

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDÜSTRİDE PLASTİKLEŞTİRİCİ OLARAK KULLANILAN
DİOKTİL ADİPAT ve DİOKTİL FTALAT MADDELERİNİN
ZEBRA BALIĞI LARVALARI ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİ

SERAP TERZİ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. HALİS BORAN
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. BÜLENT VEREP
DOÇ. DR. CENGİZ MUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2016

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDÜSTRİDE PLASTİKLEŞTİRİCİ OLARAK KULLANILAN DİOKTİL
ADİPAT ve DİOKTİL FTALAT MADDELERİNİN ZEBRA BALIĞI
LARVALARI ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİ**

Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN danışmanlığında **Serap TERZİ** tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/05/2016 tarihinde SU ÜRÜNLERİ Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı Adı Soyadı
Başkan :	Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN
Üye :	Prof. Dr. Bülent VEREP
Üye :	Doç. Dr. Cengiz MUTLU

İmzası

AS
[Handwritten signatures]



Prof. Dr. Selami ŞAŞMAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında yürütülmüştür. “Endüstride plastikleştirici olarak kullanılan dioktil adipat ve dioktil ftalat maddelerinin zebra balığı larvaları üzerine toksik etkileri” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su ürünleri Fakültesi, Akuatik Toksikoloji Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı ve Su Kimyası Laboratuvarları’nda gerçekleştirilmiştir.

Tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmaların yürütülmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını esirgemeyen ve göstermiş olduğu ilgiden dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca, tez yazım aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle benden desteğini esirgemeyen Uzman Biyolog Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ’e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Yüksek Lisans öğrenimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ve yