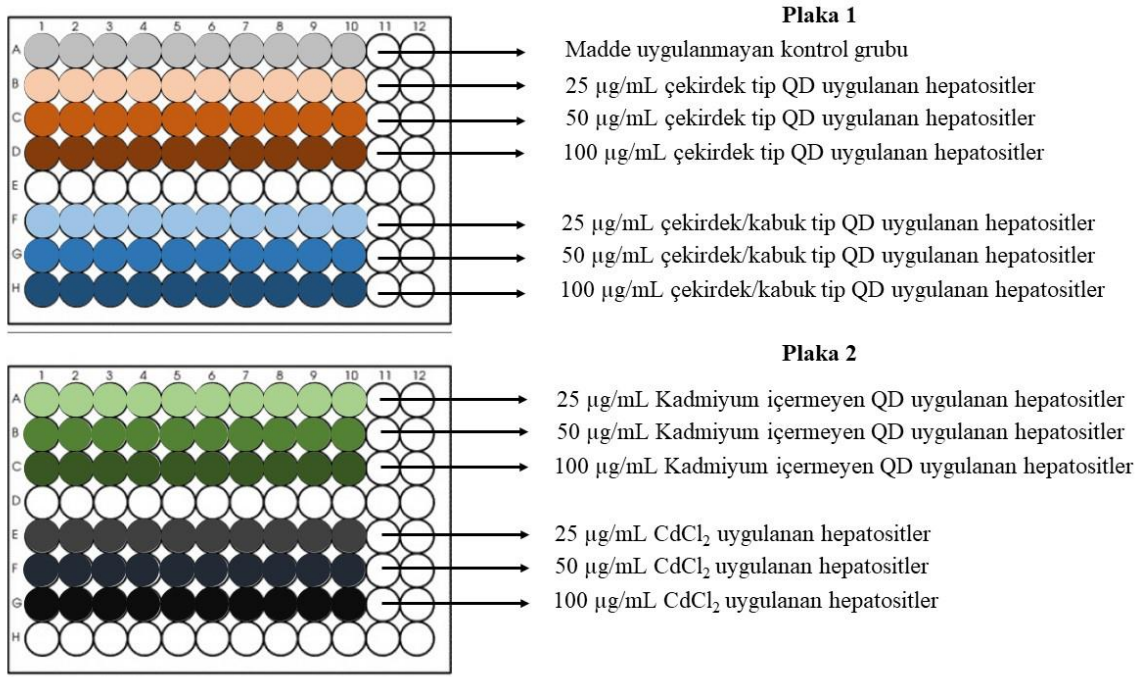
2.6. Quantum Dot'ların ve $CdCl_2$ 'ün Primer Kültürdeki Hepatositler Üzerindeki Sitotoksitesinin Belirlenmesi

2.6.1. WST-1 Testi ile çekirdek QD'ler için LC_{50} değerinin ve tüm QD'lar ile $CdCl_2$ 'ün hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi

WST-1 testi (Water Soluble Tetrazolium, suda çözünür tetrazol) *in vitro* ortamda hücre canlılığını ölçmeye yarayan, formazanın kolorimetrik ölçümüne dayanan bir test yöntemidir (Tokur ve Aksoy, 2017). Tetrazolyum tuzları, *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücrelerin mitokondrilerinde elektron alarak indirgenir ve renkli olan formazan yapısına

dönüşür (Mossman, 1983). Böylece renk değişiminin belirli bir dalga boyunda absorbansının alınması ile hücre canlılığı ölçülmektedir.

Tez çalışmasında hücre canlılığı, WST-1 çözeltisi kullanılarak üreticinin prosedürüne göre ölçüldü. Taze izole edilen zebra balığı hepatositleri kuyu başına 5×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara her uygulama ve kontrol grubu için 10'ar kuyu tekrarlı olarak ekildi (Şekil 2.5) ve QD veya CdCl_2 içeren veya içermeyen (kontrol) tamamlanmış L-15 besiyeri ile 24 saat inkübe edildi. Deney sonunda her kuyuya 10 μL WST-1 çözeltisi eklendi. 30 dakika inkübasyon sonrası absorbans mikropilaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol grubu olarak QD veya CdCl_2 'e maruz kalmayan kuyular kullanıldı. QD'lerden gelen absorbansı elimine etmek amacıyla, QD içeren ve WST-1 içermeyen kuyular kör olarak kullanıldı (Tang ve ark, 2013b). Deney gruplarının absorbans değerleri kontrol grubunun absorbans değerlerine oranlanıp 100 ile çarpılarak sonuçlar kontrole göre normalize edildi. Böylece elde edilen yüzde canlılık oranları istatistiksel olarak analiz edildi ve grafiklendi.



Şekil 2.5. WST-1 testi ile hücre canlılığını belirlemek üzere 96 kuyucuklu standart plakalara ekilen hepatositlerin mikropilaka üzerindeki yerleşimi ve uygulama grupları.

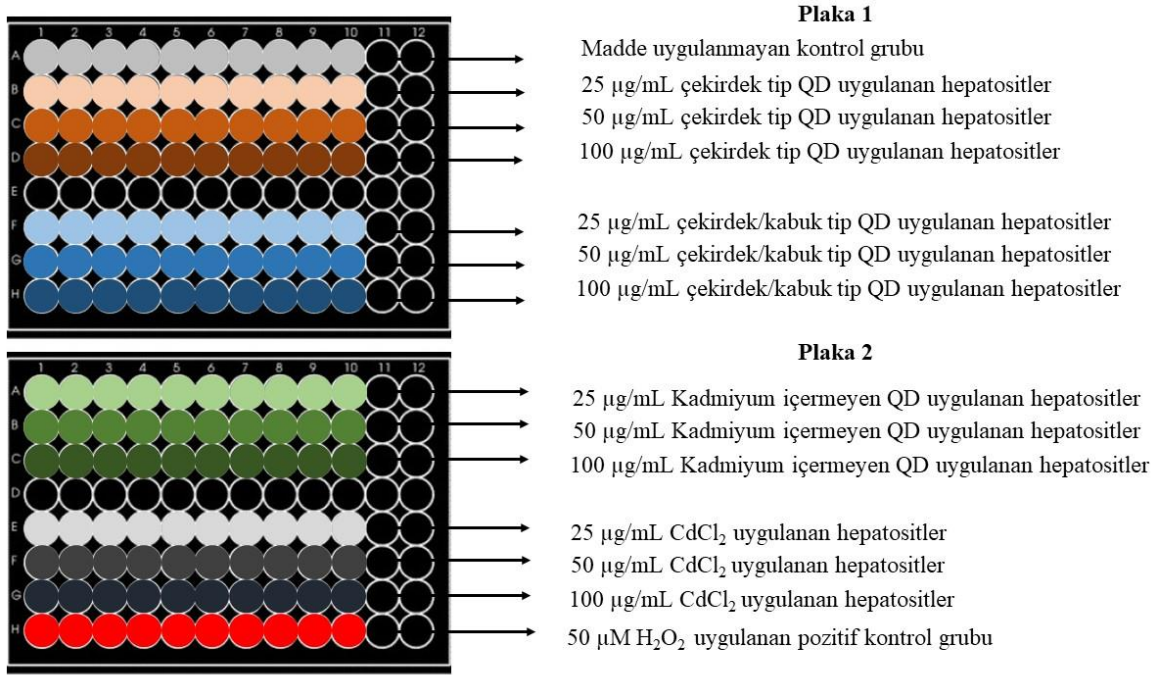
In vitro deneylerde primer kültüre alınan zebra balığı hepatositlerine uygulanacak olan QD'lar ve CdCl_2 'ün konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla öncelikle 24 saatte

hücrelerin yarısını öldüren lethal konsantrasyon (LC₅₀) değeri belirlendi. Bu amaçla primer kültüre alınan hepatositler 0; 0,001; 0,01; 0,1, 1, 10, 100 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında çekirdek tip QD'lere maruz bırakıldı ve 24 saatlik deney süresinin sona ermesi ile yukarıda anlatılan yöntemlerle hücre canlılığı analiz edildi. Bu değerler kullanılarak istatistik programı ile nonlinear regresyon analizi gerçekleştirilerek LC₅₀ değeri 105,9 µg/mL olarak belirlendi.

2.6.2. Hücre kültüründe reaktif oksijen türlerinin tespiti

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) belirlenmesi, 2'-7'-diklorodihidrofloresan diasetat (DCFH-DA) molekülünün oksidasyonuna dayanan yöntemle hesaplandı. DCFH-DA, normal koşullarda floresan olmayan, hücreye girebilen bir moleküldür. Bu molekül hücre içerisine girdiği zaman, hücrede bulunan ROT ile oksidasyona uğrayarak floresan bir molekül olan DCF diklorofloresan (DCF)'a dönüşür. Hücrelerde biriken DCF'in floresan ölçümü ile ROT miktarı hesaplanır (Eruslanov ve Kusmartsev, 2010).

Yapılan çalışmada ROT seviyelerinin belirlenmesi için DCFDA-Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam) kullanıldı. Öncelikle 5,3 mg DCFDA tartılarak 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO)'te çözünerek DCFDA stok solüsyonu hazırlandı (10 mM). 10 mL fenol red içermeyen tamamlanmış besiyerine bu stoktan 10 µL eklenerek 10 µM DCFDA içeren besiyeri elde edildi. Hepatositler, 10 µM DCFDA içeren fenol red içermeyen bu besiyerinde 40 dakika 28°C'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben PBS ile yıkandı ve tamamlanmış L-15 besiyerine alındı. Hücreler, her uygulama ve kontrol grubu için 10'ar kuyu tekrarlı, kuyu başına 5×10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyulu siyah plakalara ekilerek, QD veya CdCl₂'ye maruz bırakıldı (Şekil 2.6). Süre sonunda floresan sinyal mikropilaya okuyucuda ölçüldü (eksitasyon 485 nm/emisyon 535 nm). QD'lardan gelen floresan sinyali elimine etmek amacıyla, QD içeren ve DCFDA içermeyen kuyular kör olarak kullanıldı (Tang ve ark, 2013b). Sonuçlar, WST-1 analizinde anlatıldığı şekilde kontrole göre normalize edilerek % ROT birikimleri hesaplandı.



Şekil 2.6. Hücrelerde biriken reaktif oksijen türleri miktarlarını belirlemek üzere 96 kuyucuklu siyah plakalara ekilen hepatositlerin mikropilaka üzerindeki yerleşimi ve uygulama grupları.

2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Doku Düzeyinde Belirlenmesi

Dokularda biriken ROT miktarı, Kim ve ark.'nın (1996) Lebel ve Bondy (1990)' den uyarladığı prosedüre göre ölçüldü. Temel olarak, deney süresi sonunda, QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan, negatif kontrol olarak hiçbir maddeye maruz kalmayan, pozitif kontrol olarak da akvaryum suyu vasıtasıyla %0,05 H₂O₂'e maruz kalan balıklardan disekte edilen solungaç ve karaciğer dokuları ayrı ayrı homojenize edildi. Doku lizatlarındaki protein miktarları Bradford (1976) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle Bradford reaktifi hazırlandı. 10 mg Coomassie Brilliant Mavisi G-250 tartıldı ve 5 mL etil alkol (%95), 10 mL fosforik asit (%85) ve 85 mL distile su ile karıştırıldı (son konsantrasyonlar: %0,01 (w/v) Coomassie Brilliant Mavisi G-250; %4,7 (w/v) etanol; %8,5 (w/v) fosforik asit). Bu solüsyon filtre kâğıtları ile süzülerek karanlıkta ve +4°C'de saklandı. Protein standardı olarak kullanılmak üzere 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında distile suda çözünmüş sıgır serum albümini çözeltileri (BSA) hazırlandı. 96 kuyulu plakanın her kuyusuna 200 µg Bradford reaktifi dolduruldu ve üzerlerine 3'er tekrarlı olarak protein konsantrasyonları belirlenecek olan

örneklerden, standartlardan ve dH₂O'dan 10'ar µL eklendi. Mikroplaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda absrbans ölçümü yapıldı ve standart proteinlerin standart eğrisi çizildi. Bu eğri ile karşılaştırılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

ROT ölçümü için gerekli olan test medymu hazırlamak üzere 0,242 g Tris-HCl, 0,969 g KCl, 0,047 g MgCl₂, 0,239 g NaH₂PO₄ ve 0,54 g glukoz tartıldı ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı (20 mM Tris-HCl, 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM glukoz). 50 µg protein içeren hacimdeki lizat, test medyumunu ile 100 µL'ye tamamlandı ve 96 kuyulu siyah mikroplakaya 10'ar tekrarlı olarak yüklendi. Stok DFCDA çözeltisi DMSO içerisinde 1:1000 oranında seyreltilerek DFCDA çalışma solüsyonu hazırlandı (10 pM/10 µL). Her kuyuya DCFDA çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C sıcaklıkta 30 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi. Ortaya çıkan floresan ürün, 525 nm eksitasyon ve 485 nm emisyon dalga boyunda floresan okuyucuda ölçüldü. Sonuçlar kontrole göre normalize edilerek %ROT birikimleri hesaplandı.

2.8. Comet Analizi

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen comet analizi, DNA iplik kırıklarını tek hücre düzeyinde tespit edilmesine olanak sağlayan hassas bir genotoksisite belirleme yöntemidir (Singh ve ark., 1988). Bu tekniğin en büyük avantajları; tek hücre düzeyinde analiz yaparak daha sağlam istatistiklere olanak vermesi, numune başına oldukça az sayıda hücreye ihtiyaç olması, hasar saptamada yüksek hassasiyet ve hemen hemen her ökaryotik hücrede uygulanabilirdiği olarak sayılabilir (Dhawan ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında uygulanan comet analizi, Dhawan ve arkadaşlarının (2009) protokolüne göre minör değişiklik yapılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Lamların hazırlanması:

Lamlar, üzerinde leke veya kir bulundurmayacak şekilde metanol ile temizlendi ve alevden geçirildi. 100 mL distile suya 1 g yüksek erime noktalı agaroz (HMA) eklenerek mikrodalga fırında eritildi ve %1 HMA çözeltisi elde edildi. Temizlenen lamlar sıcak %1 HMA çözeltisine daldırılarak bir gece kurumaya bırakıldı. Uygulama yapılana kadar +4°C'da saklandı.

Jellerin hazırlanması:

Hücrelerin elektroforezinin gerçekleştirileceği ortam olan jeller, 100 ml PBS ile 0,65 g düşük erime noktalı agarozun (LMA) mikrodalga fırında eritilmesi ile elde edildi. Elde edilen bu %0,65 LMA, 200'er µL olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine paylaştırıldı ve uygulama yapılana kadar +4°C'da saklandı.

Hücrelerin eldesi:

In vitro deneylerde hücre eldesi için, 6 kuyulu plakada kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde QD'lar veya CdCl₂'ye maruz kalan hepatositler kullanıldı. Negatif kontrol grubu için sadece besiyeri, pozitif kontrol için 5 µg/mL Etil Metanosülfonat (EMS) içeren besiyeri kullanıldı. 24 saatlik deney süresinin sonunda kuyulardan besiyerleri dikkatlice uzaklaştırıldı ve kuyular soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler kazıyıcı ile dikkatlice toplanarak PBS ile süspanse edildi.

In vivo deneylerde ise deney süresinin sona ermesi ile karaciğer ve solungaç disekte edildi. Negatif kontrol için akvaryum suyuna hiç madde uygulanmayan, pozitif kontrol için ise %0,05 H₂O₂ uygulanan balıklara ait karaciğer ve solungaç dokuları kullanıldı. Dokular soğuk PBS içerisinde dikkatlice pipetlenerek PBS içerisine dağılmış hücre süspansiyonu elde edildi.

Hücre jel karışımının hazırlanarak lamlara yayılması:

Önceden hazırlanan %0,65 LMA, ısıtıcı blokta 37°C'da ısıtılarak tamamen sıvı bir hal alana kadar beklendi. PBS içerisindeki 5'er µL örnek, 200 µL %0,65 LMA ile karıştırılarak katılaşmasına fırsat vermeden HMA kaplı lamlara (75 µL /lam) yayıldı. İnce bir jel tabakası elde edebilmek için hücre-LMA karışımının üzerlerine lamel kapatılıp bastırıldı ve +4 °C de bir süre bekletildi. Lamaların üzerlerindeki lameller jele hasar vermeden çıkartılarak lizis aşamasına geçildi.

Hücrelerin Lizisi:

Hücre zarı ve ortamdaki diğer kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla, lamalar +4°C'da ve karanlıkta, 1 saat süreyle taze hazırlanmış lizis solüsyonuna maruz bırakıldı.

Lizis stok solüsyonu hazırlamak için 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA, 1,2 g Tris-HCl tartıldı. 700 mL distile su eklenerek 10 M NaOH çözeltisi yardımıyla pH 10,0 olarak ayarlandı hacim dH₂O ile 890 mL'ye tamamlandı. Stok solüsyondan çalışma çözeltisi hazırlamak üzere 445 mL lizis stok solüsyonuna 5 mL Triton-X ve 50 mL DMSO eklendi (Son konsantrasyonlar: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, ve %1 Triton X, %10 DMSO; pH = 10). Dikkatli bir şekilde karıştırılıp oluşan köpüğün giderilmesi için en az yarım saat +4°C'de bekletildi.

DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez ve nötralizasyon:

Elektroforez öncesinde lizise uğrayan hücrelerin DNA sarmalının çözülmesi amacıyla, lamalar 20 dakika boyunca elektroforez tamponunda bekletildi.

Süre sonunda lamalar comet uygulamasına özel olan siyah elektroforez tankına (SCIE PLASComet-02) alındı. Tank elektroforez tamponu ile dolduruldu, 24 volt (~0,74 V/cm) ve 300 mA akım ayarı yapıldı. 20 dakikalık elektroforez sonrası lamalar tanktan alındı.

Elektroforez tamponu hazırlamak için ilk etapta 10 N NaOH ve 200 mM EDTA stok çözeltileri hazırlandı. 10 M NaOH hazırlamak için 40g NaOH tartılarak dH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. 200 mM EDTA için ise 14,89 g EDTA tartılarak dH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı. Daha sonra 10 M NaOH'dan 30 mL, 200 mM EDTA'dan 5 mL alınarak hacim soğuk dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı ve pH >13 olacak şekilde ayarlandı (Son konsantrasyonlar: 30 mM NaOH, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH >13).

Alkali ortamda gerçekleştirilen elektroforez sonrasında, hem boyaların uygulanabilmesi, hem de alkali ortamın örneklerle verebileceği zararı önlemek için lamalar soğuk nötralizasyon solüsyonunda (0,4 M Tris-HCl; pH=7,4) her 5 dakikada solüsyon tazelenerek 15 dakika süreyle nötralize edildi. Nötralizasyon solüsyonu ise 63,04 g Tris-HCl'nin tartılıp hacminin 1000 mL'ye tamamlanması ve pH'ının 7,4'e ayarlanması ile hazırlandı.

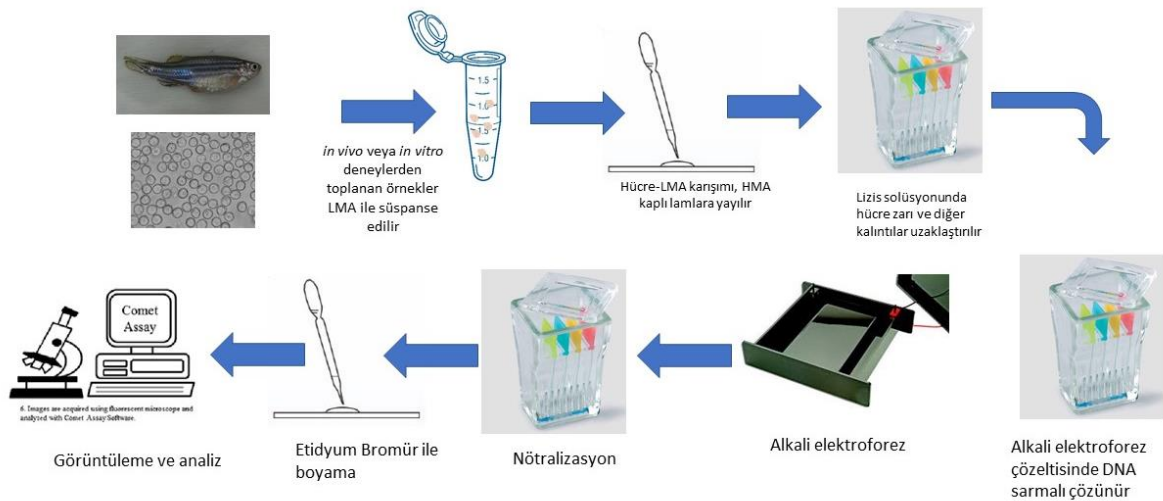
Görüntüleme ve Analiz:

Elektroforezi tamamlanan örneklerdeki DNA'lar normal ışıktaki görünür olmadığından, görüntüleme aşaması için DNA'ya bağlanabilen floresan boyalara ihtiyaç

duyulmaktadır. Bu çalışmada DNA kırıklarını görüntülemek amacıyla kırmızı bir floresan boya olan Etidyum Bromür tercih edildi. Bu amaçla 10 mg EtBr, 50 mL dH₂O'da çözündü ve 100X stok solüsyonu elde edildi. Görüntülemeden önce bu solüsyon 1:100 oranında seyreltildi ve boyama solüsyonu elde edildi (2 µg/mL).

Lamlara 75 µL Etidyum Bromür solüsyonu damlatılarak, DNA'ların floresan mikroskop altında görünürlüğü sağlandı. Ardından, Olympus BX51 floresan mikroskop altında incelenip her uygulama grubu için en az 100 hücre fotoğraflandı.

Comet analizinde hücrenin sağlam kalan nükleusu baş; elektroforez sırasında nükleustan uzaklaşan DNA kırıkları ise kuyruk görüntüsünü oluşturmaktadır. Baş ve kuyruk DNA miktarları ise comet analiz programları yardımıyla (CometScore, Tri Tek v. 2.0.0.38) analiz edildi ve % kuruk DNA miktarları hesaplandı (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. *In vivo* ve *in vitro* deneylerden elde edilen örneklerdeki DNA kırıklarını belirlemek üzere gerçekleştirilen comet analizinin uygulama basamakları.

2.9. Western Blot Analizi

Kısaca western blotlama, jel elektroforezi ile ayrılmış olan proteinlerin elektrik akımıyla bir membrana aktarılmasının ardından, spesifik antikor-antijen eşleşmesi ile istenilen proteinin tespitini sağlayan bir yöntemdir (Burnette, 1981). Yöntemin uygulama adımları aşağıdaki şekildedir.

In vivo uygulamalar için 24 saatlik deney süresinin sona ermesi ile balıklardan karaciğer ve solungaç dokuları dissekte edildi.

In vitro uygulamalar için ise 6 kuyulu plakalarda kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilen hepatositlere QD'lar ve CdCl_2 uygulanmasını takiben 24 saatlik deney süresinin sona ermesi ile besiyerleri uzaklaştırıldı. Ardından kuyular soğuk $2 \times \text{PBS}$ ile yıkandı ve hücreler hücre kazıyıcısı ile dikkatlice toplandı. Protein izolasyonu yapılmak üzere örnekler proteaz inhibitörleri ilave edilen RIPA (Santa Cruz) tamponuna alınarak hücreler tamamen parçalanana kadar homojenize edildi. Hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerin RIPA tamponu ile homojenize edilen örnekleri, buz üzerinde 30 dakika bekletildi ve ardından 4°C 'da $10.000 \times g$ devirde 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant toplandı. Örnekler temiz tüplere alındı ve protein konsantrasyonları nanospektrofotometre ile ölçüldü. Örnekler bir sonraki aşamaya kadar -20°C 'de saklandı.

Western blot analizi için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda belirtildi.

Yükleme tamponu:

Proteinlerin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi) elektroferezinden önce denatüre edilmesi amacıyla yükleme tamponu hazırlandı. Bunun için 6 mg bromofenol mavisi tartıldı ve üzerine 2,4 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 3 mL %10 SDS, 3 mL Gliserol ve 1,6 mL 2-Merkaptoetanol eklenerek hacim 30 mL'ye tamamlandı (Son konsantrasyonlar: 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, %1 SDS, %1 2-merkaptetanol, %10 gliserol, ve %0,025 bromofenol mavisi). Hazırlanan yükleme tamponu $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Tank Tamponu:

SDS-PAGE elektrofrezin gerçekleştirildiği tampondur. 10X konsantre tank tamponu hazırlamak için 30,3 g Tris, 144 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak hacim 1 litreye tamamlandı. Kullanılmadan önce 10 katı seyreltildi (Son konsantrasyonlar: 25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,1 SDS).

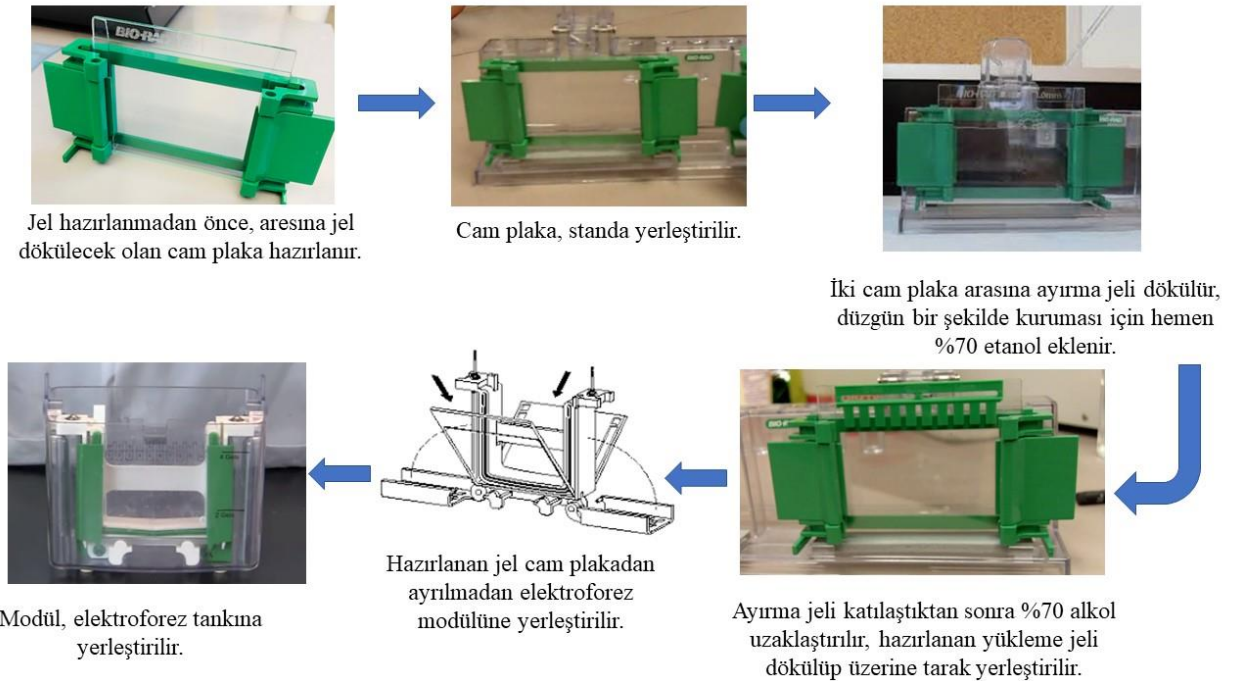
Transfer Tamponu:

Jeldeki proteinlerin membranlara transferi için blotlama aşamasında kullanıldı. Bu tamponunu hazırlamak için 100 mL 10X tank tamponu ve 200 mL metanol karıştırılarak

hacim 1 litreye tamamlandı. Kullanılmadan önce 10 kat seyreltildi (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %20 metanol).

SDS-PAGE jel hazırlanması:

Elektroforez yöntemi ile proteinleri boyutlarına göre ayırtmak için %12 konsantrasyonunda SDS-poliakrilamid jel tercih edildi. Bu amaçla 3,4 mL H₂O, 4 mL %30 Akrilamid-Bis, 5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µL %10 SDS 100 µL, %10 APS ve 10 µL TEMED karıştırıldı ve hemen elektroforezin gerçekleştirileceği plakaların arasına döküldü. Jelin üst kısmının düz bir şekilde kuruması için üzerine %70 alkol eklendi. Yaklaşık 20 dakika sonra jelin katılaşmasından sonra, jelin üzerine eklenen %70 alkol jelden uzaklaştırıldı ve yükleme jeli hazırlandı. Bu amaçla 2,7 mL H₂O, 0,8 mL %30 Akrilamid-Bis, 0,5 mL 1 M Tris (pH 6,8), 40 µL %10 SDS, 40 µL %10 APS ve 4 µL TEMED karıştırıldı, ayırma jelinin hemen üzerine döküldü ve vakit kaybetmeden proteinlerin yüklenecekleri kuyucukları oluşturmak amacıyla jel tırağı yerleştirildi. Yaklaşık 5 dakika sonra katılaştıran jelden tarak çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirilerek örnek yüklemeye hazır hale getirildi (Şekil 2.8).

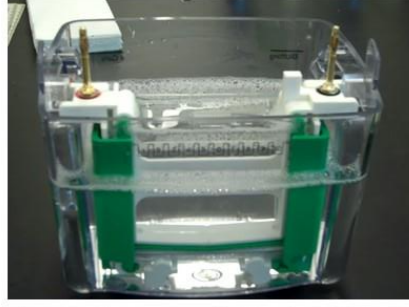


Şekil 2.8. SDS-poliakrilamid jel hazırlık aşamaları.

SDS-PAGE elektroforez aşamasından önce, kontrol ve deney gruplarından elde edilen protein örnekleri ile yükleme tamponu 1:1 oranında karıştırılarak su banyosunda 95°C sıcaklıkta 7 dakika denatüre edildi (Chapdelaine ve ark., 2001). Örnekler, SDS-PAGE elektroforezi gerçekleştirilene kadar -20 °C’de saklandı.

SDS-PAGE elektroforezi için, yukarıda anlatılan şekilde %12 konsantrasyonunda ayırma jeli ve standart yükleme jeli hazırlandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla ilk kuyuya bir protein markörü ve sonraki kuyulara da konsantrasyonları belirlenmiş olan protein örnekleri kuyu başına 50 µg protein olacak şekilde yüklendi. Ardından jeller elektroforez tankına yerleştirildi ve tank elektroforez tamponu ile doldurularak 110 V’da 90 dakika süre ile elektroforez gerçekleştirildi.

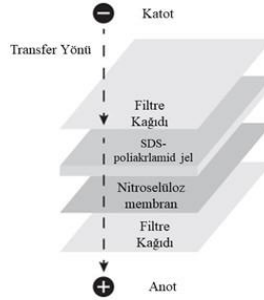
Jeldeki proteinlerin etkili bir şekilde nitroselüloz membrana transfer etmek amacıyla, TransBlot SemiDry cihazı ile blotlama yapıldı. İki adet blotlama kağıdı transfer tamponu ile ıslatıldı. Uygun ebatlarda kesilen nitrosülülöz membran ile SDS-PAGE elektroforezi gerçekleşen jel, ıslatılmış blotlama kağıtlarının arasına sıkıştırılarak cihaz kapatıldı ve 25 volt, 21 dakikada nitroselüloz membrana transfer gerçekleştirildi (Şekil 2.9).



Elektroforez tankına tank tamponu doldurulur. Jelde oluşturulan kuyulara protein markörü ve örnekler yüklenir.



Tankın üzeri kapatılarak güç kaynağına bağlanır. Volt ve süre ayarı yapılarak elektroforez başlatılır.

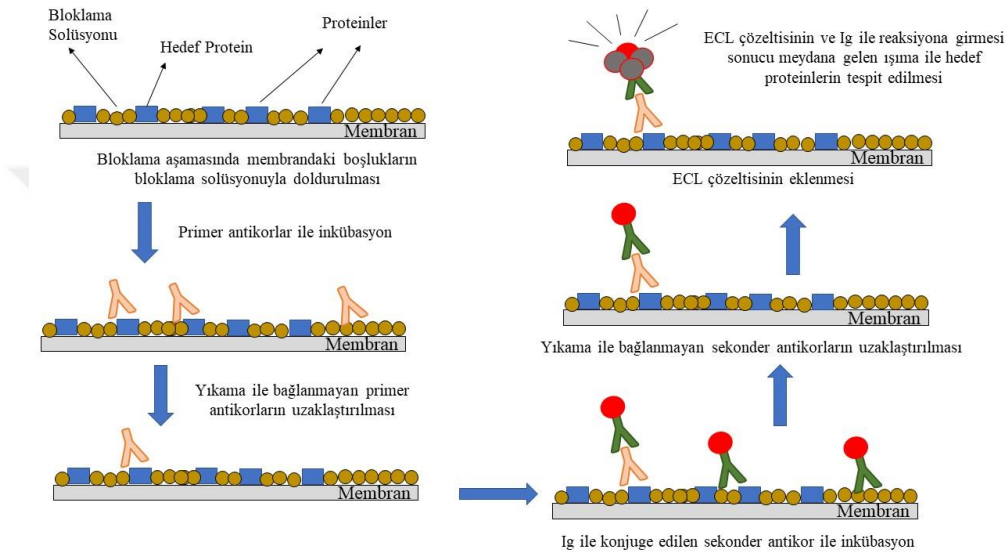


Elektroforezi tamamlanan proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için transfer yönüne göre belirtilen sırada nitroselüloz membran, jel ve filtre kağıtları yerleştirilir, TransBlot cihazında transfer yapılır.

Şekil 2.9. SDS-PAGE elektroforezi ve blotlama işleminin uygulama basamakları.

Proteinlerin membrana transferin tamamlanması ile, membran 90 dakika boyunca %5 yağsız süt tozu içeren PBS solüsyonu ile bloklanmak üzere oda sıcaklığında 90 rpm devirde çalkalandı. Bloklama sonrasında, yine %5 yağsız süt tozunda belirtilen oranlarda seyreltilen Anti-Hsp90 (1:500), Anti-Prdx1 (1:500), Anti-Rad51 (1:500), Anti- β -Aktin (1:1000) primer antikorları ile ayrı ayrı muamele edilen membranlar, +4°C'de gece boyunca 90 rpm devirde çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Ardından, membranlar 5'er

dakika boyunca 3 kez PBS ile yıkanarak, bağlanmamış primer antikorlar uzaklaştırıldı. Daha sonra membranlar, %5 yağsız süt tozu içerisinde 1:2000 oranında seyreltilen Anti-Rabbit-IgG (sekonder antikor) ile muamele edilerek 60 dakika boyunca oda sıcaklığında 90 rpm devirde çalkalanarak inkübe edildi. Bu aşamanın ardından membranlar bağlanmayan sekonder antikorları uzaklaştırmak üzere 3'er kez PBS ile yıkandı. Bloklama, primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyon ve görüntüleme aşaması Şekil 2.10'da şematize edilerek özetlendi.



Şekil 2.10. Nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirilen proteinler arasından hedef proteinlerin tespit edilebilmesi amacıyla gerçekleştirilen bloklama, primer ve sekonder antikorlar ile inkübasyon ve ECL çözeltisi kullanılarak görüntülenmesi.

Görüntüleme aşamasında membranlar, karanlık odada ECL çözeltisi ile muamele edildi ve filme basıldı. Banyo işlemi ardından filmler fotoğraflandı. Yükleme kontrolü olan β -aktin'e ve hedef proteinlere ait bantların yoğunluğu Image J (NIH) programı ile analiz edildi ve bant yoğunlukları β -aktin'e göre normalize edildi.

2.10. Histopatolojik Etkilerin Belirlenmesi

QD ve CdCl_2 uygulanan ve kontrol grubu balıklarından 24 saatlik deney süresinin sona ermesi ile karaciğer, solungaç ve deri örnekleri alındı ve histolojik inceleme için hazırlandı. Histopatolojik inceleme için takip edilen adımlar aşağıda verildi.

Yirmi dört saatlik deney süresinin sonunda, MS-222 ile anestezi edilen balıklar hemen disekte edildi ve karaciğer, solungaç ve deri dokuları %10 nötral formalinde 24 saat süreyle fikse edildi. Daha sonra bu örnekler sırası ile %70, %80, %90 ve %100 etil alkolde 30'ar dakika bekletilerek dehidratasyon aşaması tamamlandı.

Alkoldeki dokular parafine gömülmeden önce geçiş ortamına ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla dokular ilk önce 1:1 oranında alkol-ksilol karışımında 15 dakika, daha sonra saf ksilolde tekrar 15 dakika bekletildi. Ardından 60°C sıcaklığındaki etüvün içerisinde, aynı sıcaklıkta sıvı halde bulunan parafin ile ksilol 1:1 oranında karıştırılarak dokular 30 dakika bu karışımda bekletildi. Dokular erimiş parafin içerisine alınarak ilk önce 2 saat bekletildi, daha sonra parafin değiştirilerek gece boyu parafinin dokunun her tarafına girebilmesi için bekletildi. Daha sonra bu dokulardan etiketlenmiş parafin bloklar hazırlandı ve trimlenerek kesit almak için hazır hale getirildi. Bu bloklardan mikrotom cihazı ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve lamlara yayıldı. Daha sonra boyamaya hazırlık aşamasına geçildi. Önce dokulardaki parafinin uzaklaştırılması için lamlar 10 dakika etüvde bekletildikten sonra ksilol dolu şalelere yerleştirilerek 15 dakika daha bekletildi. Ardından lamlar %100, %90, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinde 5'er dakika bekletildi. En son suya indirilen kesitler boyama işlemi için önce hematoksilen (Merck) ile 10 dakika boyandı, akarsu altında fazla boyadan arındırıldı ve dH₂O ile yıkandı. Ardından 5 dakika Eosin (Merck) ile boyandı. Kalıcı preparat yapmak üzere, üzerinde boyanmış doku kesitlerinin bulunduğu lamlar 5'er dakika artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100) geçirildi. 10 dakika ksilolde bekletildi ve kanada balzamu (Entellan, Merck) ile kapatıldı. Son olarak dokular ışık mikroskopu (Leica DM1000 LED, Leica Microsystems, Germany) ile incelenerek fotoğraflandı.

2.11. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Graphpad V programı ile gerçekleştirildi. Tüm uygulama grupları ve kontrol grubu arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), ikili gruplar arasındaki farklılıklar ise Student T-test ile analiz edildi. <0,05 durumu istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

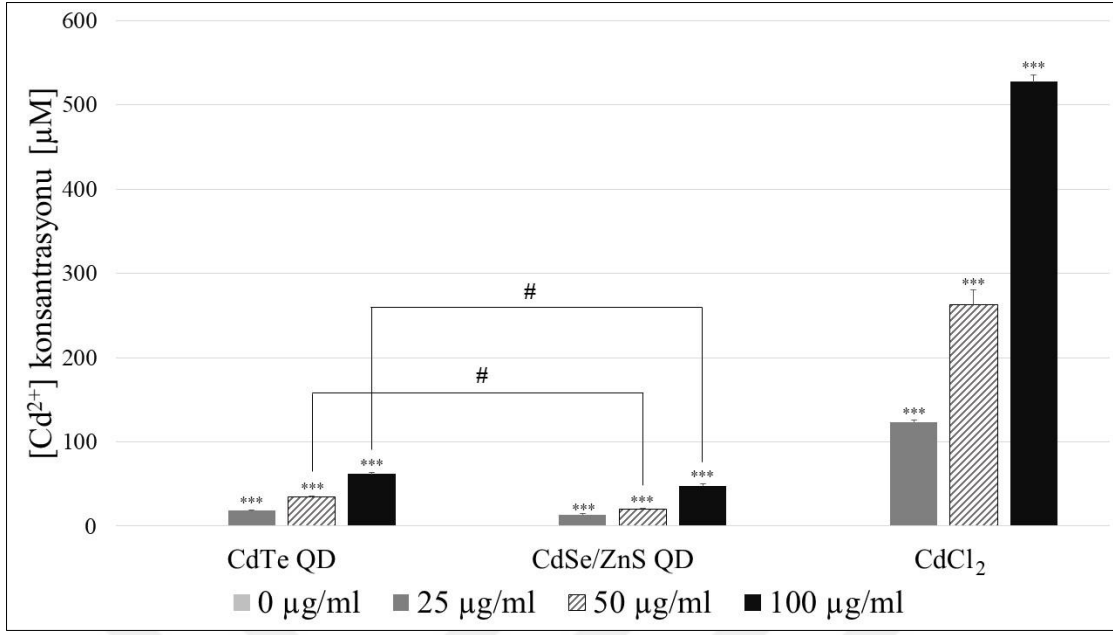


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Akvaryum Suyu, Besiyeri, Hücre İçi ve Dokularda Cd^{2+} Miktarı

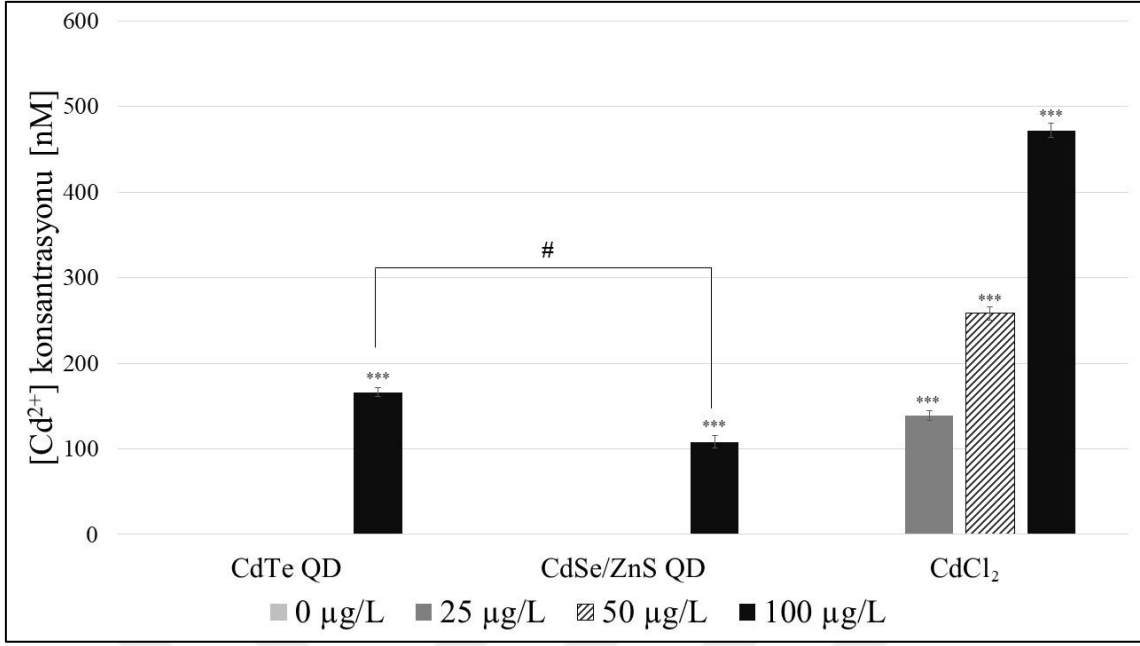
Deneyler başlamadan hemen önce, kadmiyum içeren QD'lar veya CdCl_2 içeren deneysel ortamlarda (akvaryum suyu, besiyerleri) bulunan ve ayrıca deney süresinin sona ermesi ile dokularda veya hücrelerde biriken $[\text{Cd}^{2+}]$ konsantrasyonları iyon ölçüm cihazı ve cihaza ait yazılım ile ölçüldü.

In vitro deneylerde, hem Cd-QD hem de CdCl_2 içeren besiyerlerinde, uygulanan her konsantrasyonda (25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) kadmiyum iyonu tespit edildi (Şekil 3.1). Sonuçlara göre, CdCl_2 ilave edilen besiyerinin, Cd-QD'ları içeren besiyerlerinden her konsantrasyonda çok daha fazla miktarda $[\text{Cd}^{2+}]$ içerdiği belirlendi. Ayrıca, çekirdek tip QD ve çekirdek/kabuk tip QD'ların besiyerine sızdırdığı $[\text{Cd}^{2+}]$ arasında da anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$). Yukarıda da anlatıldığı gibi, QD'a çevrilen kabuk yapısı, hem QD'un stabilitesini artırmak, hem nanomateryalin aşınması ile meydana gelebilecek floresan ışımaya kaybını önlemek, hem de toksik etkilerini azaltmaya yarar. Çalışmada her konsantrasyonda kabuklu QD'un kabuksuz formuna göre daha az miktarda $[\text{Cd}^{2+}]$ salınımına neden olduğu görüldü. Sonuçlar, ZnS kabuk yapısının çekirdekten kadmiyum salınımını azalttığı yönündedir.



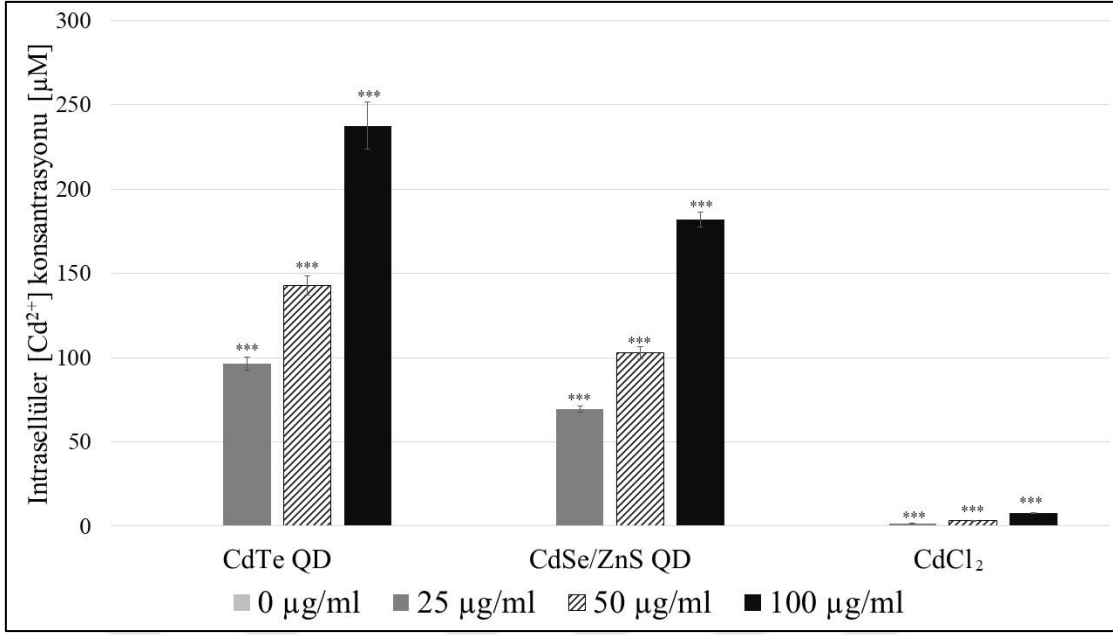
Şekil 3.1. Besiyerlerinde belirlenen $[Cd^{2+}]$ konsantrasyonları (μM). Deneylerden hemen önce tamamlanmış L-15 besiyerlerine 0, 25, 50 ve 100 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarını elde etmek üzere Cd-QD'lar veya $CdCl_2$ ilavesinin ardından besiyerlerinde bulunan $[Cd^{2+}]$ konsantrasyonları ölçüldü. Cd-QD'lar ve $CdCl_2$ içeren besiyerleri her konsantrasyonda kontrole göre anlamlı olarak $[Cd^{2+}]$ bulundurmaktadır (***: $p < 0,001$, One-Way ANOVA, $n=3$). ZnS kabuğun, besiyerine daha az $[Cd^{2+}]$ sızmasına neden olduğu belirlendi (#: $p < 0,05$, One-Way ANOVA, $n=3$).

In vivo deneyler için hazırlanan 0, 25, 50 ve 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında Cd-QD veya $CdCl_2$ içeren akvaryum sularında tespit edilen $[Cd^{2+}]$ Şekil 3.2'de belirtildi. Besiyerindeki Cd^{2+} konsantrasyonlarından farklı olarak, Cd-QD'ların çekirdeğinden salınan $[Cd^{2+}]$ varlığı yalnızca en yüksek konsantrasyonda (100 $\mu g/L$) tespit edilebildi. Besiyerinde yapılan ölçüm sonuçları ile uyumlu olarak ZnS kabuğun varlığı, 100 $\mu g/L$ Cd-QD içeren akvaryum sularında, çekirdekten $[Cd^{2+}]$ salınmasını engel olarak akvaryum sularında bulunan $[Cd^{2+}]$ miktarının, aynı konsantrasyonda çekirdek tip QD'a kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olması ile sonuçlanmıştır ($p < 0,001$). $CdCl_2$ 'den kaynaklanan $[Cd^{2+}]$ miktarı ise akvaryum suyunda bulunması hedeflenen miktarlara paralel olarak artış gösterdi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 0, 25, 50 ve 100 µg/L Cd-QD'lar ve CdCl₂ içeren akvaryum sularında bulunan [Cd²⁺] konsantrasyonları (nM). 25 ve 50 µg/L Cd-QD içeren akvaryum sularında [Cd²⁺] tespit edilmedi. CdCl₂ içeren akvaryum sularında ise her konsantrasyonda [Cd²⁺] tespit edildi (***: p< 0,001, One-Way ANOVA, n=3). ZnS kabuğun ise, akvaryum suyuna daha az [Cd²⁺] sızmasına neden olduğu belirlendi (#: p<0,05, One-Way ANOVA, n=3).

İn vitro deneylerde hepatositler, *in vivo* deneylerde ise balıklar 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Cd-QD'lara veya CdCl₂ tuzuna maruz kaldıktan sonra hücrelerde veya dokularda biriken [Cd²⁺] miktarları ölçüldü ve sonuçlar Şekil 3.3 ve 3.4'de gösterildi. Sonuçlar karşılaştırıldığında, hem Cd-QD'ların hem de CdCl₂'ün, kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde hücre veya doku içerisinde [Cd²⁺] birikimine sebep olduğu gözlemlendi. (p<0,001).

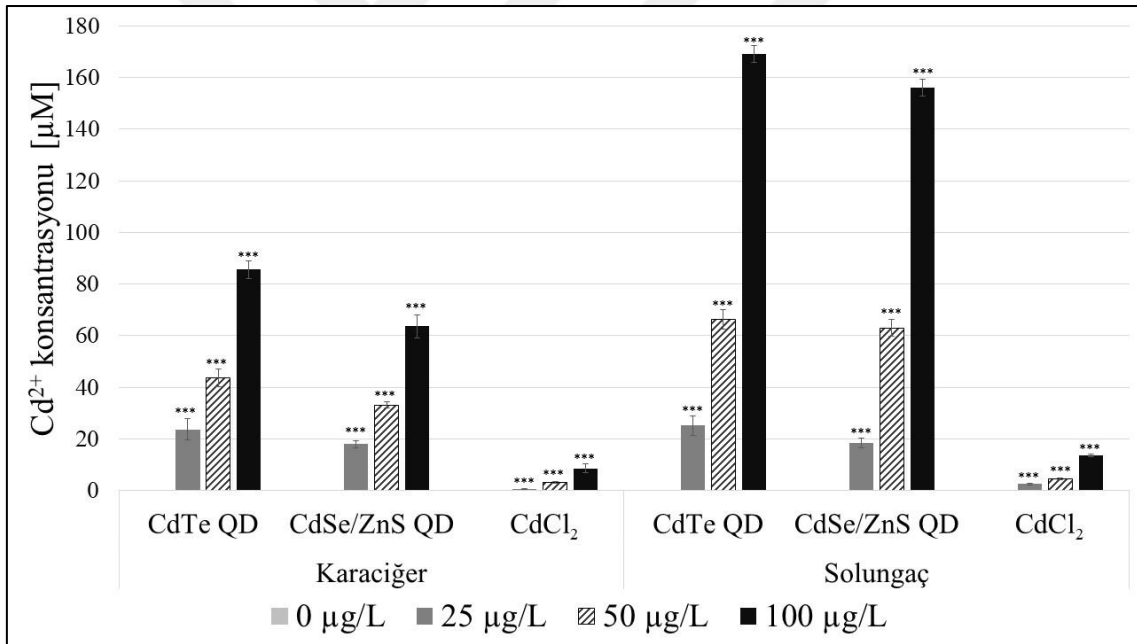


Şekil 3.3. 24 saat süre ile Cd-QD'lara ve CdCl₂'e maruz kalan hepatositlerde [Cd²⁺] birikimi (***: p< 0,001, One-Way ANOVA, n=3).

Balıkların 24 saat süreyle akvaryum suyu vasıtasıyla Cd-QD veya CdCl₂'e maruz kalması sonucunda, solungaç ve karaciğer dokularında bulunan [Cd²⁺] miktarları ayrı ayrı belirlendi ve her konsantrasyonda, solungaçlarda karaciğere göre daha fazla [Cd²⁺] birikiminin olduğu tespit edildi (Şekil 3.4). Solungaçların, akvaryum suyu ile direkt olarak temasta olması ve filtrasyon yapması sebebiyle yüksek miktarda birikimin tespit edilmesi beklenen bir durumdur. Kadmiyumun karaciğere, sindirim sistemi veya solungaçlar aracılığıyla vücuda alındıktan sonra, dolaşım sistemi aracılığı yani kan yolu ile ulaştığı düşünülmektedir. Bu nedenle iyonik kadmiyumun veya Cd-QD nanopartiküllerinin karaciğere ulaşana kadar birden çok yerde birikime uğrama ihtimali bulunmaktadır ve bu durum solungaçlara kıyasla karaciğerin daha düşük miktarlarda [Cd²⁺] birikimi göstermesinin sebebi olabilir. Ayrıca, akvaryum suyu içerisinde Cd-QD'lardan sızarak serbest hale geçen [Cd²⁺], sadece 100 µg/L konsantrasyonlarında tespit edilebilmiş olup, belirlenen [Cd²⁺] miktarları oldukça düşüktür (Şekil 3.2). Bu sebeple solungaçlarda tespit edilen [Cd²⁺]'un direkt olarak QD'ların hücreye alınarak parçalanması sonucu biriktiğini; karaciğerdeki [Cd²⁺]'un ise hem nanopartiküllerin taşınarak, hem de solungaçlar da dahil olmak üzere diğer dokuların içerisinde bu nanomateriyallerin aşınarak meydana getirdiği [Cd²⁺]'un karaciğere ulaşmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Kısacası, karaciğerde biriken [Cd²⁺] hem QD'ların

direkt olarak hücre içerisinde aşınması ile, hem de başka dokularda aşınarak iyonik hale geçen $[Cd^{2+}]$ 'un taşınmasından kaynaklanmış olabilektedir.

Hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde, Cd-QD'ların $CdCl_2$ 'e göre çok daha fazla miktarda $[Cd^{2+}]$ birikimine sebep olduğu görüldü. Ayrıca, *in vitro* deneylerde çekirdek tip QD'ların sebep olduğu $[Cd^{2+}]$ miktarları da çekirdek/kabuk tip QD'lara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu belirlendi. *In vivo* çalışmaların en yüksek konsantrasyonlarında da (100 $\mu g/L$), ZnS kabukla enkapsüle edilen QD'lar, çekirdek halde bulunan QD'lara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde dokularda daha az $[Cd^{2+}]$ birikimine yol açtığı görüldü ($p < 0,05$). Bu durum ise ZnS kabuğun çekirdek aşınmasını bir miktar geciktirdiği veya azalttığını göstermektedir. Fakat *in vivo* uygulamalarda düşük ve orta konsantrasyonda Cd-içeren QD'lar arasında bu fark anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



Şekil 3.4: 24 saat süre ile Cd-QD'lara ve $CdCl_2$ 'e maruz kalan balıkların karaciğer ve solungaç dokularında $[Cd^{2+}]$ birikimi (***: $p < 0,001$, One-Way ANOVA, $n=3$).

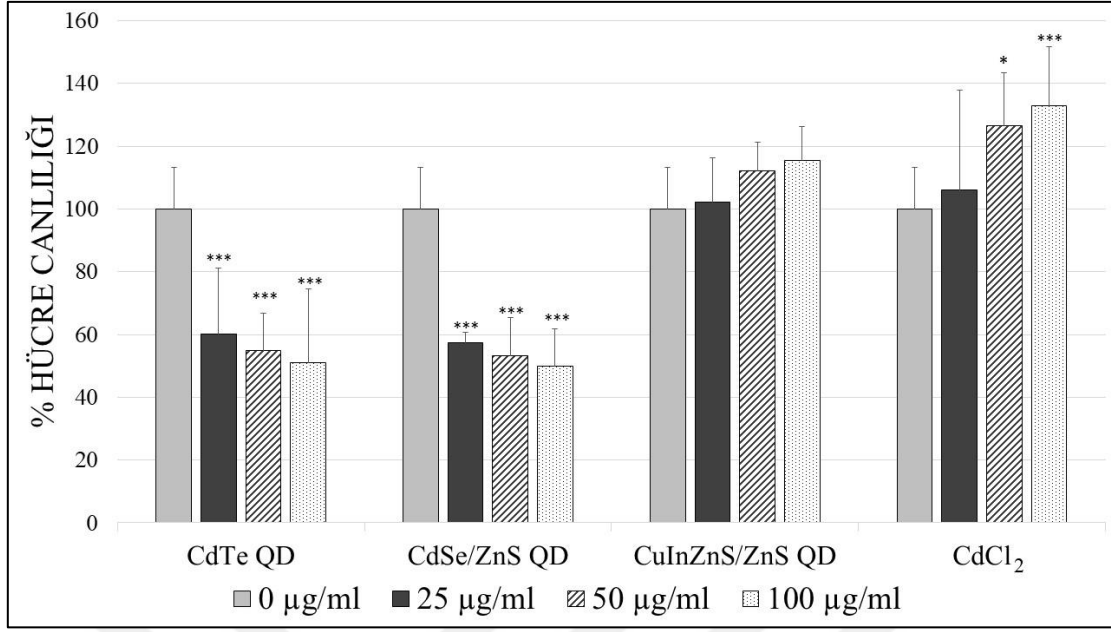
Kalsiyum ve kadmiyum iyonlarının hem yük, hem de atom çapı gibi kimyasal benzerlikleri sebebiyle, kadmiyum iyonu hücreye voltaj veya reseptör kapılı kalsiyum kanallarından ve ayrıca kolaylaştırılmış difüzyon ya da aktif taşıma ile girmektedir (Choong ve ark., 2014). Cd-QD'ların hücreye alınış yolunun ise iyonik kadmiyumdan farklı olarak endositoz olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2015). Yapılan çalışmada da

CdCl₂ tuzlarından kaynaklı besiyeri veya akvaryum suyunda iyonik halde bulunan kadmiyumun hücrelere belirtilen yollarla, Cd-QD'ların ise endositoz ile girmesi beklenmektedir. Yapılan bu çalışmada hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerde, her konsantrasyondaki [Cd²⁺] birikimi, CdCl₂'e kıyasla Cd-QD'ların uygulandığı gruplarda oldukça fazla miktarlardadır. Cd-QD'lar ile CdCl₂'ün neden olduğu [Cd²⁺] birikimleri arasındaki bu büyük farkın sebebinin, hem hücreye alınış şekillerindeki farklılıklardan, hem de Sabella ve arkadaşları tarafından önerilen “Truva Atı Mekanizması”ndan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu mekanizma kısaca, bir metal nanopartikülün endositoz ile hücreye alındığında, endozomların doğal asidik yapısı nedeniyle nanomateryalin aşınması ve içerdiği metal iyonlarının hücresel ortama salmasından ibarettir (Lovrić ve ark., 2005). Tez çalışmasının sonuçları, Truva atı mekanizması ile uyumlu olup, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda gözlemlediğimiz Cd-QD'lar ile CdCl₂ arasında görülen [Cd²⁺] birikimi farkını açıklamaktadır.

3.2. Hücre Canlılığı

Primer kültür yöntemiyle elde edilen hepatositlerin 24 saat süreyle QD'lara veya CdCl₂'a maruz kalmasının ardından hücre canlılığında meydana gelen değişimler WST-1 hücre canlılığı testi ile belirlenerek Şekil 3.5'de gösterildi.

Kontrol ile karşılaştırıldığında, hem çekirdek hem de çekirdek/kabuk tip QD'ların hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (p<0,001). Primer hücre kültüründen ziyade, meme kanseri (MCF-7), fare hepatositleri (AML12), insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), akciğer kanser hücreleri (HeLa) ve insan hepatokarsinoma (HepG2) gibi hücre hatları ile yapılan önceki çalışmalarda da kadmiyum içeren QD'ların hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Lovrić ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2015; Lai ve ark., 2015; Katubi ve ark., 2019). Her ne kadar ZnS kabuk yapısı hücre içi [Cd²⁺] miktarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmış olsa da, bu azalış hepatositleri Cd-QD'ların sitotoksik etkisinden korumakta yeterli olamamıştır. Bu durum toksisitenin tek başına hücre içi [Cd²⁺] birikiminden kaynaklanmadığını düşündürmekte olup, çalışmada kullanılan çekirdek ve çekirdek/kabuk tip QD'ların ζ -potansiyelleri, kimyasal kompozisyonu veya nanomateryal boyutlarının da bu duruma katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3.5. 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan zebra balığı hepatositlerinde meydana gelen hücre canlılığı değişimleri (n= 10; *p <0,05; ***p<0,001; One Way-ANOVA).

Kadmiyum içeren QD'ların (Çekirdek tip ve Çekirdek/kabuk tip QD'lar) aksine, Cd içermeyen QD'ların hücre ölümüne sebep olmayıp, aksine hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artışa sebep olduğu görüldü (p>0,05). Çalışmada kullandığımız Cd içermeyen QD'larda nanomateriyelin temel bileşeni olarak oldukça toksik olduğu bilinen Cd yerine Cu kullanılmaktadır. Bu QD'lar da diğer metal içerikli nanopartiküllerde olduğu gibi hücresel ortama girdiğinde aşınarak hücresel ortama [Cu²⁺] salınmasına neden olacaktır. Farklı hücre hatları ile yapılan önceki çalışmaların da gösterdiği gibi, bakır kaynağı olarak düşük konsantrasyonlarda CuCl₂ veya CuSO₄ uygulaması, hücre proliferasyonunu artırmaktadır (Xu ve ark., 2013; Ruiz ve ark., 2016). Bu nedenle zebra balığı hepatositlerinin canlılığında gözlemlenen bu hafif artış, Cd-içermeyen QD'ların çekirdeğinden sızması muhtemel olan Cu²⁺ iyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kadmiyum içermeyen QD'lara benzer şekilde, CdCl₂ uygulanan hücrelerde de hücre canlılığının arttığı görülmektedir. Bu artış her ne kadar 25 µg/ml konsantrasyonundaki CdCl₂ için istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05 ve p<0,001). Sonuçlar

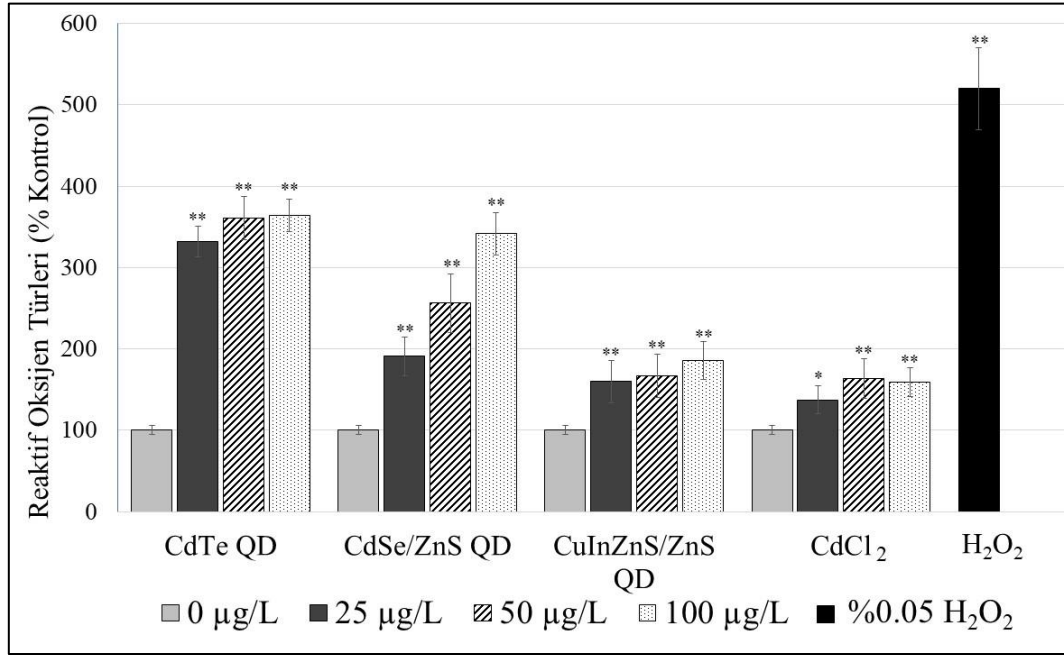
ile uyumlu olarak yapılan diğer çalışmalar, hücrelere düşük konsantrasyonlarda kadmiyum uygulamasının DNA sentezi ve hücre büyümesini uyardığı (Von Zglinicki ve ark., 1992; Misra ve ark., 2002; Siewit ve ark., 2010); ayrıca zebra balığı karaciğer hücre hattında (ZFL) ise apoptozu bloklayarak hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında kadmiyum içeren iki ayrı tip QD (çekirdek tip ve çekirdek/kabuk tip), kadmiyum içermeyen QD'lar ve CdCl₂'ün, primer kültüre alınan zebra balığı hepatositlerinin canlılığına olan etkileri ilk kez bir arada değerlendirilmiştir. Her ne kadar bir materyalin toksik etkilerini belirlemek için hücre canlılığı testleri önemli bir parametre olsa da, tek başına yeterli değildir.

3.3. Reaktif Oksijen Türleri Birikimi

Hem QD'lar hem de CdCl₂'e maruz kalma sonucu hücrelerde ve dokularda biriken reaktif oksijen türleri (ROT), DCF'nin floresan ölçümü ile hesaplandı. *İn vivo* deneylerde hem solungaç ve karaciğer dokularının, *in vitro* deneylerde primer kültüre alınan hepatositlerin farklı QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalması sonucunda ROT miktarları kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0,05$) (Şekil 3.6, 3.7 ve 3.8).

İn vivo uygulamalarda uygulanan her konsantrasyonda, karaciğer dokularında Cd-QD'ların, Cd-içermeyen QD'lara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ROT birikimine sebep olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 3.6). Ayrıca, çekirdek Cd-QD'lar, her konsantrasyonda, çekirdek/kabuk Cd-QD'lara göre anlamlı bir şekilde daha fazla ROT birikimine sebep oldu ($p < 0,05$). Bu bulgular karaciğer dokusunda biriken [Cd²⁺] konsantrasyonu ile uyumlu bulundu. Bununla beraber, tüm Cd-QD'lar CdCl₂'a göre yine istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla ROT birikimine sebep oldu ($p < 0,01$). Özetle, kadmiyum içerikli bu üç grubun birbirleriyle karşılaştırıldığı durumda dokularda biriken [Cd²⁺] miktarı verisi ile uyumlu olarak ROT artışı sıralaması çekirdek QD'lar > çekirdek/kabuk QD'lar > CdCl₂ şeklinde görüldü. Bu sebeplerle, karaciğer dokusunda Cd-QD'lardan kaynaklanan ROT artışının sebebinin dokulardaki [Cd²⁺] birikiminden meydana geldiği düşünülmektedir. Cd-içermeyen QD'ların da Cd-QD'lara ve CdCl₂'e benzer bir şekilde kontrole göre anlamlı bir ROT artışına sebep olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$). Meydana gelen ROT birikimi her konsantrasyonda, her iki Cd-QD'a göre daha düşük, fakat CdCl₂'e göre yüksektir. Sonuç olarak, bu materyallerin hücrelerde kontrole

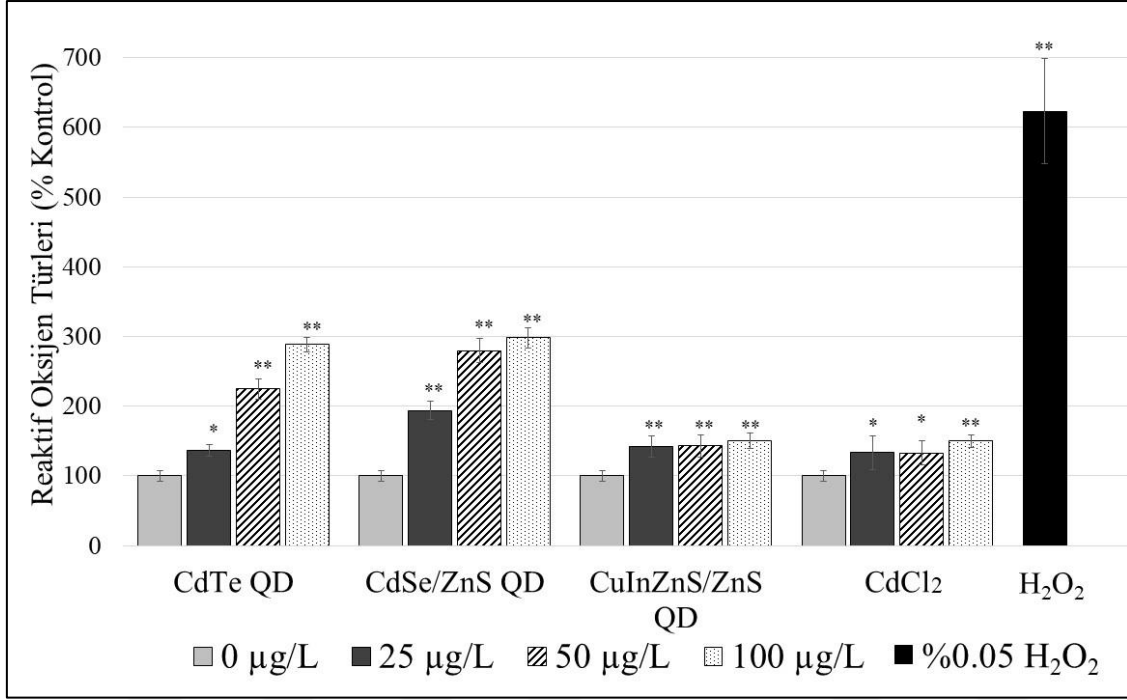
kıyasla reaktif oksijen türlerinde artış meydana getirme sıraları Cd- çekirdek tip QD'lar > Cd- çekirdek/kabuk QD'lar > Cd-içermeyen QD'lar > CdCl₂ şeklinde belirlendi.



Şekil 3.6. Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 µg/L konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan zebra balıklarının karaciğer dokularındaki % ROT birikimi (n=10, *p<0,05; **p<0,01; One-Way ANOVA).

Karaciğerde gözlemlendiği gibi, solungaçlarda meydana gelen ROT birikimi de hem QD hem de CdCl₂'e maruz kalan balıklarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdi (p<0,05) (Şekil 3.7). Solungaç dokusunda hücrelerde biriken [Cd²⁺] miktarı karaciğer dokusunda biriken miktara kıyasla çok daha fazla olmasına rağmen, bu dokuda biriken ROT miktarı karaciğere kıyasla daha düşük olarak belirlendi (Şekil 3.6 ve 3.7). Ayrıca karaciğer dokusundan farklı olarak solungaç dokusunda çekirdek/kabuk Cd-QD'ların, çekirdek Cd-QD'lara göre daha fazla ROT birikimine sebep olduğu görüldü. Bunun sebebinin ise her ne kadar aynı bireye ait olsa da, farklı nanomateryallerin farklı kimyasal kompozisyon, nanomateryal çapı ve zeta potansiyellerine sahip olmanın her dokuda farklı toksik cevaplar verebileceğini düşündürmektedir. Örneğin bu çalışmada daha küçük çapa sahip, zeta potansiyeli daha büyük bir QD nanomateryali solungaç dokusunda karaciğere kıyasla daha fazla ROT üretimine sebep olurken, daha büyük çapa sahip, zeta potansiyeli daha düşük ve kadmiyuma ilaveten Zn ve S iyonları salması muhtemel olan diğer bir QD molekülü ise

karaciğere kıyasla daha fazla ROT birikimine sebep oldu. Ayrıca Cd-QD'lara maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında meydana gelen ROT birikimi, 25 µg/L konsantrasyonunda çekirdek QD uygulanan grup dışındaki tüm gruplarda Cd-içermeyen QD'lara kıyasla oldukça yüksektir.



Şekil 3.7. Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 µg/L konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan zebra balıklarının solungaç dokularındaki %ROT birikimi (n=10, *p<0,05; **p<0,01; One-Way ANOVA).

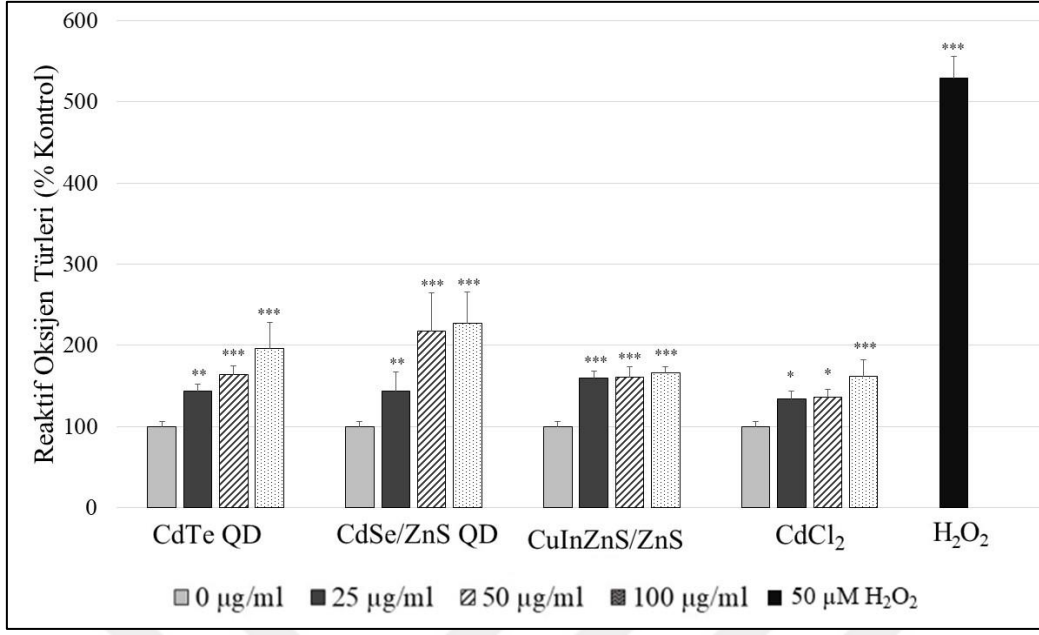
Dokularda [Cd²⁺] birikimi ile ilgili bulgularımızda daha önce de belirttiğimiz gibi, karaciğerde [Cd²⁺] direkt olarak QD'ların hücre içine alınması sonucunda birikebildiği gibi diğer dokularda bulunan ve parçalanan/aşınan QD'lardan karaciğere kadmiyum iyonlarının ulaştığı düşünülmektedir. Bu sebeple meydana gelen ROT birikimi hem nanomateryale maruz kalmasından hem de iyon halindeki kadmiyuma maruz kalmasından kaynaklanıyor olabilir. Akvaryum suyuna 25 ve 50 µg/L konsantrasyonlarındaki uygulama gruplarından [Cd²⁺] sızması olmamasından anlaşılacağı gibi, bu uygulama gruplarında solungaç dokusu kadmiyuma sadece nanomateryal formunda maruz kalmıştır ve karaciğerdeki durumun aksine meydana gelen ROT birikimi sadece nanomateryal maruziyeti ile meydana gelmiş olabilir. Solungaç dokularında hücre içerisine [Cd²⁺] salınımı QD'ların hücreye alınmasından sonra

başlamıştır ve bu durumun ROT oluşturma kapasitesini etkileme ihtimali de dikkate alınmalıdır. İyonik kadmiyumun ise akvaryum suyuna sadece 100 µg/L konsantrasyonlarında salındığı tespit edildi (100 µg/L çekirdek QD için 166,333 nM ve çekirdek/kabuk QD için 108,333 nM). Bu konsantrasyonlarda solungaç dokusunun hem iyonik kadmiyuma hem de QD'a maruz kalması söz konusudur. Bu nedenle suda bulunan $[Cd^{2+}]$ miktarı açısından benzerlik gösteren 25 µg/L konsantrasyonunda $CdCl_2$ 'e (139,333 nM) maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında biriken ROT miktarı ile bu gruplar karşılaştırılınca, solungaç dokusunda ROT birikimine sebep olan esas etmenin akvaryum suyuna sızan ve hücrelere iyon kanallarından giren $[Cd^{2+}]$ 'un değil, endositoz aracılığıyla girmesi muhtemel QD nanomateriyallerinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir (ROT birikimi 100 µg/L çekirdek QD için: %288,60; 25 µg/L $CdCl_2$ için: %150,24; $p<0,001$).

In vitro deneylerde ise Cd-QD'lara maruz kalan zebra balığı hepatositlerinde, *in vivo* deneylerde gözlemlendiği gibi ROT birikiminde kontrole kıyasla anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$) (Şekil 3.8). Hücre canlılığı verileriyle uyumlu bir şekilde Cd içeren çekirdek/kabuk tip QD'ların, sadece çekirdek tip QD'lara kıyasla 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında daha fazla ROT birikimine sebep olduğu gözlemlendi. 25 µg/mL konsantrasyonlarında ise ROT birikimleri birbirlerine çok yakın miktarlarda olup bu durum hücre canlılığı açısından da benzerlik göstermektedir (ROT birikimi çekirdek QD: %143,62, çekirdek/kabuk QD: %143,55; Hücre canlılığı çekirdek QD: %60,26, çekirdek/kabuk QD: %57,42; $p>0,05$). Bu sebeplerle Cd-QD'lardan kaynaklı sitotoksitenin sebebinin ROT birikimi olabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca, Cd-içermeyen QD'lara maruz kalmak, zebra balığı hepatositlerinin hücre canlılığını etkilememektedir. Fakat bu materyallerin kontrole kıyasla hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ROT birikimine sebep olduğu gözlemlendi. Bu materyal, içerisinde Cd bulundurmamakta, fakat yüksek miktarda Cu bulundurmaktadır. Benzer bir çalışma Feng ve arkadaşları tarafından primer kültür yöntemi ile elde ettikleri gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hepatositleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmadaki sonuçlarımızla uyumlu olarak, her ne kadar hepatositlere uyguladıkları $CuSO_4$ hücre canlılığında bir değişikliğe sebep olmasa da, oksidatif stres belirteçlerinde artış görüldüğü bildirilmiştir (Feng ve ark., 2003). Ayrıca, hem Cd-çekirdek kabuk QD hem de Cd'suz QD'ların ikisinde de bulunan ZnS kabuk yapısı, bu iki materyale maruz kalan hücrelerde

diğer gruplarda bulunması beklenmeyen ayrı bir serbest radikalle karşı karşıya getirmektedir. ZnS kabuğun oksidasyona uğrayarak çok tehlikeli bir serbest radikal olan SO_2^- oluşturduğu bildirilmiştir (Mottley ve ark., 1985; Green ve Howman, 2005).

Benzer bir şekilde, $CdCl_2$ uygulanan hepatositlerde de hücre içi ROT birikimi miktarlarının kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artışına sebep olduğu görüldü ($p<0,05$). Kadmiyumun indüklediği karsinojenite ve toksisitede oksidatif stres önemli role sahiptir (Rahimzadeh, ve ark., 2017; Liu ve ark., 2009). Kadmiyum, redoks potansiyeline sahip bir metal olmamasına rağmen, hücre içi ROT seviyelerini yükseltmekte ve lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vermektedir (Cuypers ve ark., 2010; Matović ve ark., 2015). Çalışmada zebra balığı hepatositlerine uygulanan $CdCl_2$ konsantrasyonu sublethal seviyede veya proliferasyonu artıracak düzeyde olup, hücre ölümüne sebep olmamaktadır. Buna rağmen ROT üretimi görülmesi, şaşırtıcı bir durum olmayıp, Luevano ve Damodaran'ın derlemesinde şu şekilde özetlenmiştir: Kadmiyuma maruz kalan hücreler mitokondriyal disfonksiyona, solunumun inhibisyonuna, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile karşı karşıya kalırlar. Kadmiyum ile indüklenen oksidatif hasarın sonucunda ortaya çıkan oksidatif DNA hasarı ve hücrel redoks homeostasisinin bozulması, genetik ve epigenetik değişikliklere, kontrolsüz hücre çoğalmasına, anormal sinyal iletimi gibi metal-aracılı karsinogenezin karakteristikleri olarak bilinen olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (Luevano ve Damodaran, 2014). Literatürle uyumlu olarak bu tez çalışmasında da primer kültür yöntemi ile elde edilen zebra balığı hepatositlerine $CdCl_2$ uygulanması, hem hücre proliferasyonunu hem de hücre içi ROT birikimini artırmaktadır.



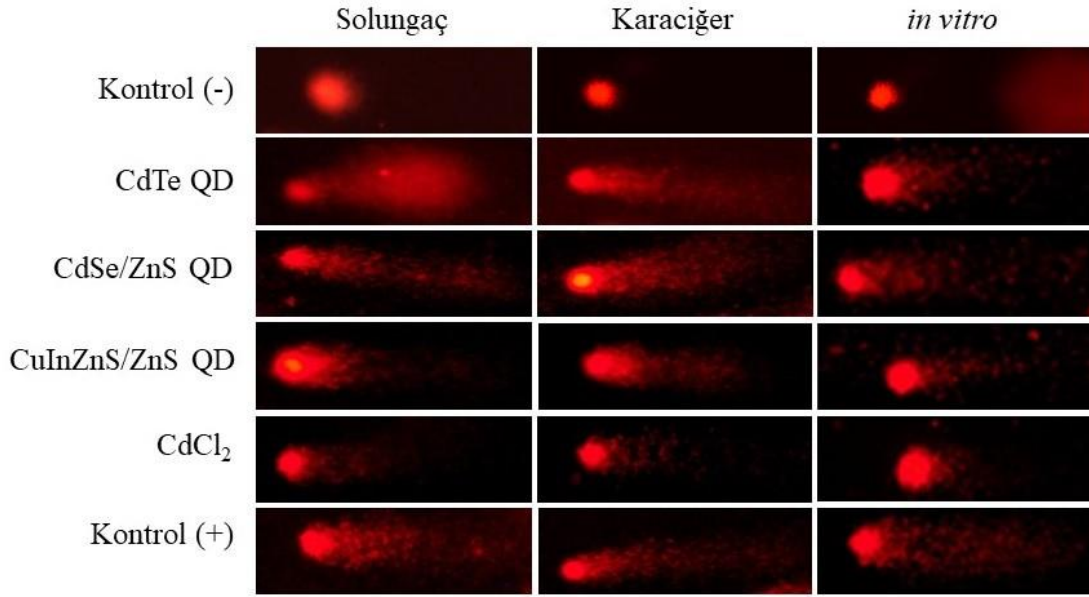
Şekil 3.8. Primer kültüre alınan zebra balığı hepatositlerinin 24 saat süre ile 25, 50 ve 100 µg/L konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalması sonucu hücrelerde belirlenen %ROT birikimi (n=10, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; One-Way ANOVA).

3.4. Genotoksik Etkiler

Quantum Dot'ların veya CdCl₂'ün zebra balıklarının *in vivo* karaciğer ve solungaç dokusunda, ayrıca primer kültüre alınan zebra balığı hepatositleri üzerinde meydana getirdikleri genotoksisiteyi araştırmak için alkali comet analizi yöntemi uygulandı. Alkali comet analizi ile tespit edilen DNA hasarı, ağır metallerin etkileşimi veya oluşturduğu metabolitler sonucu oluşan DNA tek iplik kırıkları, DNA çift iplik kırıkları, DNA ek oluşumları, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlantılarından kaynaklandığı bildirilmektedir (Mitchelmore ve Chipman, 1998; Fairbairn ve ark., 1995; Ahmed ve ark., 2010). Bu yöntem ile her bir grup için, fotoğrafları alınan hücrelerden % kuyruk DNA miktarları hesaplandı ve gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak analiz edildi. Her grubun en yüksek konsantrasyonuna, pozitif ve negatif kontrollere ait komet görüntülerinden temsili birer hücre ise Şekil 3.9'da gösterildi.

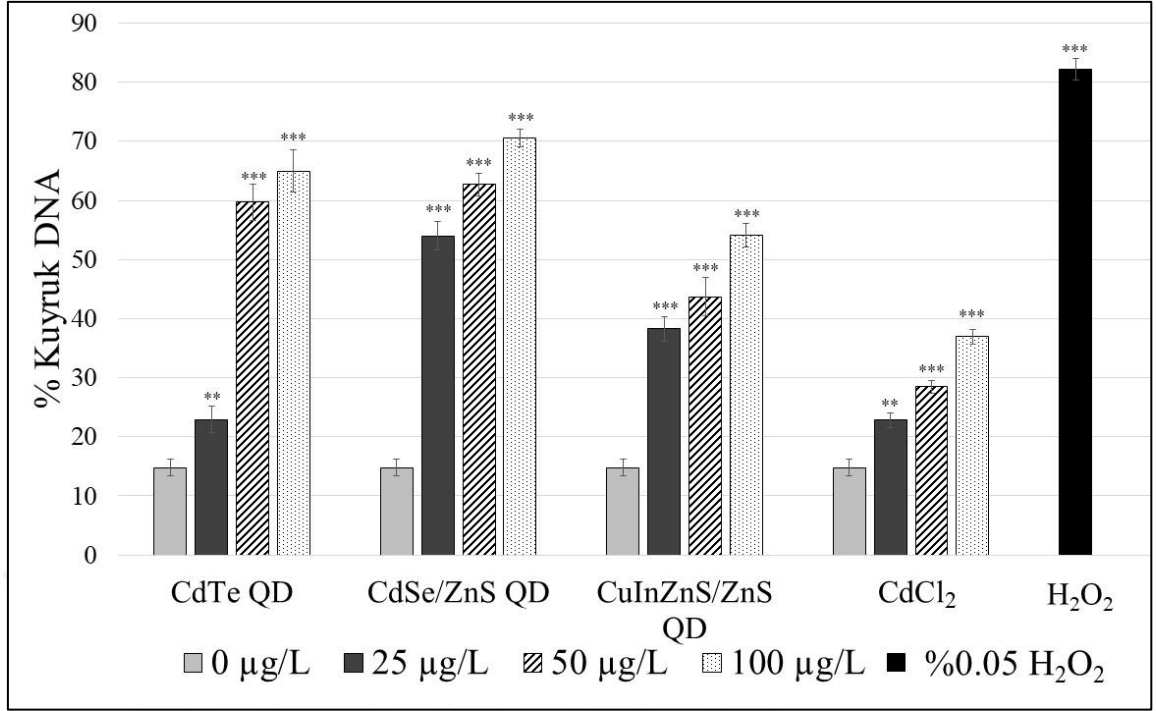
Balıkların direkt olarak akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lar veya CdCl₂'e maruz kaldığı *in vivo* uygulamalardan alınan örnekler ile gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarına göre; hem karaciğer hem de solungaç dokularında hesaplanan % kuyruk DNA miktarları

kontrole kıyasla oldukça yüksek olup sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$) (Şekil 3.10 ve 3.11).



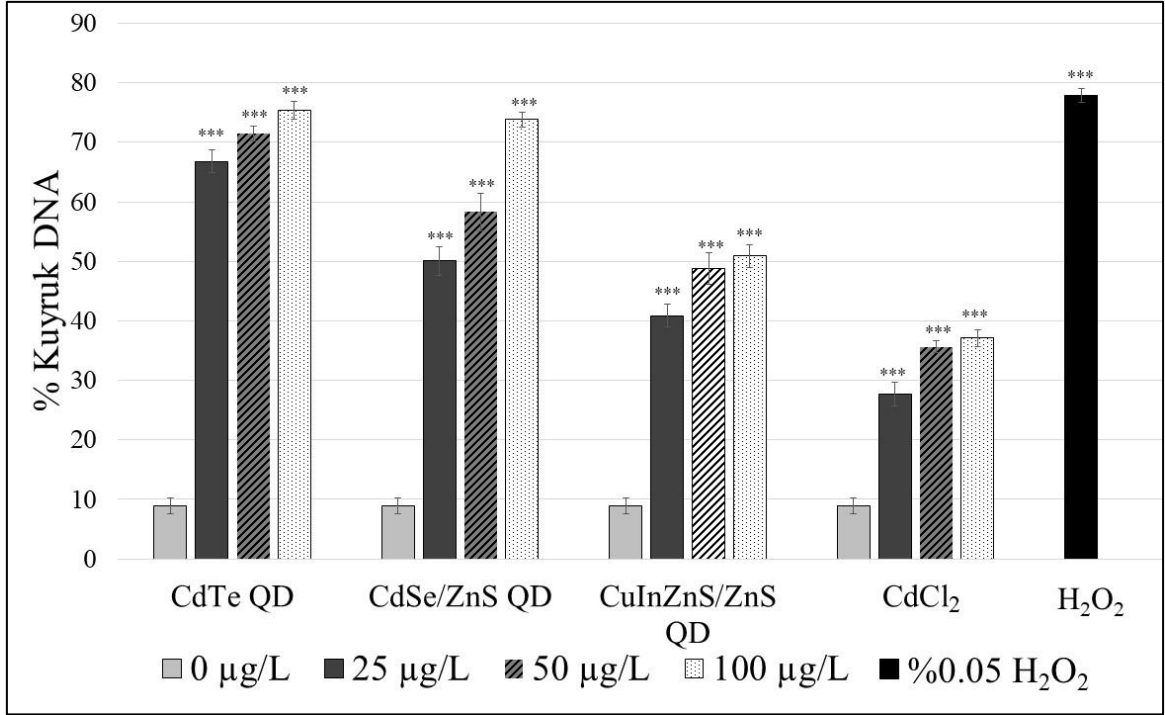
Şekil 3.9. Akvaryum suyu (100 µg/L) ve besiyeri (100 µg/mL) aracılığıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç ve karaciğer dokularından elde edilen hücreler ve *in vitro* primer hepatositlere ait komet görüntüleri.

In vivo uygulamalarda QD veya CdCl₂'e maruz kalan balıkların solungaç dokularında % kuyruk DNA miktarlarının kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği belirlendi ($p<0,01$). Solungaç dokusunda 25 µg/L konsantrasyonu hariç olmak üzere, DNA kırık miktarları; çekirdek/kabuk QD'lar> çekirdek QD'lar> kadmiyum içermeyen QD'lar> CdCl₂ şeklinde belirlendi. Bu sıralama solungaçlarda görülen ROT birikim miktarları sıralamasıyla aynı olup, genotoksisitenin ROT aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ayrıca, çekirdek/kabuk tip QD'ların zebra balığı solungaçlarına çekirdek tip QD'a kıyasla daha fazla hasar verdiğini bir kez daha göstermektedir.



Şekil 3.10. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında gözlemlenen %kuyruk DNA miktarları. 0, 25, 50 veya 100 µg/mL konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan hepatositler 24 saat sonra toplanarak alkali comet analizi gerçekleştirildi ve en az 100 hücre analiz edildi (**p<0,01; ***p<0,001; One-Way ANOVA).

Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan zebra balıklarının hücrelerinde, solungaç hücrelerinde olduğu gibi %kuyruk DNA miktarlarında kontrole göre anlamlı bir artış görüldü (p<0,001) (Şekil 3.10). Bu materyallerin karaciğer dokusunda genotoksisiteyi indüklemeye sırası ise yine ROT birikimi verisi ile benzer bir şekilde çekirdek QD> çekirdek/kabuk QD> kadmiyum içermeyen QD> CdCl₂ şeklindedir. Bu nedenle solungaç dokusunda da olduğu gibi genotoksisitenin ROT artışı ile indüklendiği düşünülmektedir. Yukarıdaki sıralamada da belirtildiği gibi, karaciğer dokusunda yalnızca çekirdek tip olan QD'lar, çekirdek/kabuk tip QD'lara kıyasla daha yüksek oranda DNA hasarına sebep oldu. Bu durum karaciğer dokusunda çekirdek tip QD'ların kabuk ile çevrili olanlarına göre hem sitotoksisteyi hem de genotoksisiteyi daha güçlü bir şekilde indüklediğini göstermektedir.



Şekil 3.11. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında gözlemlenen % kuyruk DNA miktarları. 0, 25, 50 veya 100 µg/mL konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan hepatositler 24 saat sonra toplanarak alkali comet analizi gerçekleştirildi ve en az 100 hücre analiz edildi (**p<0,01; ***p<0,001; One-Way ANOVA).

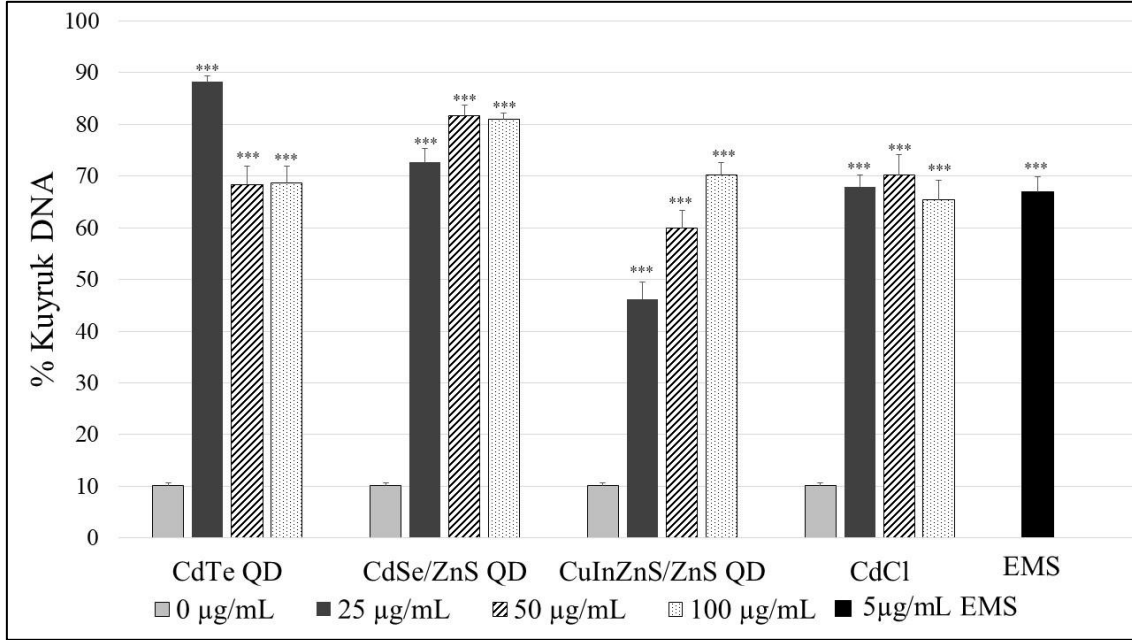
Literatürde, kadmiyum içermeyen QD'ların genotoksik etkisi ile ilgili hiçbir *in vivo* çalışma bulunmamakla beraber, kadmiyum içeren QD'ların yol açtığı DNA hasarını inceleyen çalışmaların çok büyük bir kısmı hücre hatlarıyla gerçekleştirildiği için *in vivo* genotoksisite çalışmaları da oldukça kısıtlıdır. Literatürde bulunan bu birkaç *in vivo* çalışmada QD'ların genotoksik etkileri comet, TUNEL, mikronukleus, DNA jel elektroforezi veya baz hasarı gibi farklı parametrelerde incelenmiş ve sonuç olarak bu materyallerin genotoksisiteyi indüklediği sonucuna varılmıştır (Galeone ve ark., 2012; Rocha ve ark., 2014; Ambrosone ve ark., 2012; Khalil ve ark., 2011; Tiwari ve ark., 2011). Bu çalışmalarda genotoksisite genellikle kan örneği veya hemositler ile ortaya konmuş olup Khalil ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada kemik iliği kökenli eritrositlere ilaveten Cd-QD'ların fare karaciğeri üzerindeki genotoksik etkisi de araştırılmıştır. Sonuçlar kadmiyum içeren QD'ların karaciğerde 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ve 2-Deoksiguanozin (2-dG) baz hasarlarını indüklediğini

ve DNA’da basamaklanma şeklinde görülen fragmantasyona sebep olduğunu göstermektedir (Khalil ve ark., 2011). Fakat, Quantum Dot’ların genotoksik etkilerinin belirlendiği bu çalışmalar arasında akuatik sistemlerin en yaygın bulunan omurgalı grubu olan balıklar üzerinde gerçekleştirilmiş *in vivo* çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, CdCl₂’ün her konsantrasyonda karaciğerde, solungaca kıyasla bir miktar daha fazla DNA hasarına sebep olduğu görüldü. Farklı dokulardaki DNA hasar miktarının değişkenliği, bu dokulara ait DNA’larda değişken olan alkali-labil bölgelerin sayısı, farklı hücre tiplerinin eksizyon onarımın ve metabolik aktiviteleri, antioksidan konsantrasyonları gibi birden çok parametrede görülen varyasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Lee ve Steinert, 2003). Ayrıca, karaciğerin ana ksenobiyotik metabolize edici organ olmasından dolayı (Bennet, 1999; Singh ve ark., 2001) daha yüksek DNA hasarı öngörülmektedir. Bu tez çalışmasının bulgularına benzer bir şekilde, Ahmed ve ark., (2010), CdCl₂’e maruz kalan *Anabas testudineus*’un karaciğer dokusunda görülen DNA hasarının, solungaç ve böbrek dokularına kıyasla anlamlı bir şekilde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

In vitro çalışmadan alınan örneklerle gerçekleştirilen comet analizi sonuçları, primer kültüre alınan zebra balığı hepatositlerinin besiyeri vasıtasıyla QD’lara ve CdCl₂’e maruz kalmanın % kuyruk DNA miktarlarını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığını göstermektedir ($p < 0,001$) (Şekil 3.12). Ayrıca, QD’ların ve CdCl₂’ün genotoksik etkileri karaciğer üzerinde hem *in vivo* hem de *in vitro* karşılaştırmalı olarak ele alındığında, *in vitro* yöntemle incelenen genotoksik hasarın daha yüksek olduğu gözlenmektedir. *In vivo* ve *in vitro* uygulama gruplarında farklı konsantrasyonlar kullanıldığı için, bu iki yöntemi karşılaştırabilmek amacıyla [Cd²⁺] birikimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmayan CdCl₂ uygulama grupları kullanıldı (*in vitro* yöntemle 50 µg/mL, *in vivo* yöntemle ise 100 µg/L konsantrasyonlarında CdCl₂’e maruz kalan örnekler, ($p > 0,05$). Her ne kadar biriken [Cd²⁺] konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak fark bulunmasa da, CdCl₂’ün *in vitro* koşullarda indüklediği DNA hasarı, *in vivo* koşullardakine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazladır ($p < 0,001$). Kısacası, hücrelerde biriken kadmiyum miktarları aynı olmasına rağmen, *in vitro* koşullarda CdCl₂’e maruz kalmak, *in vivo* koşullara kıyasla genotoksisiteyi çok daha fazla indüklediği görülmektedir. *In vitro* yöntemler ile CdCl₂’e maruz kalan hepatositler, tüm organizmanın savunma sisteminden mahrum

kaldıkları için bu durum öngörülen bir sonuçtur. Bu karşılaştırmadan yola çıkılarak genotoksisite çalışmalarında *in vitro* yöntemler kullanmanın *in vivo* uygulamalara çok yakın sonuçlar vermediği düşünülebilir.



Şekil 3.12. Primer kültüre alınan hepatositlerde gözlemlenen %kuyruk DNA miktarları. 0, 25, 50 veya 100 µg/mL konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan hepatositler 24 saat sonra toplanarak alkali comet analizi gerçekleştirildi ve en az 100 hücre analiz edildi (**p<0,001; One-Way ANOVA).

Cd-QD'ların genotoksik etkilerinin ortaya kondoğu çalışmaların büyük bir çoğunluğu *in vitro* çalışmalardır. Bir çok hücre hattında genotoksisite comet analizi aracılığıyla ortaya konulmuş olup, çalışmada kullanılan Cd-içermeyen QD'lar (CuInZnS/ZnS QD'lar) ile gerçekleştirilmiş ne *in vivo* ne de *in vitro* genotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Kadmiyum içeren QD'ların genotoksisitesinin belirlendiği *in vitro* çalışmalardan birkaçı balık hücreleriyle gerçekleştirilmiştir. Munari ve ark., (2014), gökkuşağı alabalığı gonadlarından elde edilmiş hücre hattı RTG-2 hücrelerinin 24 saat süre ile Cd-QD'lara maruz kalması sonucu %kuyruk DNA miktarlarının kontrole göre artış gösterdiğini; Tang ve ark., (2013b) ise zebra balığı karaciğer hücre hattı (ZFL) üzerinde hem kadmiyumun hem de CdTe QD'ların genotoksik etkileri olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Gagné ve arkadaşları (2008a ve 2008b) primer kültür yöntemi ile elde ettiği gökkuşağı alabalığı hepatositlerine Cd-QD uygulamışlardır. Comet

analizinden farklı olmasına rağmen DNA iplik kırıklarının tespitine yarayan DNA'nın alkali koşullarda yoğunlaştırılmasına dayalı bir yöntem kullanarak DNA iplik kırıklarını belirlemişler ve sonuç olarak hiç madde uygulanmamış kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde DNA hasarı gözlemlemişlerdir. Son olarak Cd-QD'lar insan bronkiyal epitel hücreleri (Nagy ve ark., 2013) insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) (Wang ve ark. 2010) ve akciğer adenokarsinoma hücreleri (A549) (Choi ve ark., 2012) üzerinde de genotoksik açıdan değerlendirilmiş ve tez çalışması ile uyumlu olarak Cd-QD'ların bu hücrelerde de genotoksisiteyi indüklediği bildirilmiştir.

Ayrıca, hem primer kültüre alınan hepatositlerde hem de balıkların QD'lar veya CdCl₂ maruziyeti sonucu solungaç ve karaciğer dokularında hem de meydana gelen DNA hasarı miktarı ile ROT birikimi verileri genel olarak birbirlerine çok benzemektedir. Bu durum hem QD'ların hem de CdCl₂'ün genotoksisiteyi ROT artışı ile indüklediğini düşündürmektedir. Nanopartikül toksisitesinin altında yatan sebebin hücrelerde meydana getirdiği oksidatif stres olduğu bir çok çalışma ve derlemede bildirilmiştir (Manke ve ark., 2013; Paunovic ve ark., 2019; Turan ve ark., 2019; Yan ve ark., 2020). Bunlara ek olarak, nanomateriyallerin genotoksik etkilerinin de ROT birikimi kaynaklı olduğu farklı hücre hatları ve organizmalar ile gösterilmiştir (Ahamed ve ark., 2013; Shukla ve ark., 2014; Kim ve Ryu, 2013; Reeves ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2016).

Kadmiyumun meydana getirdiği DNA hasarı için ise genel olarak kabul edilen görüş, DNA hasarını indirekt olarak oluşturduğudur. Kısaca, kadmiyum hücrelerde ROT birikimine sebep olarak oksidatif stres aracılığıyla DNA hasarına sebep olur; ve ayrıca DNA hasarı tamirini inhibe ederek doğal olarak oluşan hasarların tamir edilmesini engeller ve hasar birikmesini sağlar (Bertin ve Auerbeck; 2006; Filipič, 2012). Ayrıca, kadmiyumun DNA ile direkt ilişkisini ortaya koyan *in vitro* ve *ex vivo* sistemlerle yapılmış birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan iki tanesi *ex vivo* sistemlerde gerçekleştirilmiş olup, bir tanesi hücresiz comet analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada fare karaciğer, böbrek ve akciğerlerden alınan dokulardan Proteinaz K ilavesi olmayan bir lizis solüsyonuyla DNA'yı izole ederek CdCl₂'e maruz bırakılan DNA'da kırık oluşumu görülürken, Proteinaz K ilavesi ile DNA'ya bağlı tüm proteinlerin uzaklaştırılması durumunda DNA kırıkları gözlemlenmemiştir. Araştırmacılar, kadmiyumun direkt olarak DNA'ya bağlanmadığını, bu yüzden kadmiyum aracılı DNA hasarını DNA ile ilişkili proteinler ile kadmiyumun etkileşiminden veya indirekt olarak

oksidatif stresten kaynaklanabileceğini vurgulamıştır (Valverde ve ark., 2001). Diğer bir *ex vivo* çalışmada ise dana timus DNA'sı kadmiyum radyoizotopuna maruz bırakılarak bağlanma miktarları tespit edilmiştir. Sonuçlar, kadmiyumun tek iplikli DNA'ya bağlanmadığını, fakat çift iplikli DNA'nın bazlarına bağlanabildiğini göstermektedir (Waalkes ve Poirier, 1984). Kadmiyum-DNA etkileşiminin *in vitro* yöntemler ile araştırıldığı bir başka çalışmada ise, kadmiyumun DNA'da bulunan fosfat gruplarına direkt olarak bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu durumda DNA fosfat gruplarına bağlı metal katyonu, DNA elektrik yükünü modifiye edebileceğini ve ROT'nin bazlara kadar erişimini kolaylaştırabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, kadmiyum ile gözlemlenen kondensasyon etkisi, bu metalin DNA'nın konformasyonunu değiştirip çok fazla gerilime yol açarak DNA kırılmasına sebep olabileceğini vurgulamışlardır (Belliardo ve ark., 2018). Dolayısıyla tüm bu çalışmalar, bizim çalışmamızda da olduğu gibi QD'ların genotoksik olduğunu göstermektedir.

3.5. Hsp90, Prdx1 ve Rad51 seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi

Tez çalışmamızda, 24 saatlik deney süresi sonunda hepatositlerden, karaciğer ve solungaç dokularından total protein izolasyonu yapıldı. Bu örneklerden western blot analizi yöntemiyle hücrelerde veya dokularda kontrole kıyasla Hsp90, Prdx1 ve Rad51'de meydana gelen kat artışları belirlenerek birbirleri arasında karşılaştırıldı (Şekil 3.13, 3.14 ve 3.15).

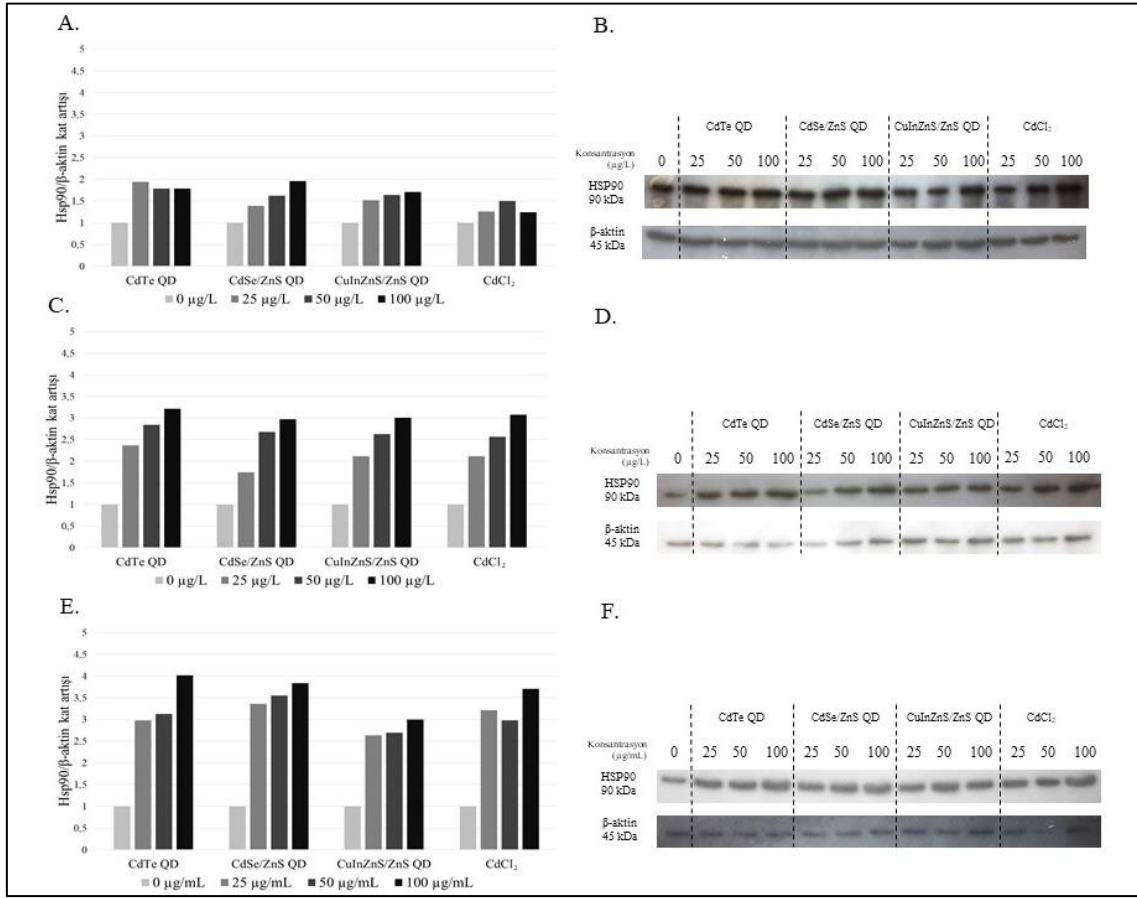
Isı şoku proteinleri, hem *in vivo* hem de *in vitro* uygulamalarda stres koşullarına oldukça hızlı cevap veren proteinlerdir. Stres proteinleri olarak da adlandırılan bu proteinler hem mRNA ekspresyonu hem de protein regülasyonu üzerinden akuatik organizmalar ile gerçekleştirilen çalışmalarda biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Hamer ve ark., 2004; Wiens ve ark., 2000, Tedeschi ve ark., 2015). Yapılan bu tez çalışmasında, 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan hepatositler ve organizmalara ait karaciğer ve solungaç dokularında Hsp90 seviyeleri kontrole kıyasla artış gösterdi (Şekil 3.13).

Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında meydana gelen Hsp90 artışı, tüm materyaller için birbirine yakın seviyelerde olup CdCl₂'e maruz kalan balıklarda diğer gruplara göre nispeten düşük olarak belirlendi. Solungaçlarda meydana gelen Hsp90 artışını, Cd-QD'ların mı yoksa

maruz kalınan iyonik kadmiyumun mu daha fazla etkilediğini anlamak için, hücre içerisinde biriken $[Cd^{2+}]$ miktarının istatistiksel olarak anlam taşımadığı 25 µg/L çekirdek/kabuk QD ve 100 µg/L $CdCl_2$ grupları karşılaştırıldı (QD: 18,38 µM $[Cd^{2+}]$; $CdCl_2$: 13,45 µM $[Cd^{2+}]$; $p>0,05$). Sonuçlar, her ne kadar hücre içi $[Cd^{2+}]$ miktarları arasındaki fark anlamsız olsa da, QD'a maruz kalma durumunda daha fazla Hsp90 kat artışı görüldüğünü göstermektedir (QD: 1,39 kat; $CdCl_2$: 1,24 kat). Ayrıca, Hsp90 artışının ZnS kabuk ile ilişkisini ortaya koymak için, yine hücre içi $[Cd^{2+}]$ seviyeleri arasında fark bulunmayan 25 µg/L çekirdek ve 25 µg/L çekirdek/kabuk QD'a maruz kalan balıklara ait solungaç dokularındaki Hsp90 kat artış miktarları karşılaştırıldı (çekirdek QD: 25,13 µM $[Cd^{2+}]$; çekirdek/kabuk QD: 18,38 µM $[Cd^{2+}]$; $p>0,05$). Bu karşılaştırma sonucunda da ZnS kabuğa sahip olmayan çekirdek tip QD'ların, kabuklu forma göre solungaçlarda daha fazla Hsp90 kat artışına sebep olduğu görüldü (çekirdek QD: 1,94 kat; çekirdek/kabuk QD: 1,39 kat). Aynı durum 50 µg/L çekirdek ve 50 µg/L çekirdek/kabuk QD'a maruz kalan balıklar için de geçerlidir (çekirdek QD: 66,22 µM $[Cd^{2+}]$; çekirdek/kabuk QD: 63,01 µM $[Cd^{2+}]$; $p>0,05$; Hsp90 kat artışı: çekirdek QD: 1,78 kat; çekirdek/kabuk QD: 1,62 kat). Özetle, kadmiyum içeren materyaller için solungaçta meydana gelen Hsp90 artışı hücre içi $[Cd^{2+}]$ miktarları göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, nanomateriyallerin iyonik forma göre, çekirdek tip QD'un ise çekirdek/kabuk formdaki QD'ye göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca aynı konsantrasyonda uygulanan Cd-QD'lar ve Cd-içermeyen QD'lar karşılaştırıldığında, Cd-QD'ların solungaçlarda daha fazla Hsp90 kat artışına sebep olduğu söylenebilir.

Karaciğerde, uygulanan tüm materyallerin sebep olduğu Hsp90 ifadesi konsantrasyona bağlı olarak artış göstermekte olup, her materyalin karaciğer dokusunda sebep olduğu Hsp90 artışının birbirine çok yakın değerlerde olduğu belirlendi. Karaciğerde yükselen Hsp90 seviyesini Cd-QD'ların tipi ile ilişkilendirmek üzere, $[Cd^{2+}]$ birikimi açısından istatistiksel olarak anlam taşımayan 25 µg/L çekirdek QD ve 25 µg/L çekirdek/kabuk QD'larda meydana gelen Hsp90 kat artışı değerleri karşılaştırıldı (çekirdek QD: 23,66 µM $[Cd^{2+}]$; çekirdek/kabuk QD: 17,87 µM $[Cd^{2+}]$; $p>0,05$). Solungaç dokusuna benzer bir şekilde, karaciğer dokusunda da çekirdek tip QD'ların (Hsp90 kat artışı: 2,37) çekirdek/kabuk tipte olanlara göre (Hsp90 kat artışı: 1,74) daha fazla Hsp90 artışına sebep olduğu görüldü. Cd-içermeyen QD'ların karaciğerde sebep

olduğu Hsp90 artışının ise Cd-çekirdek tip QD’lerden daha az, CdCl₂’den daha fazla ve Cd-çekirdek/kabuk tip QD’lara oldukça yakın olduğu belirlendi.



Şekil 3.13. 24 saat süre ile QD’lara veya CdCl₂’e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Hsp90 kat artışları. Değerler iki bağımsız uygulamanın ortalaması olup bu uygulamaları temsilen her gruptan westen blot analizi belirlenen protein bantları (B) solungaç, (D) karaciğer, (F) hepatositler ilgili grafiklerin sağında gösterildi.

Bunların dışında, QD’lara veya CdCl₂’e maruz kalan balıkların kontrole kıyasla Hsp90 artışının her materyal ve konsantrasyon için karaciğer dokusunda, solungaç dokusuna göre daha fazla olduğu görüldü. Bu durum karaciğerin bu materyallere karşı hücresel savunmasında daha yüksek Hsp90 ifadesi ile sağladığını göstermektedir. Dokularda biriken kadmiyum miktarı açısından solungaç ve karaciğerde birikimleri istatistiksel olarak anlam taşımayan 11 farklı ikili grup Hsp90 kat artışı açısından karşılaştırıldı. Sonuçlar her grupta Hsp90 kat artışının karaciğer dokusunda daha yüksek

olduğunu gösterdi. Ayrıca, uygulanan madde miktarları açısından yapılan karşılaştırmada da Hsp90 kat artışı karaciğer dokusunda her materyal için daha fazla olarak belirlendi.

Primer kültüre alınan hepatositlerin 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl₂'e maruz kaldığı *in vitro* çalışmalarda ise, *in vivo* çalışmalardakine benzer bir şekilde tüm materyaller kontrole kıyasla Hsp90 artışına sebep oldu. Bununla beraber, bu grupta kadmiyum içeren tüm materyallerin, Cd-içermeyen QD'lara kıyasla daha fazla Hsp90 kat artışına sebep olduğu görüldü.

QD'ların ve CdCl₂'ün karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda fark edip etmediğini belirlemek üzere, kadmiyum birikim miktarları açısından istatistiksel olarak anlam taşımayan gruplar arasında Hsp90 kat artışları karşılaştırıldı. Bu iki grup arasında kadmiyum birikim miktarı açısından karşılaştırmaya uygun olan çekirdek QD uygulanmış gruplar Hsp90 kat artışı açısından karşılaştırıldı (25 µg/mL *in vitro*: 96,30 µM [Cd²⁺]; 100 µg/L *in vivo*: 102,74 µM [Cd²⁺]; p>0,05). Sonuçlar, [Cd²⁺] birikim miktarları eşit olsa da *in vivo* koşullarda Cd-QD'lara maruz kalmanın *in vitro* koşullara göre daha fazla Hsp90 kat artışına sebep olduğunu göstermektedir (Hsp90 artışı *in vitro*: 2,98 kat; *in vivo*: 3,21 kat). Fakat, CdCl₂'e maruz kalan, [Cd²⁺] birikim miktarı açısından benzerlik gösteren ve istatistiksel olarak anlam taşımayan (p>0,05) 8 ayrı *in vivo* ve *in vitro* grup birbirleri ile karşılaştırıldığında *in vitro* koşullarda Hsp90 kat artışının *in vivo* çalışmalardaki sonuçlara göre çok daha fazla olduğu belirlendi. Bu durum, her ne kadar [Cd²⁺] birikim miktarları aynı olsa da, bu materyallerin *in vivo* veya *in vitro* yöntemlerle uygulanmasının Hsp90 ifadesinde farklılıklara yol açtığını göstermektedir. Sonuç olarak iki farklı uygulama yöntemiyle de bu materyallere maruz kalınması, Hsp90 seviyelerini arttırdığı, fakat *in vitro* koşullarda iyonik kadmiyuma maruz kalınması daha fazla; nano formda kadmiyuma maruz kalınması ise *in vivo* deneylerde daha fazla Hsp90 artışına sebep olduğu görüldü.

Literatür tarandığında QD'ların meydana getirdiği sitotoksosite ile ilişkilendirilmiş bir Hsp90 ifadesine dayanan bir çalışma bulunmamakla beraber, bu protein ailesinden HSP70 ile ilişkilendirilmiş az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, gökkuşağı alabalığı hepatositleri çekirdek tip QD'lara maruz bırakıldıktan sonra enzim immünoanaliz yöntemi ile incelenmiş ve HSP70 seviyelerinde artış görülmüştür (Gagné ve ark., 2008a). Ayrıca yine gökkuşağı alabalığı ile yapılan *in vivo* bir çalışmada

kadmiyum içeren çekirdek tip QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında HSP70'in protein seviyesinde artışının gözlemlendiği ve bu artışın CdSO₄'a kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Louis ve ark., 2010). Bu bulgular hem *in vivo* bulgular ile hem de *in vivo* ile *in vitro* arasında yapılan karşılaştırma ile tutarlıdır. Bu çalışmalar dışında literatürde kadmiyum toksisitesi ile alakalı çalışmalardan bazılarında da HSP ailesine ait proteinlerin mRNA ekspresyonu veya direkt olarak protein ifadesine dayanan birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kadmiyumun HSP protein ailesinden birkaç üyenin mRNA veya protein seviyesinde ölçülmesi sonucunda ortamdaki kadmiyum artışına paralel bir artış gösterdiğini vurgulamaktadırlar. Farklı omurgalı ve omurgasız türlerinde gerçekleştirilen bu çalışmalar kapsamında ısı şoku protein ailesine ait farklı üyelerin protein veya mRNA seviyelerinin ölçülmesiyle Hsp70 seviyelerinin, ortamda kadmiyum varlığında artış gösterdiği bildirilmiştir (Shinkai ve ark.,2017; Zhang ve ark., 2016; Ivanina ve ark., 2009; Plannelo ve ark. 2010; Martinez-Paz ve ark., 2017; Barque ve ark., 1996). Özellikle belirtmek gerekir ki, bu çalışmalar omurgasızlardan bir planarya türü olan *Dugesia japonica* (Zhang ve ark., 2016), istiridye türü olan *Crassostrea virginica* (Ivanina ve ark., 2009), sinek türü olan *Chironomus riparius* (Plannelo ve ark., 2010), salyangoz türü olan *Physa acuta* (Martinez-Paz ve ark., 2017) ile gerçekleştirilmiştir. Hsp90 seviyeleri ise Shinkai ve ark., (2017)'nin sığır aort epiteli hücreleriyle gerçekleştirdiği *in vitro* çalışmada, istiridye türü olan *Hyriopsis cumingii*'nin solungaçlarında (Wang ve ark., 2017b) ve sıçan karaciğerinde (Elez ve ark., 2001) mRNA düzeyinde yükseliş göstermiş olup, yapılan çalışmalar arasında zebra balığına en yakın tür olan sazan balığı *Cyprinus carpio*'ya ait karaciğer ve böbrek dokularında da ortamdaki kadmiyum miktarına bağlı olarak artış göstermiştir (Hermesz ve ark., 2001).

Tüm bu çalışmalar arasında balıklar üzerinde *in vivo* veya *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, kadmiyum içeren QD'lara veya direkt olarak kadmiyuma maruziyetin HSP protein ailesinin bir üyesi olan HSP70'in (Gagné ve ark., 2008a; Louis ve ark., 2010) veya HSP90'ın (Hermesz ve ark., 2001) protein veya mRNA seviyesinde artışa sebep olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında da QD'ların ve CdCl₂'ün hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda HSP90 artışına sebep olduğu western blot analizi yöntemi ile gösterildi. Sonuçlar, QD veya kadmiyum ilişkili toksisite çalışmalarında, Hsp90'ın da Hsp70 kadar önemli bir biyomarkör olabileceğini ve bu materyaller ile ilişkili toksisite çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Peroksiredoksinler, antioksidan sistemin enzimatik elemanları sınıfına dahil edilen önemli proteinlerdir. Hücrelerde hidrojen peroksit gibi peroksidlerin indirgenmesini sağlamanın yanı sıra, hidrojen peroksit aracılı sinyal iletimi, apoptoz veya kanser ilerlemesi gibi toksisite ile ilişkilendirilebilecek farklı fonksiyonları da mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, zebra balıklarının veya direkt olarak hepatositlerinin 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl_2 'e maruziyeti durumunda, hem hepatositlerin hem de karaciğer ile solungaç dokularının Prdx1 seviyeleri kontrole kıyasla artış gösterdi (Şekil 3.14). Balıklar, akvaryum suyu vasıtasıyla bu materyallere maruz kaldığında, solungaçlarda meydana gelen Prdx1 kat artışı ZnS kabuklu QD'larda çekirdek tip QD'lara göre daha fazla olup, bu materyalleri kadmiyumsuz QD'lar ve CdCl_2 takip etmektedir. Her ne kadar bu materyaller eşit konsantrasyonlarda uygulanmış olsa da, bu materyallerin dokularda sebep olduğu reaktif oksijen türleri birikimi birbirlerinden farklıdır. Bu sebeple solungaçlarda meydana gelen Prdx1 artışı, ROT birikimleri birbirine benzer ve istatistiksel olarak anlam taşımayan gruplar arasında karşılaştırıldı. ROT birikimi arasında istatistiksel olarak anlam bulunmayan 25 $\mu\text{g/L}$ çekirdek tip QD ve 50 $\mu\text{g/L}$ CdCl_2 uygulanan balıklarda Prdx1 kat artışı verileri karşılaştırıldı (ROT birikimi QD: %136,63 ve CdCl_2 : %132,80, $p>0,05$). Prdx1 kat artışı değerleri QD'lar için 2,21 iken CdCl_2 için 2,63 olarak belirlendi. Kısacası, aynı miktarda ROT birikimi ile sonuçlanan iki ayrı formda (nano ve iyonik) materyale maruz kalma durumunda, iyonik formda kadmiyuma maruz kalınması durumunun, daha fazla Prdx1 artışına sebep olduğu görüldü. Ayrıca, yine ROT birikimi açısından benzerlik gösteren gruplar arasında yapılan karşılaştırmaya göre (ROT birikimi: çekirdek QD: %288,60; çekirdek/kabuk QD: %279,68; $p>0,05$, Prdx1 kat artışı çekirdek QD: 3,02 kat, çekirdek/kabuk QD: 3,57 kat), ZnS kabuğa sahip QD'ların, kabuksuz formlarına göre daha fazla, kadmiyumsuz QD'ların ise kadmiyumlu QD'lara kıyasla daha fazla Prdx1 artışına sebep olduğu belirlendi (ROT birikimi: Cd-QD: %136,63; Cd'suz-QD: %142,17; $p>0,05$, Prdx1 kat artışı Cd-QD: 2,21 kat, Cd'suz-QD: 2,81 kat).

Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl_2 'e maruz kalan balıklarda da tüm gruplarda kontrole kıyasla Prdx1 artışı gözlemlendi. ROT birikim miktarları birbirine çok yakın olup istatistiksel olarak anlam taşımayan gruplar arasında kontrole kıyasla Prdx1 kat artışları karşılaştırıldığında, karaciğerde de aynı solungaçlarda görüldüğü gibi iyonik kadmiyum kaynağının nano forma göre (ROT birikimi: Cd-QD: %190,92; CdCl_2 :

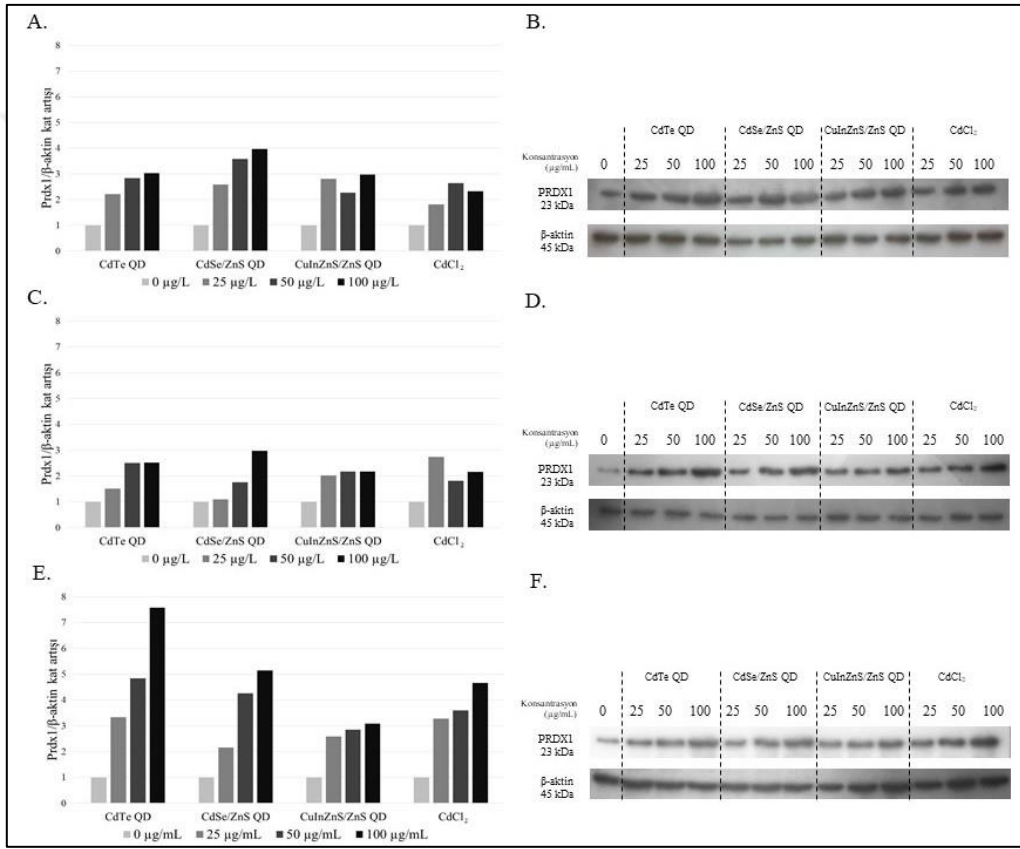
%158,94; $p>0,05$, Prdx1 kat artışı Cd-QD: 1,08 kat, CdCl₂: 2,15 kat), kabuklu Cd-QD'un kabuksuz tipe göre (ROT birikimi: çekirdek QD: %364,13; çekirdek/kabuk QD: %341,38; $p>0,05$, Prdx1 kat artışı çekirdek QD: 2,51 kat, çekirdek/kabuk QD: 2,97 kat) ve kadmiyumsuz QD'ların kadmiyumlu tipe göre (ROT birikimi: Cd-QD: %190,92; Cd'suz-QD: %185,58; $p>0,05$, Prdx1 kat artışı Cd-QD: 1,08 kat, Cd'suz-QD: 2,17 kat) daha fazla Prdx1 kat artışına sebep olduğu görüldü.

Özetle, akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara ve CdCl₂'e maruz kalan balıkların hem karaciğer hem de solungaç dokularında, Prdx1 kat artışı aynı ROT birikimine sahip olmalarına rağmen kadmiyum içermeyen QD'larda kadmiyum içerenlerden daha fazla, kabuklu Cd-QD'lar kabuksuzlara göre daha fazla, iyonik kadmiyum ise Cd-QD'lardan daha fazla Prdx1 artışına sebep olduğu görüldü. Ayrıca, ROT birikimi benzerlik gösteren grupların Prdx1 kat artışlarının materyalden materyale göre farklılık göstermesi, bu materyallerin hücrelerde meydana getirdiği serbest radikallerin veya non-radikal reaktif türlerin farklı olma ihtimalinden de kaynaklanıyor olabileceği göz önüne alınmalıdır.

Aynı konsantrasyonlarda materyale maruz kalarak solungaç ve karaciğer dokularında benzer miktarda ROT oluşumuna neden olan gruplar karşılaştırıldığında, solungaç hücrelerinde hem iyonik kadmiyuma (ROT birikimi solungaç: %150,24 karaciğer: %158,94 $p>0,05$, Prdx1 kat artışı solungaç: 2,31 kat, karaciğer: 2,15 kat), hem Cd-QD'lara (ROT birikimi solungaç: %279,61 karaciğer: %256,11 $p>0,05$, Prdx1 kat artışı solungaç: 3,57 kat, karaciğer: 1,75 kat) hem de kadmiyumsuz QD'lara (ROT birikimi solungaç: %142,17 karaciğer: %160,01 $p>0,05$, Prdx1 kat artışı solungaç: 2,81 kat, karaciğer: 2,01 kat) maruz kalma durumunda karaciğere göre daha fazla Prdx1 kat artışı görüldü. Bu durum, oksidatif dengenin bozulması durumunda, solungaç dokusunun karaciğer dokusuna kıyasla daha fazla Prdx1 ile tepki verdiğini, veya bu materyallerin solungaç dokusunda karaciğer dokusuna kıyasla daha fazla miktarda Prdx1'in substratı olabilecek reaktif oksijen türleri ürettiğini düşündürmektedir.

In vitro koşullarda QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan primer kültüre alınmış hepatositlerde de, *in vivo* uygulamalarda gözlemlendiği gibi kontrole kıyasla Prdx1 artışı görüldü (Şekil 3.14). *In vivo* sonuçlardan farklı olarak, neredeyse birebir aynı miktarda ROT birikimine sebep olan kabuklu ve kabuksuz Cd-QD'lar (ROT birikimi: Çekirdek tip: %143,32 ve çekirdek/kabuk tip: %143,55; $p>0,05$) Prdx1 seviyeleri açısından

karşılaştırıldığında, kabuksuz QD'ların daha fazla Prdx1 artışına neden olduğu belirlendi. 25 µg/mL konsantrasyonlarında çekirdek tip QD'lara maruz kalan hepatositler için kontrole kıyasla Prdx1 artışı 3,32 iken, aynı miktarda çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan hepatositlerde Prdx1 artışı 2,15 olarak belirlendi. Ayrıca, yine *in vivo* uygulamalardan farklı olarak, kadmiyum içeren QD'ların kadmiyum içermeyen QD'lardan daha fazla Prdx1 artışına sebep olduğu görüldü (ROT birikimi Cd-QD: %143,55, Cd'suz QD: %159,81, $p>0,05$; Prdx1 kat artışı Cd-QD: 3,32 kat, Cd'suz QD: 2,58 kat).



Şekil 3.14. 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Prdx1 kat artışları. Değerler iki bağımsız uygulamanın ortalaması olup bu uygulamaları temsilen her gruptan western blot analizi belirlenen protein bantları (B) solungaç, (D) karaciğer, (F) hepatositler ilgili grafiklerin sağında gösterildi.

QD'ların veya CdCl₂'ün sebep olduğu Prdx1 artışına *in vivo* ve *in vitro* koşulların etkisini araştırmak üzere, aynı materyalin aynı miktarlarda ROT üretimine neden olan

konsantrasyonlarına ait gruplardaki Prdx1 artış seviyeleri karşılaştırıldı. Sonuçlar, istatistiksel olarak ROT birikimleri arasında fark bulunmayan her grupta *in vitro* koşullarda daha fazla ROT artışı olduğunu göstermektedir. *İn vitro* koşullarda, hem Cd-QD'lar, hem Cd'suz QD'lar hem de iyonik kadmiyum, kontrole kıyasla Prdx1 kat artışının daha fazla olmasına sebep oldu. Bu durum *in vitro* koşullarda hepatositlerin oksidatif strese karşı verdikleri yanıtın daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

Her ne kadar peroksitler glutatyonlara göre peroksiredoksinler ile 10.000 kat daha fazla reaksiyona girdiği bilinse de, bu antioksidan proteinlerle yapılan toksisite çalışmaları diğer antioksidan enzimlere göre oldukça azdır (Hall ve ark., 2009). Benzer bir şekilde, Quantum Dot'lar ile gerçekleştirilen toksisite çalışmalarında da Prdx1'in protein seviyesinde incelendiği çalışmalar da oldukça az sayıdadır. Bunlardan bir tanesinde, çekirdek tip ve 3 farklı boyuta sahip QD'lar insan akciğer hücre hattı BEAS-2B'a uygulanmış, kütle spektroskopisi ile toksisite ile ilişkili birkaç aday protein incelenmiştir. Sonuçlar, QD'ların akciğer hücreleri üzerinde serbest radikal temizleyici ve ROT detoksifikasyonundan sorumlu olan GSTP1, PRDX1, PRDX2 ve PRDX6 proteinlerini artışına sebep olduğunu göstermiştir. Bu bulgular eşliğinde, çalışmacılar QD'ların neden olduğu toksisiteyi oksidatif stres ile ilişkilendirmişlerdir (Xu ve ark., 2019). Rocha ve ark., midyelerin kadmiyum içeren çekirdek tip QD'lara maruz kalmasından sonra peroksiredoksinler gibi hücrelerde peroksitlerin zararsızlaştırılması için çalışan bir başka enzim olan katalaz aktivitesini ölçmüşlerdir. Yapılan çalışmada, bu midyelerin solungaçlarında QD'ların antioksidan sistemin bir çok elemanını ve katalaz aktivitesinin kontrole kıyasla arttığı gösterilmiştir (Rocha ve ark., 2015). Bir diğer *in vivo* çalışmada ise, farelere 28 gün süre ile çekirdek tip QD uygulanmış ve çalışmanın bir bölümünde karaciğer ile böbrek dokularında oksidatif stres markörleri analiz edilmiştir. QD uygulamasının 1. gününde, SOD, CAT ve GP_x seviyeleri en yüksek seviyeye ulaşmış, bu sebeple karaciğer ve böbrek dokularının QD'lardan kaynaklanan oksidatif hasarı elimine etmek için antioksidan sistemleri harekete geçirdiği vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2017a). Yapılan çalışmada peroksiredoksinler ile ilgili bir analiz yapılmamış olup, peroksiredoksinler ile aynı görevi yapabilen CAT ve GP_x seviyelerinin artış göstermiş olması tez çalışmasındaki bulgulara benzerlik göstermektedir.

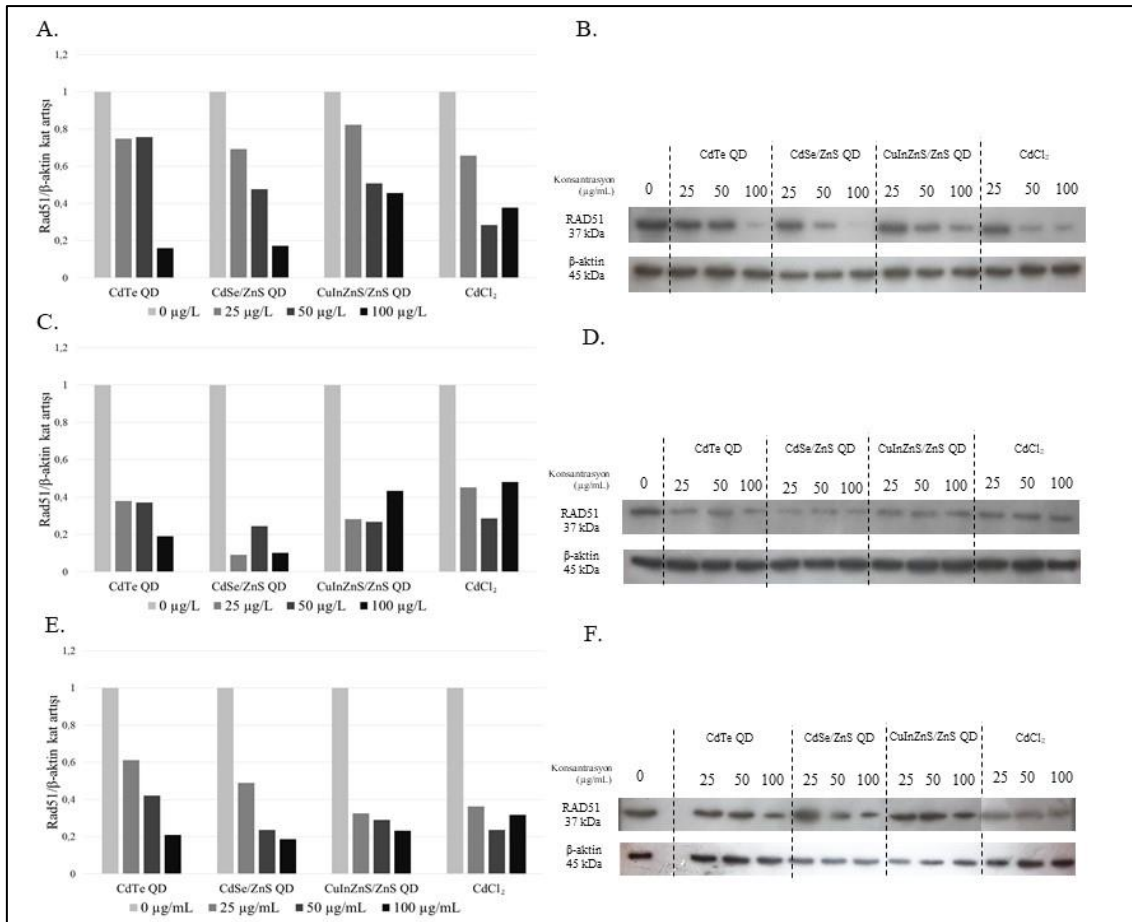
QD'ların peroksiredoksinler üzerinde meydana getirdiği etkiyi incelemek üzere bazı araştırmacılar tarafından bu proteinlere ait mRNA seviyeleri incelenmiştir. İki ayrı

yüzey kaplamasına sahip biri ise çıplak halde bulunan üç adet QD'un monositlerden oluşan THP-1 hücre hattı üzerindeki toksik etkilerinin incelendiği çalışmada, kaplamalardan bağımsız olarak, negatif zeta potansiyeline olan QD'ların prdx1 ekspresyonunun artışına sebep olduğu, pozitif yüke sahip olan QD'un ise prdx1 seviyesini etkilemediği bildirilmiştir. Ekspresyon seviyesi incelenen diğer antioksidan proteinler ile beraber ele alındığında, QD'ların oksidatif stres ile alakalı sistemleri etkilediği bildirilmiştir (Al-Ali ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında Prdx1 artışına sebep olan QD'lar da negatif zeta potansiyeline sahip olduğu için sonuçlar Al-Ali ve arkadaşlarının çalışmasını destekler niteliktedir.

QD'ların peroksiredoksinler üzerindeki etkisini bildiren çalışmalar literatürde oldukça az olup, kadmiyum ile yapılmış çalışmalar bu çalışmalardan sayıca fazladır. Genellikle proteomik çalışmalardan ziyade prdx1 mRNA ekspresyonuna dayanan bu çalışmalar, kadmiyumun prdx1 ifadesini arttırdığına işaret etmektedir. Soleidae familyasına ait *Solea senegalensis* türü ile yapılan bir çalışma, kadmiyumun balık karaciğerinde 1-Cys-Prdx ve CatL proteinlerinin kontrole göre artmasına sebep olduğunu göstermiştir (Costa ve ark., 2010). Ayrıca, zebra balıklarının hem larva hem de ergin formunun olfaktör sistemlerinde kadmiyum ile indüklenen oksidatif stresin sonucu olarak prdx1 mRNA ekspresyonunun da kontrole kıyasla 10,6 kat arttığı bildirilmiştir (Wang ve Gallagher, 2013; Heffern ve ark., 2018). Bu çalışmalar dışında, Wu ve arkadaşlarının fareler üzerinde gerçekleştirdiği kapsamlı araştırma, Nrf2 yolağının aktivasyonunun kadmiyum kaynaklı oksidatif stresi ve karaciğer hasarını önlediğini göstermektedir. Nrf2 yolağının koruyucu etkisi, kadmiyumu temizleyen genlerden ziyade, prdx1 de dahil olmak üzere antioksidan savunmaya dahil olan elemanlara ait genleri indüklemesiyle sağlanmaktadır. Bu çalışmada sadece Prdx1'in mRNA düzeyindeki aktivasyonu değil, ayrıca okside olan peroksiredoksinlerin geri dönüşümünde görev alan Sulfiredoksinlerden Srxn1 transkripsiyonunda da artış gözlenmiştir (Wu ve ark., 2012).

Rad51 rekombinaz, hücrelerin genellikle S ve G₂ fazında tercih ettiği, DNA çift iplik kırıklarının onarım mekanizmalarından biri olan homolog rekombinasyonda rol oynayan önemli bir proteindir. Başta meme kanseri olmak üzere çoğu kanser türünde güçlü bir biyomarkör olan Rad51 (Alshareeda ve ark., 2016), akuatik organizmalarda da farklı ajanların indüklediği DSB'ler için spesifik bir markör olarak kullanılmaktadır (AlAmri ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında balıkların direkt olarak akvaryum suyu vasıtasıyla ya da primer kültüre alınan hepatositlerin besiyeri vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalması durumunda, kontrole kıyasla Rad51 seviyelerinde azalma görüldü (Şekil 3.15). Hem QD'ların hem de CdCl₂'ün Rad51 seviyelerinin azalmasına yol açtığı görülmekle beraber, bu maddeler arasında fark yaratacak kadar olan düşüşler hem *in vivo* hem de *in vitro* uygulamalarda en yüksek konsantrasyonlarda belirginleşmiştir. Yapılan çalışmada Rad51 rekombinaz seviyelerindeki azalış miktarını karşılaştırmaya en uygun veri comet analizi olmakla beraber, gerçekleştirilen alkali comet yönteminin hem tek hem de çift iplik kırıklarının belirlediğini vurgulamak gereklidir.



Şekil 3.15. 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan organizmalara ait (A) solungaç ve (C) karaciğer dokularında ve (E) hepatositlerde belirlenen ve Rad51 kat artışları. Değerler iki bağımsız uygulamanın ortalaması olup bu uygulamaları temsilen her gruptan western blot analizi belirlenen protein bantları (B) solungaç, (D) karaciğer, (F) hepatositler ilgili grafiklerin sağında gösterildi.

Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç ve karaciğer dokuları karşılaştırıldığında, genel olarak Cd-QD'ların karaciğerde daha fazla Rad51 azalışına sebep olduğu görüldü. Bu etkinin çekirdek/kabuk tip QD'lar için daha yüksek olmasına rağmen %DNA kırık miktarları birbirlerine oldukça yakındır. Çekirdek tip QD'lar için ise DNA iplik kırıkları karaciğere kıyasla bir miktar daha düşük olan solungaçlarda, Rad51 seviyesi karaciğere göre daha yüksek olarak belirlendi. Bu durum kontrole göre az miktarda da olsa hücrelerde bulunan Rad51'in belki de çift iplik tamirini gerçekleştiriyor olduğunu düşündürmektedir. CdCl₂'e maruz kalan balıklarda ise solungaç ve karaciğer dokularında Rad51 seviyeleri birbirine oldukça yakın olup, bu seviyeler solungaçlarda nispeten yüksek olarak belirlendi. Ayrıca bu gruplarda Rad51 seviyeleri ile uyumlu olarak %DNA kırık miktarları da solungaçlarda karaciğere göre daha düşüktür. Kadmiyum içermeyen QD'lar ise solungaç dokusunda karaciğere kıyasla Rad51 düşüşü daha az görülmekle beraber, genotoksisite verilerinde belirgin bir fark görülmemektedir.

Quantum Dot ve CdCl₂'ün meydana getirdiği toksisitenin *in vivo* ve *in vitro* yöntemler arasındaki farklılıklarını belirlemek üzere akvaryum suyu vasıtasıyla bu materyallere maruz kalan balıkların karaciğerlerinde ve direkt olarak besiyeri vasıtasıyla maruz kalan hepatositlerde Rad51 seviyeleri karşılaştırıldı. Sonuçlar, kadmiyum içeren QD'ların ve yüksek konsantrasyonlar hariç kadmiyum içermeyen QD'ların, *in vitro* yöntemde daha fazla Rad51 azalmasına sebep olduğunu gösterirken, CdCl₂ için bu durumun tam tersini göstermektedir. Özetle Hsp90 ifadesinde de olduğu gibi, QD'ların toksisitesinin ölçüldüğü bu iki yöntem karşılaştırıldığında *in vivo* yöntemde Rad51 ifadesi *in vitro* koşullardakine göre daha fazla etkilenmiştir.

Literatürde, rad51'in hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda çeşitli ajanların sebep olduğu genotoksisite ile ilişkilendirmek üzere mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenerek biyomarkör olarak kullanıldığı görülmektedir (Singh ve ark., 2017; Chen ve ark., 2014). Her ne kadar kadmiyum genotoksisitesinin ROT üzerinden gerçekleştirdiği bilinse de, DNA tamir sitemlerini hedef aldığı ve bu şekilde hem DNA hasar birikimi hem de mutasyonlara sebep olduğu bildirilmektedir (Hartwig, 1994; Giaginis ve ark., 2006; Bertin ve Averbeck, 2006). Zebra balığı karaciğer hücre hattında (ZFL) kadmiyumun toksik etkilerini araştıran bir çalışmada, rad51 mRNA seviyelerinin kontrole kıyasla oldukça düşük olduğu görülmüştür (Chen ve ark., 2014). Benzer şekilde, ZFL

hücrelerinin kullanıldığı bir başka çalışmada, bakıra maruz kalan hücrelerin Rad51 mRNA seviyelerinin kontrole kıyasla azaldığı (Sandrini ve ark., 2009a) *in vivo* bir diğer çalışmada ise bakıra maruz kalan zebra balığı larvalarında Rad51 protein seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2020). Aksine, iyonize radyasyon veya UVB gibi fiziksel etmenlere maruz kalan canlılar veya hücreler ile yapılan çalışmalarda, Rad51 dahil DNA hasar tamir genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrole göre artış göstermektedir (Sandrini ve ark., 2009b; AlAmri ve ark., 2012). Bu durumun ise çalışmalarda kullanılan radyasyonun DNA çift iplik kırıklarını direkt olarak indüklediği, kadmiyum ve bakırın ise genotoksisiteyi ROT aracılığıyla meydana getirdiğinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Sandrini ve ark., 2009a). Bu tez çalışmasında genotoksisite bulguları ile benzer bir şekilde hücrelerde veya dokularda Rad51 seviyelerinin azaldığı gözlenmiş olup, sonuçlarımız yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer bir şekilde sonuçlanmıştır.

3.6. Histopatolojik Bulgular

Zebra balıklarının akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile 0, 25, 50 ve 100 µg/L konsantrasyonlarında QD'lara veya CdCl₂'e maruziyeti ardından balıklardan alınan karaciğer, solungaç ve deri örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lar veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında gözlenen histopatolojik etkiler Tablo 3.1.'de belirtildi ve bu dokulara ait fotoğraflar Şekil 3.15, 3.16, 3.17 ve 3.18'de gösterildi.

Tablo 3.1. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında meydana gelen histopatolojik etkiler.

	Çekirdek QD'lar			Çekirdek/Kabuk QD'lar			Kadmiyum içermeyen QD'lar			CdCl ₂		
	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L
Melano-makrofaj	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	++	++
Primer Lamel Kalınlaşması	+	++	+++	+	+	+++	+	++	++	-	+	++
Hiperplazi	+	++	++	+	++	++	+	+	+	-	-	++
Bazal Epitelde Hipertrofi	++	+++	+++	+	++	+++	-	-	++	++	+++	+++
Füzyon	++	+++	++++	+	++	+++	-	-	-	+	++	++++

Sekonder Lamel Kısılma	++	++++	++++	+++	++++	+++++	-	-	++	++++	++++	+++++
Sekonder Lamel Fragmentasyon	-	++	++	-	++	+	-	+	+	+	++	+++
Lamel Epitelinde Ayrılma	+++	++++	++++	+	+++	+++	-	-	++	++	+++	+++
Anevrizma	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+
Nekroz	+	++	++	+	++	+	-	+	+	+	+	++

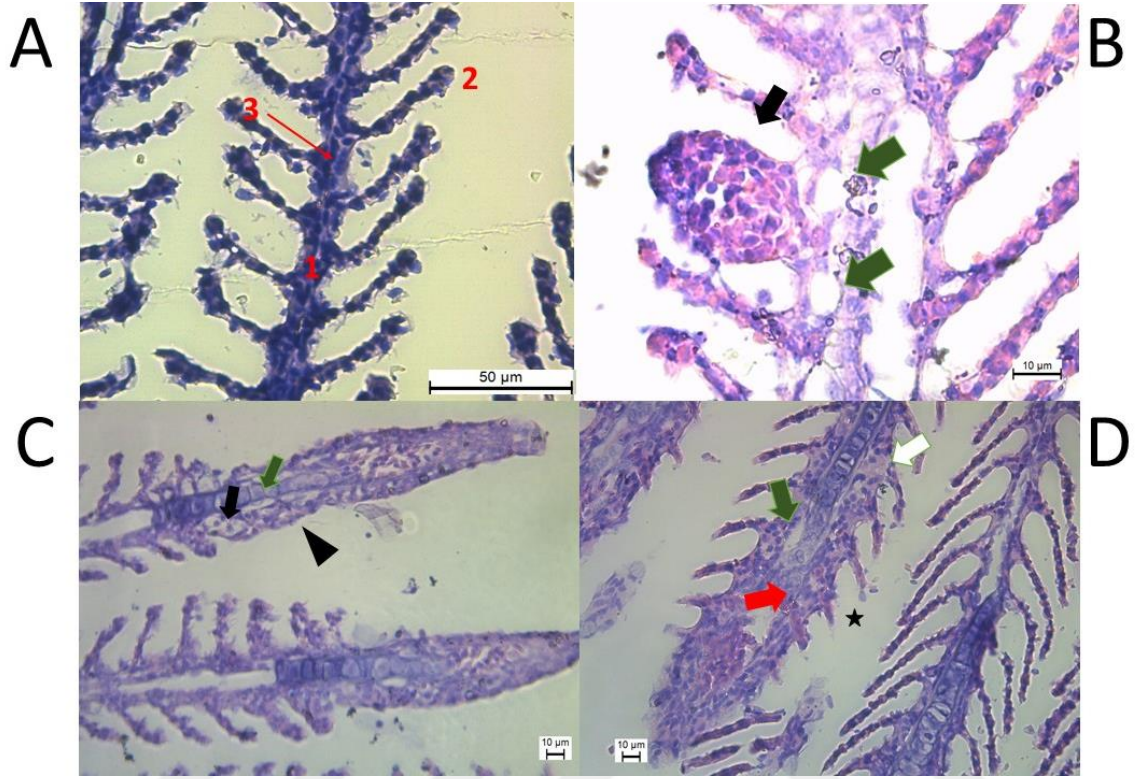
Genel olarak her uygulama grubunda belirgin bir şekilde melanomaktofaj merkezleri gözlemlendi. Bu merkezlerin görülme sıklığı ve kapladığı alan QD uygulanan balıklarda $CdCl_2$ uygulanan balıklara göre daha yoğun olarak tespit edildi. Melanomakrofaj merkezleri, balıklar, amfibiler ve reptillerin organlarında oluşan pigment içeren hücrelerin biriktiği belirgin kümeler olarak adlandırılmakta olup çevresel risk analizinde antropojenik aktivitenin izlenmesi için kullanılmaktadır (Dang ve ark., 2019). Sağlıklı bir balıkta dalak, anterior böbrek ve karaciğerde az miktarlarda bulunabilmelerine rağmen, solungaçların da dahil olduğu diğer organlarda bulunması patolojik bir durum olarak belirtilmektedir (Koppang ve ark., 2005). Bu yapılar genellikle patojenler veya inflamasyonla ilişkilidir ve damarlara yakın bölgelerde bulunup serbest makrofajların birikimiyle oluşmaktadır (Dang ve ark., 2019; Agius ve Roberts, 2003). Tez çalışmamızda melanomakrofaj birikimi $CdCl_2$ uygulanan balıkların solungaç dokularında da görülmesine rağmen genel olarak nanomateriyale maruz kalan balıklarda daha yoğun olarak görüldü. Bu yüzden özellikle nanomateriyale maruziyetin makrofaj birikimine sebep olduğunu düşündürmektedir.

Balıkların QD veya $CdCl_2$ 'e maruziyeti sonucunda melanomakrofaj birikimine ilaveten, bu materyallerin özellikle sekonder lamellerde patolojik etkilere sebep olduğu belirlendi. En belirgin etkilerden biri sekonder lamellerde görülen kısılma durumudur. Sekonder lamellerde meydana gelen kısılmalar toksisite çalışmalarının çoğunda gözlemlenen bir bulgu olup, balıkların toksikantlara verdikleri en belirgin cevaplardan biridir. Bu tez çalışmasında sekonder lamellerin kısılması durumu kadmiyum içeren QD'lara ve $CdCl_2$ 'e maruz kalma durumunda, kadmiyum içermeyen QD'lara kıyasla daha sık olarak gözlemlendi (Şekil 3.16-3.19). Bu sebeple meydana gelen kısılmanın önemli sebebinin kadmiyum olduğu düşünülebilir. Kadmiyum içermeyen QD'lara maruz kalma durumunda da sekonder lamellerde bir miktar kısılma görülmüş olup, bu

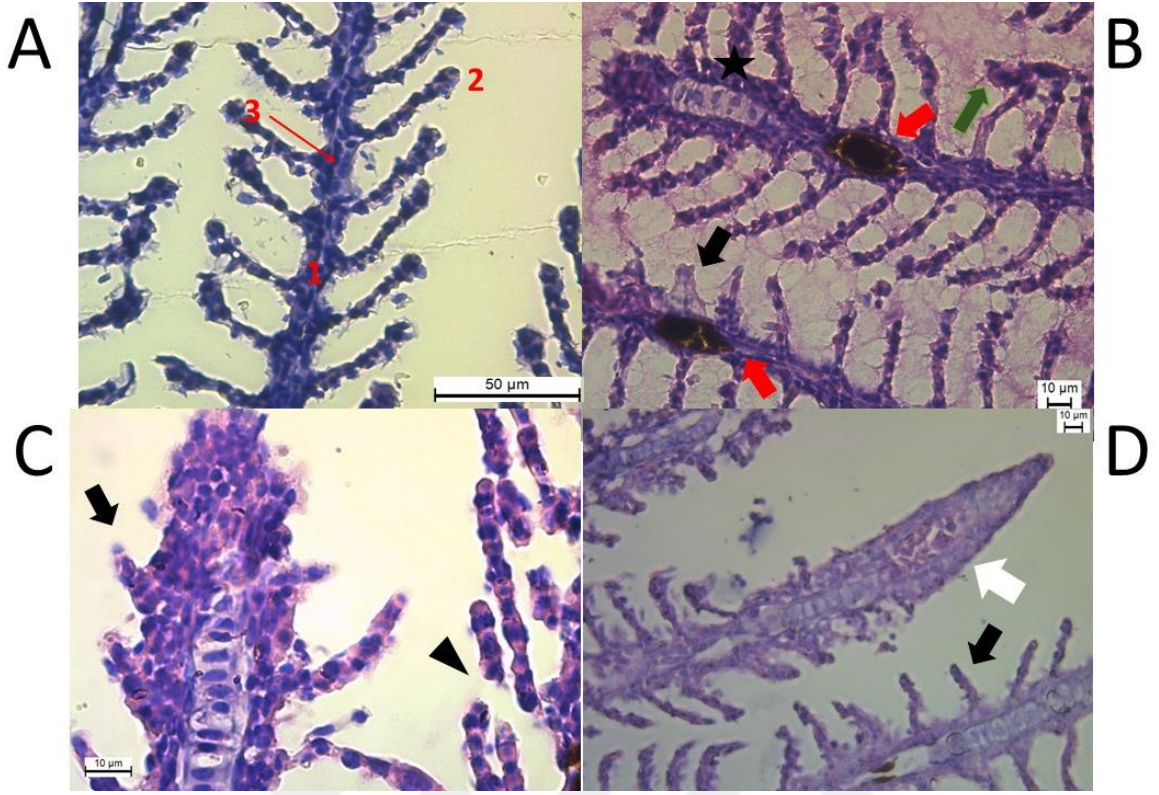
kısaltmalar diğ er materyallere kıyasla daha az gözlemlendi ( ekil 3.18). Bu bulgulara benzer bir şekilde sekonder lamellerde kırılma olarak adlandırılan fragmentasyon durumu da tüm gruplar için, kısaltmaya kıyasla daha az gözlemlendi ( ekil 3.16-3.19). Bu bulgulara ilaveten, balon yapısı oluşması şeklinde karakterize olan anevrizma durumu da sekonder lamellerde oluşan patolojik de i imlerdir. Bu yapılar sekonder lamellerin kısaltması kadar sık görülmemekle beraber, kadmiyum içeren QD’larda daha sık gözlendi ( ekil 3.16 ve 3.17). Sekonder lamellerin kayna ıp bir bütün halinde görüldüğü füzyon durumu da, kısaltmalar kadar önemli bulgular olup, sadece kadmiyum içeren materyallere maruz kalan balıklara ait solungaçlarda gözlendi. Bu sebeple yapılan çalışmada, oluşan füzyon yapılarının sebebinin kadmiyum olduğu düşünülmektedir. Bu yapılar bazal epiteldeki hipertrofi ile oldukça ilişkili olup, kadmiyumun onkogen aktivasyonu ile ilişkisi ve hücre proliferasyonunu uyarıcı etkisinden kaynaklanmış olabilmektedir. Kısaca, bazal epitelde oluşan hipertrofi ve sekonder lamellerdeki kısaltma beraber değerlendirildiğinde sekonder lamel yapılarının bir bütün haline d n      olabileceği düşünülmektedir. Benzer bir şekilde, hücrelerde gözlenen hiperplazinin yani hücrelerin sayıca artma durumunun da epitel hipertrofisini tetiklediği düşünülmektedir. Bu durum da genel olarak primer lamel kalınla masına sebep olmuştur. Tüm bu patolojik bulgulara ilaveten, bütün gruplarda çok yoğun olmamakla beraber nekrotik hücreler de gözlemlendi ( ekil 3.16D ve 3.17C).

Solungaç, osmoregülasyon ve solunum için temel ve kritik organ olup, solungaç morfolojisi ile stres arasında ciddi bir ilişki bulunmaktadır (Korai ve ark., 2010; Saber, 2011). Özellikle sekonder lameller üzerinde belirlenen patolojik etkiler, solungaçların bu görevlerini yerine getirmesine engel olmaktadır ve dolayısıyla balık sa lı ına ciddi zararlar vermektedir (Subashkumar ve Selvanayagam, 2014). Kadmiyum içeren veya içermeyen QD’ların zebra balığı veya herhangi bir balık türü üzerindeki histopatolojik etkileri daha önce belirlenmemiştir. Farklı balık türlerinin benzer metal nanopartiküllere maruziyeti ile yapılan çalışmalarda da bu tez çalışmamızdaki bulgulara benzer bir şekilde primer ve sekonder lamellerde farklılaşmalar g r lm   t r (Verma ve ark., 2020; Subashkumar ve Selvanayagam, 2014; Bilgiseven, 2019; Boyle ve ark., 2013; Yavaş, 2014). Zebra balığının kadmiyuma maruziyeti sonucunda ise özellikle lamel epiteli hipertrofisi başta olmak üzere sekonder lamel füzyonu, anevrizma ve epitel ayrılması

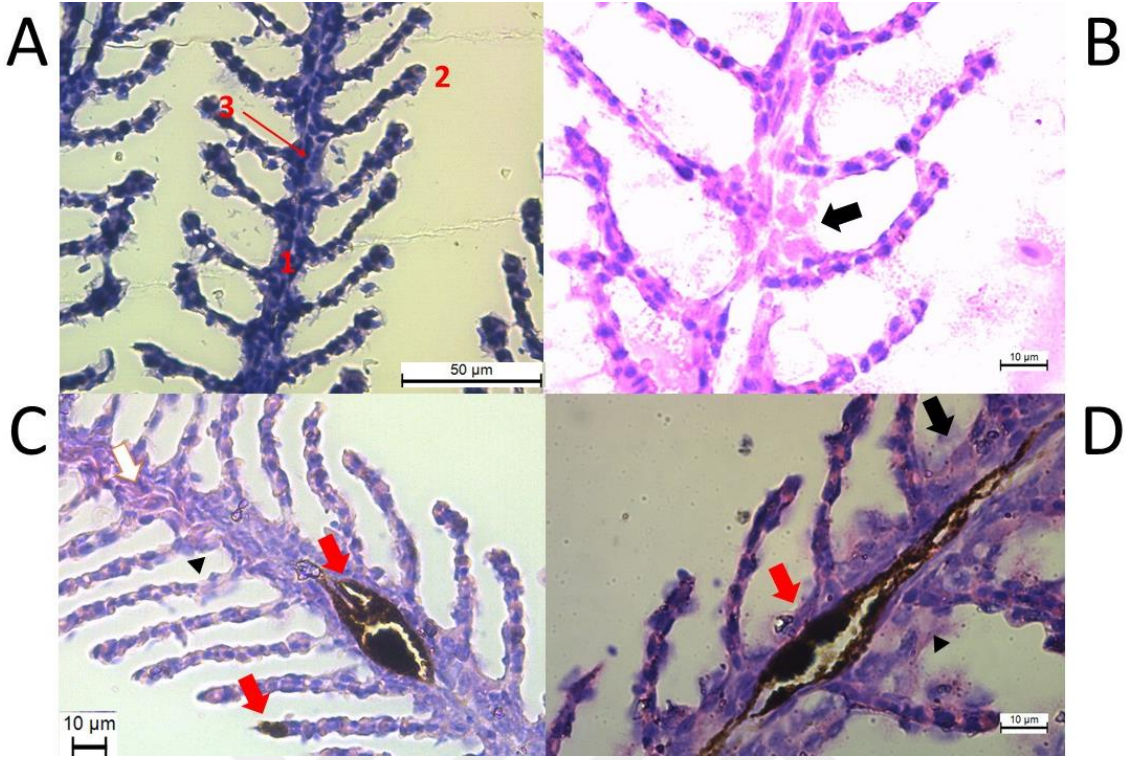
gözlendiği önceki çalışmalarda gösterilmiş olup, tez çalışmasının sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (Lacave ve ark., 2020; Karlsson-Norrgren ve ark., 1985).



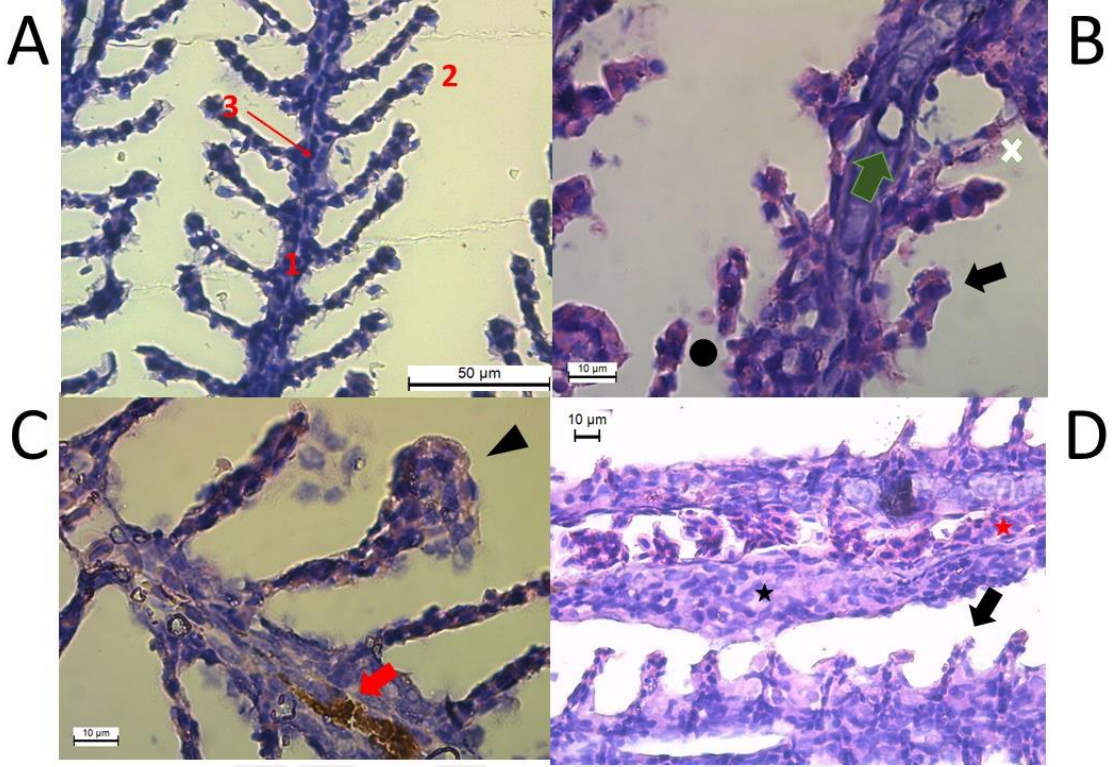
Şekil 3.16. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek tip QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Zebra balıklarının normal solungaç histolojisi 1) primer lamel, 2) sekonder lamel, 3) bazal epitel. **B)** 25 µg/L konsantrasyonunda Cd-QD'a maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında hiperplaziye eşlik eden iki sekonder lamelin füzyonu $\blacktriangle$ ve epitel ayrılması $\blacktriangleup$. **C)** 50 µg/L çekirdek QD uygulanan balıklara ait solungaçlarda sekonder lamel füzyonu $\blacktriangle$, epitel kalkması $\blacktriangleup$ ve hiperplazi $\blacktriangleup$. **D)** 100 µg/L konsantrasyonunda çekirdek QD'a maruz kalan balıklarda bazal epitel hipertrofisi $\blacktriangleup$, epitel kalkması $\blacktriangleup$, nekroz $\blacktriangle$ ve sekonder lamel kısalması $\star$.



Şekil 3.17. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Zebra balıklarının normal solungaç histolojisi 1) primer lamel, 2) sekonder lamel, 3) bazal epitel. **B)** 25 µg/L konsantrasyonunda çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında melanin birikimi ↑, sekonder lamel kalınlaşması ★, kıvrık ve katlanmış sekonder lameller ↑, sekonder lamel kısalması ↑. **C)** 50 µg/L çekirdek/kabuk tip QD uygulanan balıklara ait solungaçlarda sekonder lamel kısalması ↑ ve sekonder lamel fragmentasyonu ▲. **D)** 100 µg/L konsantrasyonunda çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıklarda sekonder lamel füzyonu ↑ ve sekonder lamel kısalması ↑.



Şekil 3.18. Akvaryum suyu vasıtasıyla kadmiyum içermeyen QD'lara maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Zebra balıklarının normal solungaç histolojisi 1) primer lamel, 2) sekonder lamel, 3) bazal epitel. **B)** 25 µg/L konsantrasyonunda Cd'suz QD'lara maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında epitel hücre hiperplazisine eşlik eden hipertrofi $\uparrow$. **C)** 50 µg/L Cd'suz QD uygulanan balıklara ait solungaçlarda melanin birikimi $\uparrow$, nekroz $\blacktriangle$ ve epitel hücre hiperplazisi $\uparrow$. **D)** 100 µg/L konsantrasyonunda Cd'suz QD'lara maruz kalan balıklarda oldukça yoğun görünen melanin birikimi $\uparrow$, nekroz $\blacktriangle$, hiperplaziye eşlik eden hipertrofi $\uparrow$.



Şekil 3.19. Akvaryum suyu vasıtasıyla CdCl_2 'e maruz kalan balıkların solungaçlarında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Zebra balıklarının normal solungaç histolojisi 1) primer lamel, 2) sekonder lamel, 3) bazal epitel. **B)** 25 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda CdCl_2 'e maruz kalan balıklara ait solungaç dokularında sekonder lamellerde kısılma $\blacktriangle$ ve primer lamelde vakuolasyon $\blacktriangle$, epitel ayrılması $\times$ ve sekonder lamde fragmentasyon $\bullet$. **C)** 50 $\mu\text{g/L}$ CdCl_2 uygulanan balıklara ait solungaçlarda melanin birikimi $\blacktriangle$, anevrizma $\blacktriangle$. **D)** 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda CdCl_2 'e maruz kalan balıklarda sekonder lamellerde kısılma $\blacktriangle$, epitel hücre hipertrofisine eşlik eden sekonder lamel füzyonu $\star$ ve hiperemi $\star$.

Zebra balıklarının 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl_2 'e maruz kalmasının ardından karaciğerde meydana gelen histopatolojik değerlendirmeler ise Tablo 3.2.'de belirtildi ve bu balıklara ait karaciğer dokuların fotoğrafları Şekil 3.20, 3.21, 3.22 ve 3.23'de verildi.

Tablo 3.2. Akvaryum suyu vasıtasıyla QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik etkilerin değerlendirilmesi.

	Çekirdek QD'ler			Çekirdek/Kabuk QD'lar			Kadmiyum içermeyen QD'lar			CdCl ₂		
	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L
Glikojen tükenmesi	++++	+++++	+++++	++++	++++	+++++	++	++	++++	++++	++++	++++
Hepatik makro-vesiküler yağ damlaları	+++	++++	+++++	+++	++++	+++++	++	+++	++++	+++	++++	++++
Hepatik Lipidosis	++	+++	+++++	++	+++	+++++	+	++	+++	+	+++	+++
Vakuolasyon	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+	+++	+++	+	++	+++
Hiperplazi	+++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++	++	++++	+++	++++	++++
Nukleus hipertrofisi	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Anormal şekilli Nukleus	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+++
Safra Kanalı genişlemesi	++	++	+++	+	++	++	+	+++	+++	-	-	+
Damar Hasarı	++	++	++	++	++	++	-	-	+	++	++++	+++

Zebra balığı gerek metabolik yollar bakımından memelilerle benzerliğinden dolayı ilaçlarla indüklenen karaciğer toksisitesinin araştırılmasında ve gerekse farklı kirletici maddelere duyarlılığından çevresel etkilerin gözlem için ideal bir model organizma olup karaciğer toksisitesi çalışmalarında önem arz eder (Vliegenthart ve ark., 2014; Dai ve ark., 2014). Bir model organizma olarak zebra balığı, ilaç toksisitesi ve güvenliğini değerlendirmek için sıkça kullanılmaktadır ve çok sayıda çalışma, memeliler ve zebra balığının toksisite profillerinin yüksek oranda benzer olduğunu doğrulamaktadır (McGrath ve Li, 2008).

Zebra balığının karaciğer organizasyonu memelilerden farklıdır. Karaciğerde memelilerde olduğu gibi lobuler yapı bulunmaz, portal ven, hepatik arter, safra kanalı, hepatosit tübülleri ve merkezi ven doku içerisinde dağınık halde bulunur (Harper ve Lawrence, 2011; Vliegenthart ve ark., 2014). Fakat geniş çapta sitokrom p450 enzimlerine sahip olması sayesinde insanlardakilerle aynı metabolik yollarla sahip olduğundan metabolizasyon aynıdır. Bir dizi hepatotoksik ilaca maruz kaldıktan sonra, zebra balığı karaciğeri, memeli karaciğeriyle karşılaştırılabilir histolojik hasar paternleri geliştirir ve zebra balığı kanından karaciğer hasarı için biyobelirteçler ölçülebilir (Vliegenthart ve ark., 2014).

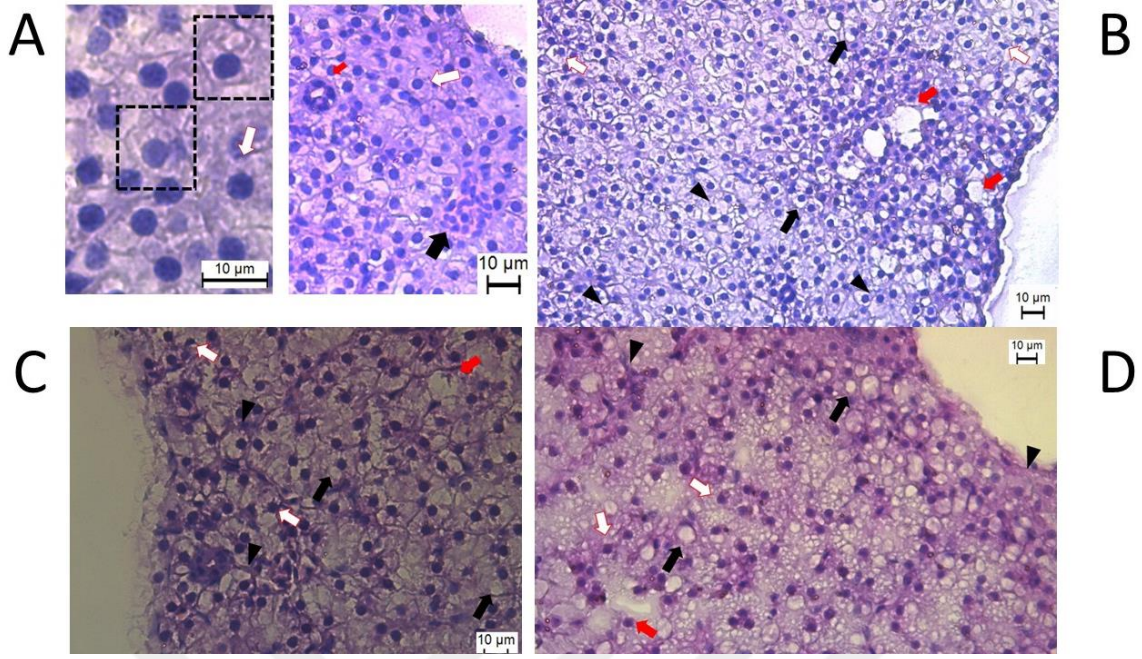
Balıkların akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile QD veya $CdCl_2$ 'e maruz kalması durumunda karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik değişimlerin en belirginini olarak glikojen tükenmesi ve hepatik makrovesiküler yağ damlacıklarının oluşumu olarak gözlemlendi (Şekil 3.20-3.23). Glikoz tükenmesi, hücrelerin hematoxilen eosin boyanmasında daha silik boyanması veya beyaz kalması ile belirlenebilen patolojik bir durum olup, kadmiyumun glikojen metabolizmasına etki ederek karaciğerde glikojen rezervinin azalmasına sebep olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (dos Santos ve ark., 2018; Lin ve ark., 2011; Soengas ve ark., 1996). Bu tez çalışmasında ise tüm gruplarda glikojen azalması tespit edilmekte olup, Cd-QD'larda bu etkinin daha yüksek olduğu belirlendi. Kadmiyum içermeyen QD'ların da diğer QD'lara kıyasla daha az olsa da glikojen azalmasına sebep olduğu belirlendi. Kadmiyum içermeyen QD'ların karaciğerde meydana getirdiği glikojen azalmasının sebebinin QD çekirdeğinde bulunan bakır olduğu düşünülmektedir. Benzer bir şekilde, farklı balık türlerinde bakıra maruz kalma sonucunda da glikojen azalması görülmüştür (Hoyle ve ark., 2007; De Boeck ve ark., 2010).

Balıkların karaciğerlerinde glikojen azalması kadar yoğun görülen bir diğer histopatolojik bulgu ise hepatik makrovesiküler yağ damlacıkları olarak belirlendi. Hepatositlerde oluşan bu yağ damlacıkları oldukça yoğun bir şekilde ve her grupta gözlemlendi (Şekil 3.20-3.23). Özellikle kadmiyum içeren QD'lara maruz kalan balıkların karaciğerinde bu yağ damlacıkları oldukça yoğun olarak görüldü. Makrovesiküler lipid damlacıklarının fazlalığı ve dolayısıyla dokuda lipid birikiminin görülmesi ile karakterize olan ve karaciğer yağlanması olarak da adlandırılan hepatik lipidosis durumu ise özellikle 100 $\mu g/L$ konsantrasyonlarında kadmiyum içeren QD'lara maruz kalan balıklarda belirgin bir şekilde gözlemlendi (Şekil 3.20D, 3.21D, 3.22D ve 3.23D). Tüm bu histopatolojik değişimlerin sadece kadmiyum içeren materyallerde değil, kadmiyum içermeyen QD'larda da ortaya çıkması sebebiyle, QD'ların bu etkileri hem nanomateriyal yapıda olmasından hem de yoğun miktarlarda kadmiyum içermesinden dolayı meydana getirdiği düşünülmektedir. Benzer bir şekilde, karaciğer dokusunda meydana gelen vakuolasyon durumu da hepatik lipidosis durumunda sık görülen ve sebebinin yüksek yağ birikiminden kaynaklanan bir durumdur (Batista ve ark., 2016). Bulgular ile uyumlu olarak, kadmiyumun farelere tek başına veya çinko ile birlikte uygulandığı bir çalışmada, karaciğerde hepatik lipidosis ve vakuolasyon beraber gözlemlenmiş, hatta bu etkilerin

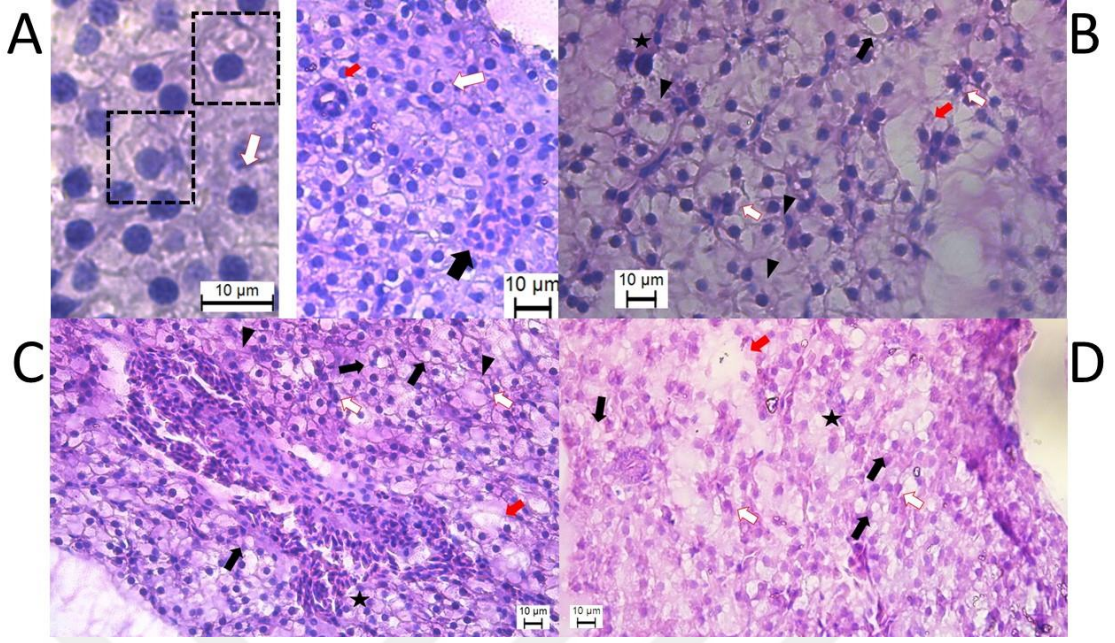
Çinko ile kadmiyumun birlikte verildiği grupta çok daha fazla olduğu bildirilmiştir (Ibraheem ve ark., 2016). Bu bulgular ile uyumlu olarak, vakuolasyon durumunun hem çinko hem de kadmiyumu beraber barındıran çekirdek/kabuk QD'lara maruz kalan balıkların, sadece kadmiyum içeren ekirdek QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıkların karaciğerine göre daha yoğun vakuolasyon olmasının sebebini açıklayabileceği düşünülmektedir.

Yukarıdaki bulgulara ilaveten, QD'lara veya CdCl₂'e maruz kalan balıkların karaciğerlerinde gözlemlenen nuklear değişiklikler, diğer patolojik bulgular kadar yoğun gözlenmemekle beraber, nukleuslarda hipertrofi ve anormal şekilli nukleuslar tespit edildi. Yine bu patolojilerin kadmiyum içeren materyallerde, kadmiyum içermeyen QD'lara göre daha sık görüldüğü belirlendi.

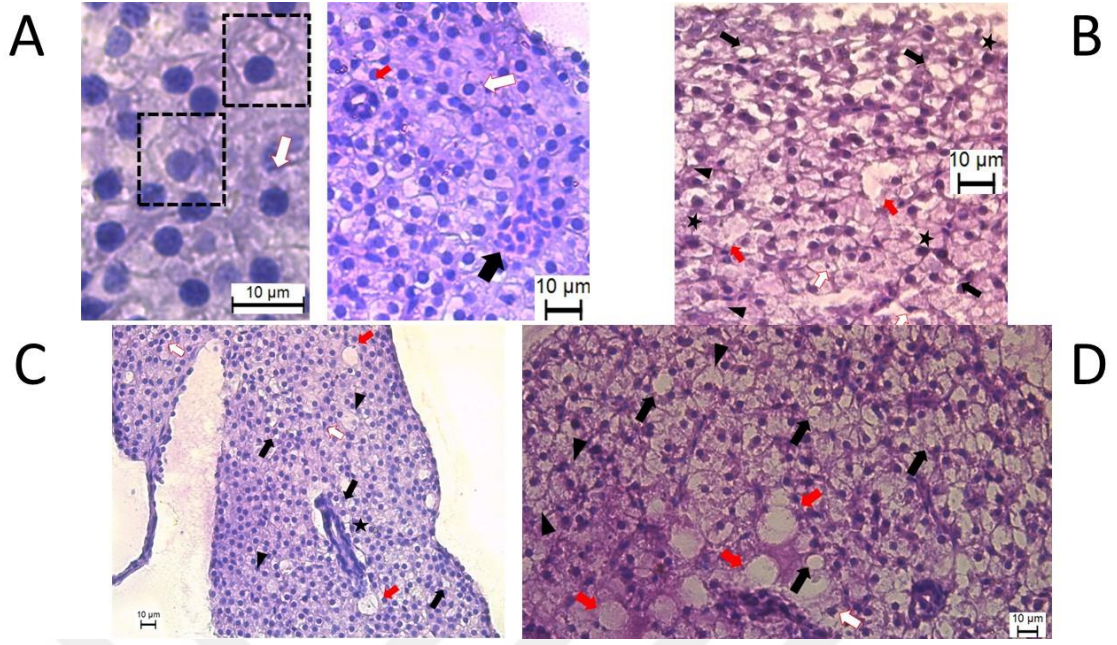
Hem QD'ların hem de CdCl₂'n damar ve safra kanallarına etkileri değerlendirildiğinde, 25 ve 50 µg/L konsantrasyonlarında CdCl₂ uygulanan balıklar hariç diğer gruplarda çok ciddi ve yoğun olmamakla beraber safra kanallarında genişlemelerin meydana geldiği görüldü. Bu sebeple QD'ların safra kanallarına etki eden esas durumun kimyasal yapıdan ziyade nanomateriyal olmaktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun dışında, damarlarda görülen yırtılma veya genişleme durumlarının da kadmiyum içermeyen QD'larda sadece en yüksek konsantrasyonda ve düşük şiddette görülmesinden; buna rağmen özellikle iyonik kadmiyuma maruz kalan balıklarda daha ciddi bir yoğunlukta görülmesinden dolayı, damar hasarı yaratan esas etmenin kadmiyum olduğu düşünülmektedir.



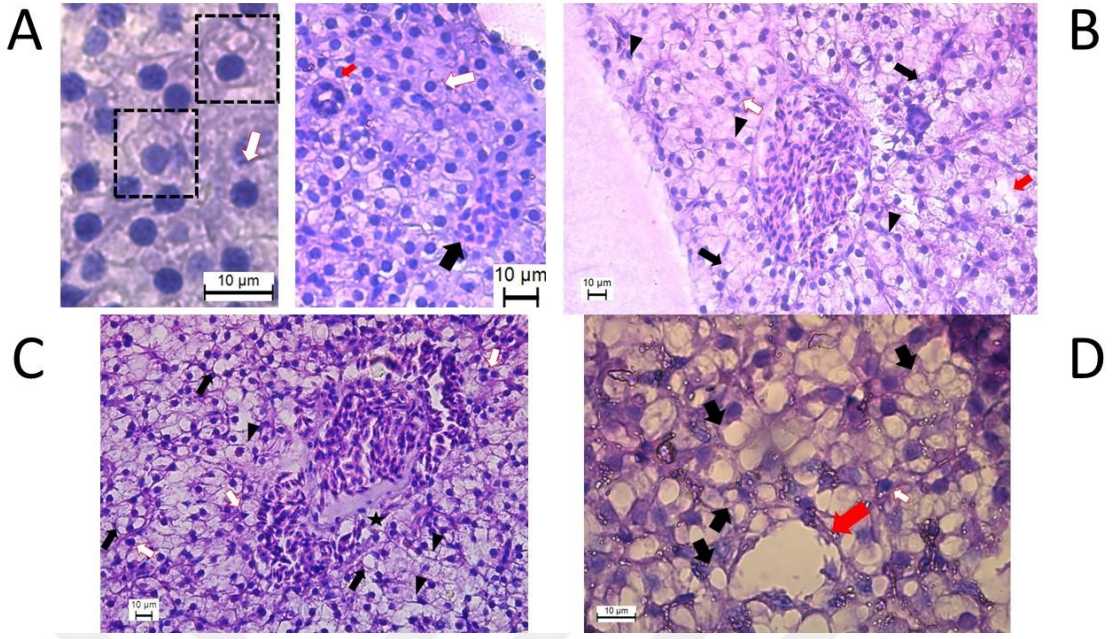
Şekil 3.20. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek tip QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu hepatositler (kesikli çizgi), sağlıklı nukleuslar $\uparrow$, safra kanalı $\uparrow$, kan damarı $\uparrow$. **B)** 25 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen vakuolasyon $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$, anormal şekilli nukleus $\uparrow$ ve genel olarak görülen glikojen depleksyonu. **C)** 50 $\mu\text{g/L}$ çekirdek tip QD uygulanan balıklara ait karaciğerlerde anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, vakuolasyon $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen depleksyonu. **D)** 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen vakuolasyon $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$, anormal şekilli nukleus $\uparrow$ ve ileri derece yağlanmaya eşlik eden disorganizasyon.



Şekil 3.21. Akvaryum suyu vasıtasıyla çekirdek/kabuk tip QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu hepatositler (kesikli çizgi), sağlıklı nukleuslar $\uparrow$, safra kanalı $\uparrow$, kan damarı $\uparrow$. **B)** 25 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, vakuolasyon $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen depleasyonu. **C)** 50 $\mu\text{g/L}$ çekirdek/kabuk tip QD uygulanan balıklara ait karaciğerlerde anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, damar deformasyonu $\star$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen depleasyonu. **D)** 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, vakuolasyon $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen depleasyonu ve yağlanma.



Şekil 3.22. Akvaryum suyu vasıtasıyla kadmiyum içermeyen QD'lara maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu hepatositler (kesikli çizgi), sağlıklı nukleuslar ↑ , safra kanalı ↑ , kan damarı → . **B)** 25 µg/L konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde gözlemlenen anormal şekilli nukleuslar ↑ , nüklear hipertrofi ★ hepatik makroesiküler yağ damlacıkları → , vakuolasyon ↑ , hiperplazi ▲ ve genel olarak görülen glikojen depleasyonu. **C)** 50 µg/L QD uygulanan balıklara ait karaciğerlerde vakuolasyon ↑ , hepatik makroesiküler yağ damlacıkları → hiperplazi ▲ , anormal şekilli nukleus ↑ ,safra kanalı genişlemesi ★ ve hafif glikojen depleasyonu. **D)** 100 µg/L konsantrasyonunda QD'a maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen vakuolasyon ↑ , hepatik makroesiküler yağ damlacıkları → , hiperplazi ▲ , anormal şekilli nukleus ↑ ve glikojen depleasyonu.

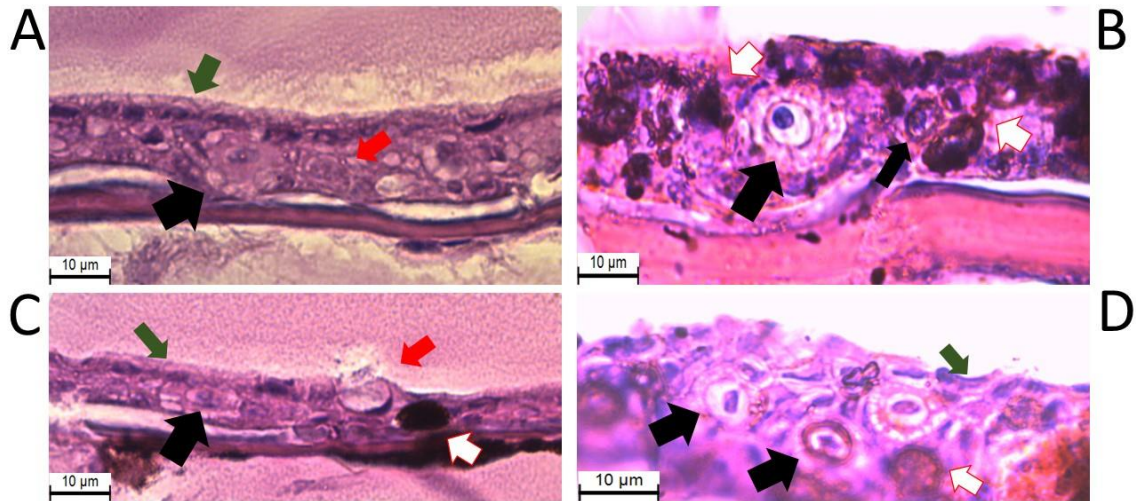


Şekil 3.23. Akvaryum suyu vasıtasıyla CdCl_2 'e maruz kalan balıklara ait karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler. **A)** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu hepatositler (kesikli çizgi), sağlıklı nukleuslar $\uparrow$, safra kanalı $\uparrow$, kan damarı $\uparrow$. **B)** 25 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda CdCl_2 'e maruziyet sonucu karaciğerde gözlemlenen anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, vakuolasyon $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen deplesyonu. **C)** 50 $\mu\text{g/L}$ CdCl_2 uygulanan balıklara ait karaciğerlerde anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, damar deformasyonu $\star$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen deplesyonu. **D)** 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda CdCl_2 'e maruziyet sonucu karaciğerde meydana gelen anormal şekilli nukleuslar $\uparrow$, hepatik makroesiküler yağ damlacıkları $\uparrow$, vakuolasyon $\uparrow$, hiperplazi $\blacktriangle$ ve genel olarak görülen glikojen deplesyonu ve yağlanma.

Zebra balığının derisi, reptillerden ve memelilerden farklı olarak, epitel tabakasının üzerinde keratin tabakası içermeyen, osmoregülasyon ve patojen savunmasında öneme sahip sikloid pullarla çevrilidir. Deride bulunan yatay çizgileri sayesinde kolayca tanınan zebra balıklarının bu çizgilerinde pigmentler bulundurmaktadırlar (Harper ve Lawrence, 2011; Hirata ve ark., 2003). Bunlara ilaveten, deride bol miktarda keratinosit hücreleri, alarm hücreleri ve mukus salgılayan goblet hücreleri bulunmaktadır (Menke ve ark., 2011). Alarm hücreleri, diğer hücelere kıyasla daha büyük hücreler olup, mukus

salgılayan hücrelerden farklı olarak deri dışına açıklığı bulunmaz. Alarm maddeleri olarak adlandırılan içeriklerini sadece deri hasar gördüğünde dışarı salarlar (Smith, 1977).

Balıkların akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile QD'lara veya CdCl_2 'e maruziyeti sonucu alınan deri örneklerinde yapılan histopatolojik incelemeler sonucu, hiçbir grupta farklılaşmaya rastlanmamıştır (Şekil 3.24). Bunun sebebinin deride bulunan mukus tabakasının dokuyu QD'lar veya CdCl_2 'den korumayı etkili bir şekilde gerçekleştirdiği olabilir. Literatürde hem nanomateriyale maruziyet ne de kadmiyum veya farklı bir metale maruziyet sonucunda zebra balığı veya başka bir balık türüne ait deri dokularındaki histopatolojik değişimlerin incelendiği bir çalışma bulunmamakta olup, bu çalışma QD nanomateriyallerinin deriyi histopatolojik olarak etkilemediğini gösteren ilk çalışmadır.



Şekil 3.24. Akvaryum suyu vasıtasıyla 24 saat süre ile QD'lara ve CdCl_2 'e maruz kalan balıklara ait deri dokuları. **A)** Kontrol grubu, **B)** 100 µg/L çekirdek tip QD, **C)** 100 µg/L kadmiyum içermeyen QD ve **D)** 100 µg/L CdCl_2 'e maruziyet sonucunda histopatolojik değişim gözlenmedi. Keratinositler $\blacktriangleup$, goblet hücresi $\blacktriangledown$, alarm hücresi $\blacktriangleup$, pigmentler $\blacktriangleup$.

4. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, üstün optoelektronik özellikleri sayesinde bir çok alanda kullanımı artan QD nanomateriyallerinin farklı tiplerinin zebra balığı modelinde hem *in vivo* hem de *in vitro* yöntemlerle toksisitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması gerçekleştirildi.

Kadmiyum içeren çekirdek tip QD'lar ile gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları, önceki çalışmalar ile uyumlu olarak, toksisitenin hücrelerde veya dokularda biriken kadmiyum iyonlarından ve buna bağlı olarak meydana gelen ROT artışından kaynaklanmakta olabileceğini göstermektedir. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, kadmiyum birikimindeki artışla beraber hem hücre canlılığının azaldığını hem de ROT miktarının arttığını göstermektedir. Tüm veriler beraber değerlendirildiğinde, Cd- çekirdek tip QD'lara maruz kalan hücrelerde Hsp90 artışı, hücrelerde bir stres durumunun olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bununla beraber görülen Prdx1 artışı da oksidatif dengenin etkilendiğini göstermektedir. Bunlara ilaveten, homolog rekombinasyonda görev alarak DNA DSB kırıklarının tamirinde rol oynayan Rad51 seviyelerindeki azalış ve ROT seviyelerindeki artış ile uyumlu olarak alkali komet analizi ile belirlenen DNA iplik kırıkları da bu materyalin genotoksik etkilere yol açtığını açıkça ortaya koymaktadır.

QD'lardan kaynaklanan toksisitenin azaltılması amacıyla izlenen iki yaklaşımdan biri olan çekirdek/kabuk tip QD kullanımı ise, yine literatürle uyumlu olarak beklenen korumayı gerçekleştirilememiştir. Hem deneylerden için hazırlanan akvaryum suyu veya besiyerlerinde gerçekleştirilen ölçümlerde, hem de deney sürelerinin sona ermesi ile hücreler veya dokular içerisinde belirlenen kadmiyum miktarları, kabuk içermeyen QD'lara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olarak tespit edildi ($p < 0,001$). Fakat bu düşüş, QD'ların toksik etkilerinden korunmada başarılı olmadı. Bunun sebebi, her ne kadar kabuk yapısı hücrelerde veya dokularda biriken $[Cd^{2+}]$ miktarını azaltıyor olsa da, tamamen engelleyememesi olabilir. Bununla beraber, ZnS kabuk yapısından hücrelere sızan Zn ve S iyonları, veya çok tehlikeli bir reaktif oksijen türü olan SO^{2-} radikali de kadmiyum miktarlarının azalmış olmasına rağmen toksisitenin azalmamasına sebep vermiş olabilmekte, fakat tez çalışması kapsamında belirtilen parametrelerde ayrı bir ölçüm bulunmamaktadır. Kabuklu ve kabuksuz QD'ların hem *in*

vivo hem de *in vitro* ortamlardaki toksik etkileri beraber değerlendirildiğinde, bu etkiler birbirine oldukça yakındır.

QD toksisitesini indirmek amacıyla takip edilen yaklaşımlardan bir diğeri olan kadmiyum içermeyen QD kullanımı da hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda değerlendirildi. Bulgular arasında en dikkat çeken durum, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen hücre canlılığına olan etkilerin değerlendirildiği çalışmada, bu materyallerin hücre canlılığını etkilemediğidir. Bu durum toksikolojik etkilerin sadece hücre canlılığı üzerinden gösterilmesinin yanlış bir yaklaşım olduğunu doğrulamaktadır. Çünkü, her ne kadar bu materyaller hücre canlılığını etkilemiyor olsa da, aynı Cd içeren QD'lar gibi Cd'suz QD'ların da Hsp90 ve Prdx1 seviyelerinde artışa, Rad51 seviyesinde azalışa, reaktif oksijen türleri birikiminde kontrole kıyasla artışa ve DNA iplik kırıklarına sebep olduğu gösterildi. Bu etkiler her ne kadar Cd içeren QD'lara kıyasla daha az olarak belirlense de, sonuçlar kontrole göre anlamlıdır ve bu materyallerin de hücrelere veya dokulara zarar verdiği ortadadır.

CdCl₂ tuzlarının ise, hücrelere nanomateriyallerden farklı yollardan giriş yaptığı bilinmektedir ve hücrelerde veya dokularda birikimlerinin nanomateriyallere kıyasla düşük olduğu bu çalışmada hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak ortaya konulmuştur. Nanomateriyallere kıyasla hücre içi birikimi düşük konsantrasyonlarda olan bu materyalin, hücre canlılığını kontrole kıyasla artırdığı görülmektedir. Bu artışın ise proto-onkogen aktivasyonu, apoptoz blokajı gibi sebeplerden kaynaklandığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Chen ve ark., 2014). Bu çalışmada QD'larla karşılaştırmak üzere gerçekleştirilen CdCl₂ uygulamasının hem kültürdeki karaciğer hücrelerinde hem de zebra balıklarının karaciğerler ve solungaçlarında belirlenen etkiler de literatürle uyumlu olup, kadmiyum toksisitesini hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda ortaya koymaktadır.

Histopatolojik etkilerin tartışıldığı bölümde açıkça belirtildiği üzere, QD'lara maruz kalan balıklara ait solungaçlarda meydana gelen en karakteristik bulgu melanomakrofaj birikimi olmakla beraber, bu etkinin CdCl₂'e maruz kalan balıklarda QD'lara göre daha az görülmesi, melanomakrofaj birikiminin QD aracılı toksisitede belirleyici bir etki olabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla beraber, kadmiyum içeren QD'lar ve CdCl₂ uygulanan balıklarda ise sekonder lamellerde meydana gelen kısalmalar,

fizyon ve lamel epitelinde meydana gelen ayrılmaların Cd-içermeyen QD'lara göre daha sık ve ciddi seviyede görülüyor olması, bu etkilerin kadmiyum aracılığı ile meydana gelme ihtimalinin daha fazla olduğunu, ve böylece kadmiyum içermeyen QD'ların solungaçlarda sekonder lamellere olan etkisinin daha düşük olduğunu göstermektedir. Karaciğer ise bu materyallere maruziyetten oldukça etkilenmiş olup, en dikkat çeken histopatolojik değişimler özellikle glikojen tükenmesi, hepatik makrovesiküler yağ birikimi, lipidosis, vakuolasyon ve hiperplazidir. Her ne kadar tüm gruplarda bu etkiler yoğun olarak belirlenmiş olsa da, Cd-içermeyen QD'lara maruz kalmak bir miktar daha az glikojen tükenmesi, lipidosis ve vakuolasyon göstermektedir. Fakat her ne olursa olsun, Cd içermeyen QD'lar da Cd içeren QD'lar gibi solungaç ve karaciğer dokularına zarar vermektedir ve balık sağlığını olumsuz etkilediği belirgindir.

Literatürde çekirdek tip QD'lar, $CdCl_2$ ve bu yaklaşımların ürünü olan Cd-çekirdek/kabuk QD'lar ile Cd içermeyen QD'ların birlikte değerlendirildiği *in vivo* veya *in vitro* çalışma bulunmamakla beraber, bu tez çalışmasında ilk kez karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bununla beraber, bu tez çalışması QD'ların balıklar üzerindeki toksikolojik etkilerinin *in vivo* yöntemle belirlendiği ilk çalışmadır. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, QD toksisitesini araştırmak için hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda zebra balığının uygun bir model olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber, *in vitro* yöntemlerle gerçekleştirilecek toksikolojik çalışmalar için hücre canlılığı verilerinin kesinlikle tek başına anlam taşımadığını belirtirken, genotoksik analiz yöntemleri ve moleküler belirteçler kullanılarak detaylandırılması gerekliliğini öneririz. Nanopartiküllerin ve iyonik bileşenlerin hücreye alınıp yollarındaki farklar da göz önünde bulundurularak, materyalin hücreye giriş yolu ve toksisitesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla hücre membranı proteinleri veya iyon kanallarına ait moleküler markörler veya materyallerin membrandan geçişini etkileyen diğer faktörlerin değerlendirildiği ileriki araştırmaların, bu materyallerin karşılaştırmalı toksikolojik analizine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmamızın sonuçları literatürle uyumlu olarak metal nanopartiküllerin toksisitesini etkileyen önemli bir parametre olan truva atı mekanizmasını desteklemektedir. Bu sebeple, aynı bireye ait olsa da dokular arasında görülen farklı toksisite cevaplarının altında yatan sebebi araştırmak üzere lizozomal aktivitenin belirlenmesinin, QD toksisitesinin daha anlaşılır olmasına katkı sağlayacağı umulmaktadır.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen çalışmada kadmiyum içeren veya içermeyen tüm QD’lar hem sitotoksik hem de genotoksik etkiler meydana getirerek hücrelere zarar vermektedir. Bu nedenle bu materyaller kontrollü olarak kullanılmalıdır ve atık yönetimleri kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Unutmamalıdır ki, bu materyallerin kullanımından doğan etkiler hedef dışı canlıları da son kullanıcılar kadar etkilemekte ve evre sağlığını olumsuz etkilemektedir.



KAYNAKLAR

Abbas, M. N., Kausar, S., Cui, H. (2019) The biological role of peroxiredoxins in innate immune responses of aquatic invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 91-97.

Agius, C., Roberts, R.J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499-509.

Ahamed, M., A Alhadlaq, H., Alam, J., Khan, M., Ali, D., Alarafi, S. (2013) Iron oxide nanoparticle-induced oxidative stress and genotoxicity in human skin epithelial and lung epithelial cell lines. *Current pharmaceutical design*, 19(37), 6681-6690.

Ahmed, M.K., Parvin, E., Arif, M., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M. (2010) Measurements of genotoxic potential of cadmium in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch), using the comet assay. *Environmental toxicology and pharmacology*, 30(1), 80-84.

Ahnström, G., Erixon, K. (1973) Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells: strand separation in alkaline solution. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 23(3), 285-289.

Akan, T. (2012) Organofosforlu pestisitlerin arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) ve zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki in vitro genotoksik etkilerinin comet testi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 14-15.

Aktürk, A., (2013) Çok Tabakalı Cdse/Zns Yarıiletken Kuantum Nokta Nanokristallerinde Ekzitonlar. Yüksek lisans Tezi, T.C.Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2.

Al-Ali, A., Singh, N., Manshian, B., Wilkinson, T., Wills, J., Jenkins, G.J., Doak, S.H. (2015) Quantum dot induced cellular perturbations involving varying toxicity pathways. *Toxicology Research*, 4(3), 623-633.

AlAmri, O.D., Cundy, A.B., Di, Y., Jha, A.N., Rotchell, J.M. (2012) Ionizing radiation-induced DNA damage response identified in marine mussels, *Mytilus* sp. *Environmental pollution*, 168, 107-112.

Albanese, A., Chan, W.C. (2011) Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS Nano*, 5(7), 5478-5489.

Alharbi, R.A. (2020) Proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(3), 968-974.

Al-Salim, N., Barraclough, E., Burgess, E., Clothier, B., Deurer, M., Green, S., Malone, L., Weir, G. (2011) Quantum dot transport in soil, plants, and insects. *Science of the total environment*, 409(17), 3237-3248.

Alshareeda, A.T., Negm, O.H., Aleskandarany, M.A., Green, A.R., Nolan, C., TigHhe, P.J., Madhusudan, S., Ellis, I.O., Rakha, E.A. (2016) Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: a key DNA damage response protein. *Breast cancer research and treatment*, 159(1), 41-53.

Ambrosone, A., Mattera, L., Marchesano, V., Quarta, A., Susa, A.S., Tino, A., Tortiglione, C. (2012) Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials*, 33(7), 1991-2000.

Badawi, A., Al-Hosiny, N., Abdallah, S., Negm, S., Talaat, H. (2013) Tuning photocurrent response through size control of CdTe quantum dots sensitized solar cells. *Solar Energy*, 88, 137-143.

Bakalova, R., Ohba, H., Zhelev, Z., Nagase, T., Jose, R., Ishikawa, M., Baba, Y. (2004) Quantum dot anti-CD conjugates: are they potential photosensitizers or potentiators of classical photosensitizing agents in photodynamic therapy of cancer?. *Nano Letters*, 4(9), 1567-1573.

Barman, R. P. (1991) A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio* Hamilton Buchanan (Pisces: Cyprinidae). *Records of the Zoological Survey of India*, 137, 1-91.

Barque, J.P., Abahamid, A., Chacun, H., Bonaly, J. (1996) Different Heat-Shock Proteins Are Constitutively Overexpressed in Cadmium and Pentachlorophenol

Adapted Euglena gracilis Cells. Biochemical and biophysical research communications, 223(1), 7-11.

Barroso, M.M. (2011) Quantum dots in cell biology. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 59(3), 237-251.

Batista, J.S., Freitas, C.I.A., de Paiva, K.A.R., da Silva, J.B., Bezerra, F.S.B., de Olinda, R.G., Fernandes, T.M., Oliveira, A. F. (2016) Hepatic Lipidosis in Banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) Bred in Captivity. Acta Scientiae Veterinariae, 44, 1-4.

Belliardo, C., Di Giorgio, C., Chaspoul, F., Gallice, P., Bergé-Lefranc, D. (2018) Direct DNA interaction and genotoxic impact of three metals: Cadmium, nickel and aluminum. The Journal of Chemical Thermodynamics, 125, 271-277.

Bennet, W.M. (1999) Drug-related renal dysfunction in the elderly. Geriatr. Nephrol. Urol, 9, 21–25.

Bertin, G., Averbek, D. (2006) Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie, 88(11), 1549-1559.

Bhattacharjee, S., Nandi, S. (2017) DNA damage response and cancer therapeutics through the lens of the Fanconi Anemia DNA repair pathway. Cell Communication and Signaling, 15(1), 41.

Bilgiseven, I. (2019) Nano TiO₂ partiküllerinin yüksek CO₂ içerikli sularda yaşayan Japon balıkları (*Carassius auratus*) üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 53-69.

Bottrill, M., Green, M. (2011) Some aspects of quantum dot toxicity. Chemical Communications, 47(25), 7039-7050.

Bourzac, K. (2013) Quantum dots go on display. Nature, 493(7432), 283.

Boyle, D., Al-Bairuty, G.A., Ramsden, C.S., Sloman, K.A., Henry, T.B., Handy, R. D. (2013) Subtle alterations in swimming speed distributions of rainbow trout exposed to

titanium dioxide nanoparticles are associated with gill rather than brain injury. *Aquatic toxicology*, 126, 116-127.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengio, R., Galeone, A., Malvindi, M.A., Vecchio, G., Cingolani, R., Nadeau, J.L., Pompa, P. P. (2013) InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. *Nanoscale*, 5(1), 307-317.

Burgos-Cara, A., Putnis, C.V., Rodriguez-Navarro, C., Ruiz-Agudo, E. (2016) Hydration effects on gypsum dissolution revealed by in situ nanoscale atomic force microscopy observations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 179, 110-122.

Burnette, W.N. (1981) "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195-203.

Caldecott, K.W. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 619.

Cao, J., Schulte, J., Knight, A., Leslie, N. R., Zagozdzon, A., Bronson, R., Manevich, Y., Beeson, C., Neumann, C. A. (2009) Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *The EMBO journal*, 28(10), 1505-1517.

Chan, W.H., Shiao, N.H., Lu, P.Z. (2006) CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicology Letters*, 167(3), 191-200.

Chapdelaine, P., Vignola, K., Fortier, M.A. (2001) Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis. *Biotechniques*, 31(3), 478-482.

Chatterjee, N., Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235-263.

Chen, Y.Y., Zhu, J.Y., Chan, K.M. (2014) Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. *Aquatic toxicology*, 157, 196-206.

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C. (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*, 6(4), 662-668.

Cho, S.J., Maysinger, D., Jain, M., Röder, B., Hackbarth, S., Winnik, F.M. (2007) Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. *Langmuir*, 23(4), 1974-1980.

Choi, Y.J., Kim, Y.J., Lee, J.W., Lee, Y., Lim, Y.B., Chung, H.W. (2012) Cytotoxic/genotoxic effect of CdSe/ZnS quantum dots in human lung adenocarcinoma cells for potential photodynamic UV therapy applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12(3), 2160-2168.

Choong, G., Liu, Y., Templeton, D.M. (2014) Interplay of calcium and cadmium in mediating cadmium toxicity. *Chemico-biological interactions*, 211, 54-65.

Conway, A.B., Lynch, T.W., Zhang, Y., Fortin, G.S., Fung, C.W., Symington, L. S., Rice, P.A. (2004) Crystal structure of a Rad51 filament. *Nature structural & molecular biology*, 11(8), 791-796.

Costa, P.M., Chicano-Gálvez, E., Barea, J.L., DelValls, T.A., Costa, M.H. (2010) Alterations to proteome and tissue recovery responses in fish liver caused by a short-term combination treatment with cadmium and benzo [a] pyrene. *Environmental Pollution*, 158(10), 3338-3346.

Cuyppers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K. (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940.

Dabbousi, B.O., Rodriguez-Viejo, J., Mikulec, F.V., Heine, J.R., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K.F., Bawendi, M. G. (1997). (CdSe) ZnS core– shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(46), 9463-9475.

Dai, Y.J., Jia, Y.F., Chen, N., Bian, W.P., Li, Q.K., Ma, Y.B., Chen, Y.L., Pei, D.S. (2014) Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(1), 11-17.

Dang, M., Nowell, C., Nguyen, T., Bach, L., Sonne, C., Nørregaard, R., Stride, M., Nowak, B. (2019) Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). *Tissue and Cell*, 57, 34-41.

De Boeck, G., Smolders, R., Blust, R. (2010) Copper toxicity in gibel carp *Carassius auratus gibelio*: importance of sodium and glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 332-337.

Demin, K.A., Meshalkina, D.A., Volgin, A.D., Yakovlev, O.V., de Abreu, M.S., Alekseeva, P.A., Friend, A.J., Lakstygai, A.M., Zabegalov, K., Amstislavskaya, T. G., Strekalova, T., Bao, W., Strekalova, T. (2019) Developing zebrafish experimental animal models relevant to schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 105, 126-133.

Derfus, A.M., Chan, W.C., Bhatia, S.N. (2004) Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4(1), 11-18.

Detienne, G., De Haes, W., Mergan, L., Edwards, S. L., Temmerman, L., Van Bael, S. (2018) Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging. *Ageing research reviews*, 44, 33-48.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 5-32.

Donahue, N.D., Acar, H., Wilhelm, S. (2019) Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143, 68-96.

dos Santos, I.V.F., de Souza, G.C., Santana, G.R., Duarte, J.L., Fernandes, C.P., Keita, H., Velasquez-Moyado, J.A., Navarrete, A., Ferreira, I.M., Carvalho, H.O., Carvalho, J.C.T. (2018) Histopathology in Zebrafish (*Danio rerio*) to Evaluate the Toxicity of Medicine: An Anti-Inflammatory Phytomedicine with Janaguba Milk

(Himatanthus drasticus Plumel). Histopathology-An Update, 1st Edition, Srivastava, S. Editor, IntechOpen, London, UK.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews, 82(1), 47-95.

Egler, R.A., Fernandes, E., Rothermund, K., Sereika, S., de Souza-Pinto, N., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Prochownik, E. V. (2005) Regulation of reactive oxygen species, DNA damage and c-Myc function by peroxiredoxin 1. Oncogene, 24(54), 8038-8050.

Elez, D., Dundjerski, J., Matić, G. (2001) Cadmium affects the redox state of rat liver glucocorticoid receptor. Cell biology and toxicology, 17(3), 169-177.

Elsaesser, A., Howard, C.V. (2012) Toxicology of nanoparticles. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(2), 129-137.

Erdogan, I., Akankan, O., Akbas, H. (2013) Simultaneous effects of temperature, hydrostatic pressure and electric field on the self-polarization and electric field polarization in a GaAs/Ga_{0.7}Al_{0.3}As spherical quantum dot with a donor impurity. Superlattices and Microstructures, 59, 13-20.

Eruslanov, E., Kusmartsev S. (2010) Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. Advanced Protocols in Oxidative Stress, vol 594, Armstrong D. Editor. Humana Press, Totowa, NJ.

Eychmüller, A., Mews, A., Weller, H. (1993) A quantum dot quantum well: CdS/HgS/CdS. Chemical Physics Letters, 208(1-2), 59-62.

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res, 399, 37-59.

Feng, Q., Boone, A.N., Vijayan, M M. (2003) Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 135(3), 345-355.

Feynman, R.P. (1960). There's plenty of room at the bottom. California Institute of Technology, Engineering and Science magazine, 22-36.

Filali, S., Pirot, F., Miossec, P. (2020) Biological Applications and Toxicity Minimization of Semiconductor Quantum Dots. *Trends in biotechnology*, 38(2), 163-177.

Filipič, M. (2012) Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 69-77.

Fontana, B.D., Francescon, F., Rosemberg, D.B., Norton, W.H., Kalueff, A.V., Parker, M.O. (2019) Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 100, 9-18.

Fourie, F., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (2007) The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 361-368.

Gagné, F., Auclair, J., Blaise, C. (2008a) Bioreactivity of cadmium telluride quantum dots and sublethal effects in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology*, 5.

Gagné, F., Maysinger, D., André, C., Blaise, C. (2008b) Cytotoxicity of aged cadmium-telluride quantum dots to rainbow trout hepatocytes. *Nanotoxicology*, 2(3), 113-120.

Galeone, A., Vecchio, G., Malvindi, M.A., Brunetti, V., Cingolani, R., Pompa, P.P. (2012) In vivo assessment of CdSe–ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. *Nanoscale*, 4(20), 6401-6407.

Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G. (2006) Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle*, 5(22), 2592-2601.

Gavrilescu, C.M., Paraschiv, C., Horjinec, P., Sotropa, D.M., Barbu, R.M. (2018) The advantages and disadvantages of nanotechnology. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*, 10(2), 153-159.

Gawel, K., Banono, N.S., Michalak, A., Esguerra, C.V. (2019) A critical review of zebrafish schizophrenia models: time for validation?. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 107, 6-22.

Gebel, T., Foth, H., Damm, G., Freyberger, A., Kramer, P.J., Lilienblum, W., . Röhl, C., Schupp, T., Weiss, C., Wollin, K.M., Hengstler, J. G. (2014) Manufactured nanomaterials: categorization and approaches to hazard assessment. *Archives of Toxicology*, 88(12), 2191-2211.

Ghasemi, Y., Peymani, P., Afifi, S. (2009) Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting. *Acta Biomedica*, 80(2), 156-165.

Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S. (2006) DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(3), 282-290.

Gidwani, M., Singh, A. V. (2013) Nanoparticle enabled drug delivery across the blood brain barrier: in vivo and in vitro models, opportunities and challenges. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(14), 1201-1212.

Giglia-Mari, G., Zotter, A., Vermeulen, W. (2011) DNA damage response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a000745.

Green, M., Howman, E. (2005) Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking. *Chemical Communications*, (1), 121-123.

Gui, R., Jin, H., Wang, Z., Tan, L. (2017) Recent advances in optical properties and applications of colloidal quantum dots under two-photon excitation. *Coordination Chemistry Reviews*, 338, 141-185.

Guo, W., Yang, W., Wang, Y., Sun, X., Liu, Z., Zhang, B., Chang, J., Chen, X. (2014) Color-tunable Gd-Zn-Cu-In-S/ZnS quantum dots for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Nano Research*, 7(11), 1581-1591.

Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?. *Life sciences*, 86(11-12), 377-384.

Gülsoy, N., Yavas, C., Mutlu, Ö. (2015) Genotoxic effects of boric acid and borax in zebrafish, *Danio rerio* using alkaline comet assay. *EXCLI Journal*, 14, 890.

Hall, A., Karplus, P.A., & Poole, L.B. (2009) Typical 2-Cys peroxiredoxins—structures, mechanisms and functions. *The FEBS journal*, 276(9), 2469-2477.

Hamer, B., Hamer, D.P., Müller, W.E.G., Batel, R. (2004) Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environment international*, 30(7), 873-882.

Handy, R.D., Von der Kammer, F., Lead, J.R., Hassellöv, M., Owen, R., Crane, M. (2008) The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287-314.

Haque, E., Ward, A.C. (2018) Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 8(7), 561.

Harper, C., Lawrence, C. (2016) *The laboratory zebrafish*, 1st Edition, Crc Press, Boca Raton, USA.

Hartwig, A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead-and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environmental health perspectives*, 102(suppl 3), 45-50.

He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., Yin, C. (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666.

Heffern, K., Tierney, K., Gallagher, E.P. (2018) Comparative effects of cadmium, zinc, arsenic and chromium on olfactory-mediated neurobehavior and gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 201, 83-90.

Hermesz, E., Ábrahám, M., Nemcsók, J. (2001) Identification of two hsp90 genes in carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 129(4), 397-407.

Hirata, M., Nakamura, K.I., Kanemaru, T., Shibata, Y., Kondo, S. (2003) Pigment cell organization in the hypodermis of zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 227(4), 497-503.

Hoyle, I., Shaw, B.J., Handy, R.D. (2007) Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquatic toxicology*, 83(1), 62-72.

Huang, S., Liu, X., Zhang, J., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., Shen, Q., Lian, M., Huang, Y., Cui, Z. (2015) Expression of peroxiredoxin 1 after traumatic spinal cord injury in rats. *Cellular and molecular neurobiology*, 35(8), 1217-1226.

Huggett, R.J. (2018) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press.

Hulla, J.E., Sahu, S.C., Hayes, A.W. (2015) Nanotechnology: History and future. *Human and experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.

Ibraheem, A.S., Seleem, A.A., El-Sayed, M.F., Hamad, B.H. (2016) Single or combined cadmium and aluminum intoxication of mice liver and kidney with possible effect of zinc. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 91-101.

Islam, M.H., Paul, M.T., Burheim, O.S., Pollet, B.G. (2019) Recent developments in the sonoelectrochemical synthesis of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59, 104711.

Ivanina, A.V., Taylor, C., Sokolova, I. M. (2009) Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquatic toxicology*, 91(3), 245-254.

Jaiswal, J.K., Simon, S.M. (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends in Cell Biology*, 14(9), 497-504.

Jaiswal, J. K., Goldman, E.R., Mattoussi, H., Simon, S.M. (2004b). Use of quantum dots for live cell imaging. *Nature Methods*, 1(1), 73.

Jennings, V., Goodhead, R., Tyler, C.R. (2015) Ecotoxicology of nanomaterials in aquatic systems. *Frontiers of Nanoscience*, 8, 3-45.

Ju, L., Zhang, G., Zhang, C., Sun, L., Jiang, Y., Yan, C., J.Duerksen-Hughese, P., Zhang, X., Zhu, X., Chen, F.F., Yang, J. (2013) Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 753(1), 54-64.

Juzenas, P., Chen, W., Sun, Y.P., Coelho, M.A.N., Generalov, R., Generalova, N., Christensen, I.L. (2008) Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1600-1614.

Karlsson, H.L. (2010) The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 651-666.

Karlsson-Norrgren, L., Runn, P., Haux, C., Förlin, L. (1985) Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–Buchanan), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 27(1), 81-95.

Kashiwada, S. (2009) Emerging Aquatic Contamination of Nanomaterials and its Ecological Risk. *Japanese Journal of Environmental Toxicology*, 12(1), 19-32.

Katubi, K.M., Alzahrani, F.M., Ali, D., Alarifi, S. (2019) Dose- and duration-dependent cytotoxicity and genotoxicity in human hepato carcinoma cells due to CdTe QDs exposure. *Human & experimental toxicology*, 38(8), 914-926.

Khalil, W.K.B., Girgis, E., Emam, A.N., Mohamed, M.B., Rao, K.V. (2011) Genotoxicity evaluation of nanomaterials: DNA damage, micronuclei, and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine induced by magnetic doped CdSe quantum dots in male mice. *Chemical Research in Toxicology*, 24(5), 640-650.

Kim, J.D., McCarter, R.J.M., Yu, B.P. (1996) Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging Clinical and Experimental Research*, 8(2), 123-129.

Kim, S., Ryu, D.Y. (2013) Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology*, 33(2), 78-89.

Kirchner, C., Javier, A.M., Susa, A.S., Rogach, A.L., Kreft, O., Sukhorukov, G. B., Parak, W.J. (2005a) Cytotoxicity of nanoparticle-loaded polymer capsules. *Talanta*, 67(3), 486-491.

Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Muñoz Javier, A., Gaub, H. E., Stölzle, S., Fertig, N., Parak, W.J. (2005b) Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*, 5(2), 331-338.

Kloepfer, J.A., Mielke, R.E., Wong, M.S., Nealson, K.H., Stucky, G., Nadeau, J.L. (2003) Quantum dots as strain-and metabolism-specific microbiological labels. *Appl. Environmental Microbiology*, 69(7), 4205-4213.

Koppang, E.O., Haugarvoll, E., Hordvik, I., Aune, L., Poppe, T.T. (2005) Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *Journal of Fish Diseases*, 28(1), 13-22.

Korai, A.L., Lashari, K.H., Sahato, G.A., Kazi, T.G. (2010) Histological lesions in gills of feral cyprinids, related to the uptake of waterborne toxicants from Keenjhar lake. *Reviews in Fisheries Science*, 18(2), 157-176.

Kroto, H.W. (1987) The stability of the fullerenes C_n , with $n = 24, 28, 32, 36, 50, 60$ and 70 . *Nature*, 329(6139), 529-531.

Kulaksız, G., Sancar, A. (2007) Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk J Biochem*, 32(3), 104-111.

Kwon, H. S., Bae, Y.J., Moon, K.A., Lee, Y.S., Lee, T., Lee, K.Y., Kim, T.B., Park, C.S., Moon, H.B., Cho, Y. S. (2012) Hyperoxidized peroxiredoxins in peripheral blood mononuclear cells of asthma patients is associated with asthma severity. *Life sciences*, 90(13-14), 502-508.

Lacave, J.M., Bilbao, E., Gilliland, D., Mura, F., Dini, L., Cajaraville, M.P., Orbea, A. (2020) Bioaccumulation, cellular and molecular effects in adult zebrafish after exposure to cadmium sulphide nanoparticles and to ionic cadmium. *Chemosphere*, 238, 124588.

Lai, L., Jin, J. C., Xu, Z.Q., Mei, P., Jiang, F.L., Liu, Y. (2015) Necrotic cell death induced by the protein-mediated intercellular uptake of CdTe quantum dots. *Chemosphere*, 135, 240-249.

Laurini, E., Marson, D., Fermeglia, A., Aulic, S., Fermeglia, M., Pricl, S. (2020) Role of Rad51 and DNA repair in cancer: A molecular perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 107492.

LeBel, C. P., Bondy, S. C. (1990) Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes.

Lee, R.F., Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res*, 544, 43–64.

Leigh, K.L., Bouldin, J.L., Buchanan, R.A. (2012) Measurement of accumulation of semiconductor nanocrystal quantum dots by *Pimephales promelas*. *Dose-Response*, 10(3), dose-response.

Li, S., Pozhitkov, A., Ryan, R.A., Manning, C.S., Brown-Peterson, N., Brouwer, M. (2010) Constructing a fish metabolic network model. *Genome Biology*, 11(11), R115.

Li, Y., Chen, T., Miao, X., Yi, X., Wang, X., Zhao, H., Lee, S.M., Zheng, Y. (2017) Zebrafish: a promising *in vivo* model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier. *Pharmacological Research*, 125, 246-257.

Lin, Y.S., Tsai, S.C., Lin, H.C., Hsiao, C.D., Wu, S.M. (2011) Changes of glycogen metabolism in the gills and hepatic tissue of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during short-term Cd exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(4), 296-304.

Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B. (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 209-214.

Liu, H., Wu, J., Xu, M., He, J. (2016) A novel biomarker for marine environmental pollution of HSP90 from *Mytilus coruscus*. *Marine pollution bulletin*, 111(1-2), 428-434.

Louis, S., Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Émond, C. (2010) The characterisation of the behaviour and gill toxicity of CdS/CdTe quantum dots in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1), 52-69.

Lovrić, J., Cho, S.J., Winnik, F.M., Maysinger, D. (2005) Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chemistry and Biology*, 12(11), 1227-1234.

Luevano, J., Damodaran, C. (2014) A review of molecular events of cadmium-induced carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 33(3).

Lynch, I., Salvati, A., Dawson, K. A. (2009) Protein-nanoparticle interactions: what does the cell see?. *Nature Nanotechnology*, 4(9), 546.

Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D.A., Musee, N. (2017) Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 134-160.

Maher, K. O. (2018) Nanomedicine and nanotechnology for heart failure research, diagnosis, and treatment. *Heart failure in the child and young adult*, 1st Edition., Jefferies, J., Chang, A., Rossano, J., Shaddy, R., Towbin, J. Editors.; Academic Press, London, UK.

Maltese, G., Psefteli, P.M., Rizzo, B., Srivastava, S., Gnudi, L., Mann, G.E., Siow, R.C. (2017) The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(3), 621-627.

Mamet, J., Yeomans, D.C., Yaksh, T.L., Manning, D.C., Harris, S. (2017) Editor's Highlight: Formulation and Toxicology Evaluation of the Intrathecal AYY1 DNA-Decoy in Sprague Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, 159(1), 76-85.

Manikandan, A., Chen, Y.Z., Shen, C.C., Sher, C.W., Kuo, H.C., Chueh, Y.L. (2019) A critical review on two-dimensional quantum dots (2D QDs): From synthesis toward applications in energy and optoelectronics. *Progress in Quantum Electronics*, 100226.

Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, 2013.

Martínez-Paz, P., Morales, M., Sánchez-Argüello, P., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.L. (2017) Cadmium *in vivo* exposure alters stress response and endocrine-related genes in the freshwater snail *Physa acuta*. New biomarker genes in a new model organism. *Environmental Pollution*, 220, 1488-1497.

Matović, V., Buha, A., Đukić-Čosić, D., Bulat, Z. (2015) Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 130-140.

McGrath, P., Li, C. Q. (2008) Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug discovery today*, 13(9-10), 394-401.

McLean, P., Kunjara, S., Greenbaum, A.L., Guma, K., López-Prados, J., Martín-Lomas, M., Rademacher, T. W. (2008) Reciprocal Control of Pyruvate Dehydrogenase Kinase and Phosphatase by Inositol Phosphoglycans DYNAMIC STATE SET BY "PUSH-PULL" SYSTEM. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33428-33436.

Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P., Woutersen, R.A. (2011) Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic pathology*, 39(5), 759-775.

Misra, U.K., Gawdi, G., Akabani, G., Pizzo, S.V. (2002) Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular signalling*, 14(4), 327-340.

Mitchellmore, C.L., Chipman, J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res*, 399, 135-147.

Mjahed, H., Girodon, F., Fontenay, M., Garrido, C. (2012) Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental cell research*, 318(15), 1946-1958.

Mongillo, J. F. (2007) *Nanotechnology 101*. Greenwood press, Westport, CT, USA.

Moreno-Horn, M., Gebel, T. (2014) Granular biodurable nanomaterials: no convincing evidence for systemic toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(10), 849-875.

Morris, J., Willis, J., De Martinis, D., Hansen, B., Laursen, H., Sintes, J.R., Kearns, P., Gonzalez, M. (2011) Science policy considerations for responsible nanotechnology decisions. *Nature Nanotechnology*, 6(2), 73-77.

Mossman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Mottley, C., Harman, L.S., Mason, R. P. (1985) Microsomal reduction of bisulfite (aqueous sulfur dioxide)—sulfur dioxide anion free radical formation by cytochrome P-450. *Biochemical pharmacology*, 34(16), 3005-3008.

Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sanders, M.B., Brunelli, A., Marcomini, A., Nigro, M., Lyons, B.P. (2014) Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775, 89-93.

Muoth, C., Aengenheister, L., Kucki, M., Wick, P., Buerki-Thurnherr, T. (2016) Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward!. *Nanomedicine*, 11(8), 941-957.

Nafisi, S., Maibach, H.I. (2018). Skin penetration of nanoparticles. *Emerging Nanotechnologies in Immunology*, 1st Edition, Shegokar, R., Souto, E.B. Editors.; Elsevier, Cambridge, US.

Nagy, A., Hollingsworth, J. A., Hu, B., Steinbrück, A., Stark, P. C., Rios Valdez, C., Vuyisich, M., Stewart, M.H., Atha, D.H., Nelson, B.C., Iyer, R. (2013) Functionalization-dependent induction of cellular survival pathways by CdSe quantum dots in primary normal human bronchial epithelial cells. *ACS nano*, 7(10), 8397-8411.

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543-557.

Neumann, C.A., Krause, D.S., Carman, C.V., Das, S., Dubey, D.P., Abraham, J. L., Bronson, R.T., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., Van Etten, R.A. (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature*, 424(6948), 561-565.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839.

OECD (2014), Fish Toxicity Testing Framework, OECD Series on Testing and Assessment, No. 177, OECD, Paris, France.

Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F. (2009) DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. Türk Klinik Biyokimya Derg, 7(2), 61-70.

Padilla, S., Glaberman, S. (2020) The zebrafish (*Danio rerio*) model in toxicity testing. An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, 1st Edition, Pope, C.N., Liu, J., Editors, Academic Press, Oxford, UK.

Panariti, A., Miserocchi, G., Rivolta, I. (2012) The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?. Nanotechnology, Science and Applications, 5, 87.

Paunovic, J., Vucevic, D., Radosavljevic, T., Mandić-Rajčević, S., Pantic, I. (2019) Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. Chemico-Biological Interactions, 108935.

Peskin, A.V., Low, F.M., Paton, L.N., Maghzal, G.J., Hampton, M.B., Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. Journal of Biological Chemistry, 282(16), 11885-11892.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian journal of clinical biochemistry, 30(1), 11-26.

Picard, D. (2002) Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 59(10), 1640-1648.

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), 1109.

Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G. (2010) Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. Science of the total environment, 408(7), 1598-1603.

Pons, T., Pic, E., Lequeux, N., Cassette, E., Bezdetnaya, L., Guillemin, F., Marchal, F., Dubertret, B. (2010) Cadmium-free CuInS₂/ZnS quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity. ACS Nano, 4(5), 2531-2538.

Prajitha, N., Athira, S.S., Mohanan, P.V. (2019) Bio-interactions and risks of engineered nanoparticles. *Environmental research*, 172, 98-108.

Rahimzadeh, M.R., Rahimzadeh, M.R., Kazemi, S., Moghadamnia, A.A. (2017) Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, 8(3), 135.

Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Mahmoudi, M. (2013) Nanoparticle and protein corona. *Protein-nanoparticle Interactions*, Springer, Berlin, Germany.

Ramakrishna, D., Rao, P. (2011) Nanoparticles: Is toxicity a concern?. *Electronic journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 22(4), 92-101.

Redwood, P.S., Lead, J.R., Harrison, R.M., Jones, I.P., & Stoll, S. (2005) Characterization of humic substances by environmental scanning electron microscopy. *Environmental Science and Technology*, 39(7), 1962-1966.

Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J., Jha, A.N. (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 640(1-2), 113-122.

Reshma, V.G., Mohanan, P.V. (2019) Quantum dots: Applications and safety consequences. *Journal of Luminescence*, 205, 287-298.

Rhee, S.G., Woo, H.A. (2020) Multiple functions of 2-Cys peroxiredoxins, I and II, and their regulations via post-translational modifications. *Free Radical Biology and Medicine*.

Riddell, J.R., Bshara, W., Moser, M.T., Spornyak, J.A., Foster, B.A., Gollnick, S. O. (2011) Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature. *Cancer research*, 71(5), 1637-1646.

Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571-573.

Riveros, A.L., Astudillo, J., Vásquez, C.C., Jara, D.H., Guerrero, A.R., Guzman, F., Osorio-Roman, I.O., Kogan, M.J. (2016) Capping biological quantum dots with the

peptide CLPFFD to increase stability and to reduce effects on cell viability. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(8), 230.

Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeirac, M.R., Bebianno, M. J. (2014). Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine environmental research*, 101, 29-37.

Rocha, T. L., Gomes, T., Mestre, N.C., Cardoso, C., Bebianno, M.J. (2015) Tissue specific responses to cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 169, 10-18.

Rosenkranz, P.W. (2010) The ecotoxicology of nanoparticles in *Daphnia magna*. Doctoral dissertation, Edinburgh Napier University, Edinburg, UK, 1-8.

Rozgaj, R., Kašuba, V., Fučić, A. (2002) Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 16(3), 187-192.

Ruiz, L.M., Jensen, E.L., Rossel, Y., Puas, G.I., Gonzalez-Ibanez, A. M., Bustos, R. I., Ferrick, D.A., Elorza, A. A. (2016) Non-cytotoxic copper overload boosts mitochondrial energy metabolism to modulate cell proliferation and differentiation in the human erythroleukemic cell line K562. *Mitochondrion*, 29, 18-30.

Rzagalinski, B.A., Strobl, J.S. (2009) Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 280-288.

Saber, T. (2011) Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. *Rafidain Journal of Science*, 22(1), 46-55.

Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F. (2009a) Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic toxicology*, 95(4), 285-291.

Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F. (2009b) Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1), 220-226.

Schodek, D.L., Ferreira, P., Ashby, M.F. (2009) *Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects*. 1st Edition. Butterworth-Heinemann. Oxford, UK.

Segner, H. (1998) Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 71-81.

Shibata, A., Jeggo, P. A. (2014) DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clinical oncology*, 26(5), 243-249.

Shinchi, H., Wakao, M., Nagata, N., Sakamoto, M., Mochizuki, E., Uematsu, T., Kuwabata, S., Suda, Y. (2014) Cadmium-free sugar-chain-immobilized fluorescent nanoparticles containing low-toxicity ZnS-AgInS₂ cores for probing lectin and cells. *Bioconjugate Chemistry*, 25(2), 286-295.

Shinkai, Y., Masuda, A., Akiyama, M., Xian, M., Kumagai, Y. (2017) Cadmium-mediated activation of the HSP90/HSF1 pathway regulated by reactive persulfides/polysulfides. *Toxicological Sciences*, 156(2), 412-421.

Shukla, R.K., Kumar, A., Vallabani, N.V.S., Pandey, A.K., Dhawan, A. (2014) Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*, 9(9), 1423-1434.

Sieber, S., Grossen, P., Bussmann, J., Campbell, F., Kros, A., Witzigmann, D., Huwyler, J. (2019) Zebrafish as a preclinical *in vivo* screening model for nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 151, 152-168.

Siewit, C.L., Gengler, B., Vegas, E., Puckett, R., Louie, M. C. (2010) Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ER α and c-Jun. *Molecular Endocrinology*, 24(5), 981-992.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.

Singh, N.P., Ogburn, C.E., Wolf, N.S., Belle, G.V., George, M.M. (2001) DNA doublestrand breaks in mouse kidney cells with age. *Biogerontology*, 2, 261–270.

Singh, R., Khatri, P., Srivastava, N., Jain, S., Brahmachari, V., Mukhopadhyay, A., Mazumder, S. (2017) Fluoride exposure abates pro-inflammatory response and induces in vivo apoptosis rendering zebrafish (*Danio rerio*) susceptible to bacterial infections. *Fish & shellfish immunology*, 63, 314-321.

Singh, A.V., Laux, P., Luch, A., Sudrik, C., Wiehr, S., Wild, A.M., Santomauro, G., Bill, J., Sitti, M. (2019) Review of emerging concepts in nanotoxicology: opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(5), 378-387.

Smith, R.J.F. (1977) *Chemical signals in vertebrates*. 1st Edition, Müller-Schwarze, D., Mozell, M.M. Editors, Springer, Boston, MA.

Soenen, S. J., Manshian, B.B., Aubert, T., Himmelreich, U., Demeester, J., De Smedt, S.C., Hens, Z., Braeckmans, K. (2014) Cytotoxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging. *Chemical Research in Toxicology*, 27(6), 1050-1059.

Soengas, J.L., Agra-Lago, M.J., Carballo, B. (1996) Effect of an acute exposure to sublethal concentrations of cadmium on liver carbohydrate metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 57(4).

Spence, R., Fatema, M.K., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, Z.F., Smith, C. (2006) The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1435-1448.

Subashkumar, S., Selvanayagam, M. (2014) First report on: Acute toxicity and gill histopathology of fresh water fish *Cyprinus carpio* exposed to Zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(3), 1-4.

Sullivan, M. R., Bernstein, K. A. (2018) RAD-ical new insights into RAD51 regulation. *Genes*, 9(12), 629.

Sun, H., Chen, M., Wang, Z., Zhao, G., Liu, J. X. (2020). Transcriptional profiles and copper stress responses in zebrafish *cox17* mutants. *Environmental Pollution*, 256, 113364.

Symington, L. S., Gautier, J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics*, 45, 247-271.

Tang, S., Allagadda, V., Chibli, H., Nadeau, J.L., Mayer, G. D. (2013a) Comparison of cytotoxicity and expression of metal regulatory genes in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to cadmium sulfate, zinc sulfate and quantum dots. *Metallomics*, 5(10), 1411-1422.

Tang, S., Cai, Q., Chibli, H., Allagadda, V., Nadeau, J.L., Mayer, G.D. (2013b) Cadmium sulfate and CdTe-quantum dots alter DNA repair in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 272(2), 443-452.

Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., Mitchell, N.J. (2015) Increased expression of Hsp70 and Hsp90 mRNA as biomarkers of thermal stress in loggerhead turtle embryos (*Caretta caretta*). *Journal of thermal biology*, 47, 42-50.

Tissi res, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*, 84(3), 389-398.

Tiwari, D.K., Jin, T., Behari, J. (2011) Bio-distribution and toxicity assessment of intravenously injected anti-HER2 antibody conjugated CdSe/ZnS quantum dots in Wistar rats. *International journal of nanomedicine*, 6, 463.

Tokur, O., Aksoy, A. (2017) *In vitro* sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.

Tsou, Y.H., Zhang, X.Q., Zhu, H., Syed, S., Xu, X. (2017) Drug delivery to the brain across the blood–brain barrier using nanomaterials. *Small*, 13(43), 1701921.

Turan, N.B., Erkan, H.S., Engin, G.O., Bilgili, M.S. (2019) Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity-A review. *Process Safety and Environmental Protection*.

Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E. (2001) Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA–metal interaction?. *Mutagenesis*, 16(3), 265-270.

Vancamp, P., Houbrechts, A.M., Darras, V.M. (2019) Insights from zebrafish deficiency models to understand the impact of local thyroid hormone regulator action on early development. *General and Comparative Endocrinology*, 279, 45-52.

Veal, E.A., Underwood, Z.E., Tomalin, L.E., Morgan, B. A., Pillay, C. S. (2018) Hyperoxidation of peroxiredoxins: gain or loss of function?. *Antioxidants & redox signaling*, 28(7), 574-590.

Verma, Y., Rani, V., Rana, S.V.S. (2020) Assessment of cadmium sulphide nanoparticles toxicity in the gills of a fresh water fish. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 13, 100280.

Vliegenthart, A.B., Tucker, C.S., Del Pozo, J., Dear, J.W. (2014) Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *British journal of clinical pharmacology*, 78(6), 1217-1227.

Von Zglinicki, T., Edwall, C., Ostlund, E., Lind, B., Nordberg, M., Ringertz, N. R., Wroblewski, J. (1992) Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *Journal of Cell Science*, 103(4), 1073-1081.

Waalkes, M.P., Poirier, L.A. (1984) *In vitro* cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc. *Toxicology and applied pharmacology*, 75(3), 539-546.

Wagner, A.M., Knipe, J.M., Orive, G., Peppas, N.A. (2019) Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 94, 44-63.

Wandinger, S.K., Richter, K., Buchner, J. (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18473-18477.

Wang, L., Zhang, J., Zheng, Y., Yang, J., Zhang, Q., Zhu, X. (2010) Bioeffects of CdTe quantum dots on human umbilical vein endothelial cells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(12), 8591-8596.

Wang, L., Gallagher, E.P. (2013) Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology*, 266(2), 177-186.

Wang, J., Sun, H., Meng, P., Wang, M., Tian, M., Xiong, Y., Zhang, X., Huang, P. (2017a). Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice. *International journal of nanomedicine*, 12, 6425.

Wang, Q., Wang, J., Wang, G., Wu, C., Li, J. (2017b) Molecular cloning, sequencing, and expression profiles of heat shock protein 90 (HSP90) in *Hyriopsis cumingii* exposed to different stressors: temperature, cadmium and *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture and Fisheries*, 2(2), 59-66.

Wegner, K.D., Hildebrandt, N. (2015) Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chemical Society Reviews*, 44(14), 4792-4834.

Welch, W.J. (1990) The mammalian stress response cell physiology and biochemistry of stress proteins. *Stress proteins in biology and medicine*, 223-278.

Westerheide, S.D., Morimoto, R.I. (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33097-33100.

Wiens, M., Ammar, M.S., Nawar, A.H., Koziol, C., Hassanein, H.M., Eisinger, M., Müller, I.M., Müller, W.E. (2000) Induction of heat-shock (stress) protein gene expression by selected natural and anthropogenic disturbances in the octocoral *Dendronephthya klunzingeri*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 245(2), 265-276.

Winterbourn, C.C., Hampton, M.B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 549-561.

Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S., Rhee, S. G. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3125-3128.

Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*, 28(1), 32-40.

Wrighton, P.J., Oderberg, I.M., Goessling, W. (2019) There is something fishy about liver cancer: zebrafish models of hepatocellular carcinoma. *Cellular and molecular Gastroenterology and Hepatology*, 8(3), 347.

Wu, K.C., Liu, J.J., Klaassen, C.D. (2012) Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 263(1), 14-20.

Wuister, S.F., de Mello Donega, C., Meijerink, A. (2004) Influence of thiol capping on the exciton luminescence and decay kinetics of CdTe and CdSe quantum dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(45), 17393-17397.

Xie, R., Chen, K., Chen, X., Peng, X. (2008) InAs/InP/ZnSe core/shell/shell quantum dots as near-infrared emitters: bright, narrow-band, non-cadmium containing, and biocompatible. *Nano Research*, 1(6), 457-464.

Xu, S.Q., Zhu, H.Y., Lin, J.G., Su, T.F., Liu, Y., Luo, X.P. (2013) Copper ions stimulate the proliferation of hepatic stellate cells via oxygen stress *in vitro*. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 33(1), 75-80.

Xu, G., Zeng, S., Zhang, B., Swihart, M.T., Yong, K. T., Prasad, P. N. (2016) New generation cadmium-free quantum dots for biophotonics and nanomedicine. *Chemical Reviews*, 116(19), 12234-12327.

Xu, Y.M., Tan, H.W., Zheng, W., Liang, Z.L., Yu, F.Y., Wu, D.D., Yao, Y., Zhong, Q.E., Yan, R., Lau, A.T.Y. (2019) Cadmium telluride quantum dot-exposed human bronchial epithelial cells: a further study of the cellular response by proteomics. *Toxicology Research*, 8(6), 994-1001.

Yan, Y., Wang, G., Huang, J., Zhang, Y., Cheng, X., Chuai, M., Brand-Saberi , B., Chend, G., Jiang, X., Yang, X. (2020) Zinc oxide nanoparticles exposure-induced

oxidative stress restricts cranial neural crest development during chicken embryogenesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 110415.

Yavaş, C. (2014) Bakır oksit nanopartikülleri ve bakır klorürün japon balığı (*Carassius auratus* L. 1758) üzerindeki genotoksik ve histopatolojik etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 67-72.

Yong, K. T., Roy, I., Hu, R., Ding, H., Cai, H., Zhu, J., Zhang, X., Bergey, E.J., Prasad, P. N. (2010) Synthesis of ternary CuInS₂/ZnS quantum dot bioconjugates and their applications for targeted cancer bioimaging. *Integrative Biology*, 2(2-3), 121-129.

Zhang, Y., He, J., Wang, P.N., Chen, J.Y., Lu, Z.J., Lu, D.R., Guo, J., Wang, C.C., Yang, W.L. (2006) Time-dependent photoluminescence blue shift of the quantum dots in living cells: effect of oxidation by singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 128(41), 13396-13401.

Zhang, T., Hu, Y., Tang, M., Kong, L., Ying, J., Wu, T., Xue, Y., Pu, Y. (2015). Liver toxicity of cadmium telluride quantum dots (CdTe QDs) due to oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 23279-23299.

Zhang, X., Mo, Y., Zhou, L., Wang, Y., Wang, Z., Zhao, B. (2016) Induction of hsp70, hsp90, and catalase activity in planarian *Dugesia japonica* exposed to cadmium. *Toxicology and industrial Health*, 32(8), 1373-1380.

Zhang, J., Hamza, I. (2019) Zebrafish as a model system to delineate the role of heme and iron metabolism during erythropoiesis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 128(3), 204-212.

Zhao, X., Ren, X., Zhu, R., Luo, Z., Ren, B. (2016) Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 180, 56-70.

Zhou, R., Li, M., Wang, S., Wu, P., Wu, L., Hou, X. (2014) Low-toxic Mn-doped ZnSe@ ZnS quantum dots conjugated with nano-hydroxyapatite for cell imaging. *Nanoscale*, 6(23), 14319-14325.

Zhou, Z., Yang, J., Chan, K.M. (2017) Toxic effects of triclosan on a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology*, 191, 175-188.

Zhu, L., Ang, S., Liu, W.T. (2004) Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Applied Environmental Microbiology*, 70(1), 597-598.

Zizioli, D., Mione, M., Varinelli, M., Malagola, M., Bernardi, S., Alghisi, E., Borsani, G., Finazzi, D., Monti, E., Presta, M., Russo, D. (2019) Zebrafish disease models in hematology: highlights on biological and translational impact. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(3), 620-633.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nur KALUÇ
Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 25.11.1989
Yabancı Dili: İngilizce ve Japonca
E-Posta: nur.kaluc@maltepe.edu.tr

Öğrenim Durumu

Derece	Bilim/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen	İstanbul Anadolu Lisesi	2007
Lisans	Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi	2011
Yüksek Lisans	Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2014

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017-Devam Ediyor	Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Bilimsel Eserler:

KALUC, N., BİLGİSEVEN, I., MUTLU, Ö., GÜLSOY, N. (2020) Toxicity of Cadmium Based and Cadmium Free Quantum Dots in Primary Cultured Zebrafish Hepatocytes. Fresenius Environmental Bulletin, 29(07A):6102-6110.

ATALAY, P.B., KALUC, N., CAVUSOGLU, E.E. (2020) Effect of Mitosis on the Resistance to Oxidative and Osmotic Stresses in Yeast. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 24(1), 265-271.

ATALAY, P.B, **KALUÇ, N.** (2019) Mitoz sırasında H₂O₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı dirençte Yca1'in rolünün incelenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 12(2), 230-239.

Sözlü Bildiri ve Poster Bildiri:

Nur KALUÇ, Sara Pavesi, Pınar Buket DEMİREL (15-17 Kasım 2019) Cadmium induces both caspase and Aif-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. 7 th International Symposium on Academic Studies in Health and Sport Sciences, Ankara. Sözlü Sunum

Nur KALUÇ, Pınar Buket DEMİREL (17-20 Aralık 2019). Stabilized hypochlorous acid induces apoptosis or necrosis in *Saccharomyces cerevisiae* depending on its concentration. 8 th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Afyon.

Pınar Buket ATALAY, Elif Çavuşoğlu, **Nur KALUÇ** (5-7 Eylül 2019) Effects of high glucose on nocodazole-induced mitotic arrest. VII. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul. Sözlü Sunum.

Pınar Buket ATALAY, **Nur KALUC** (1-3 Mart 2019). Effect of acidity on the oxidative stress sensitivity in yeast. International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, Ankara. Sözlü Sunum.

Nur KALUÇ, Irmak BİLGİSEVEN, Nagihan GÜLSOY (07-10 Eylül 2018) Comparative evaluation of genotoxic and cytotoxic potential of different types of Quantum Dot nanoparticles and Cadmium Chloride salts on primary cultured hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*). 2 nd International Conference on Innovations in Natural Science and Engineering, Kyiv, Ukraine. Poster Sunumu

Projeler:

Farklı özellikteki Quantum Dot'ların sitotoksik, genotoksik ve protein biyomarkörleri üzerindeki olası etkilerinin balık hücre kültüründe araştırılması
MARMARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR KOORDİNASYON
BİRİMİ - BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ - Araştırmacı- 2016

Farklı Quantum Dot'ların zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) üzerinde toksikolojik etkilerinin belirlenmesi MARMARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR KOORDİNASYON BİRİMİ - BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ - Araştırmacı-2017

Karbon Nanomateryaller Ailesinden Nanoelmas'ın Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin *Saccharomyces cerevisiae* Modelinde Araştırılması- MALTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR KOORDİNASYON BİRİMİ- BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ- Proje Yürütücüsü- 2019

Slx5'in oksidatif stres cevabındaki rolünün *Saccharomyces cerevisiae*'de araştırılması. MALTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR KOORDİNASYON BİRİMİ- BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ. Araştırmacı. 2020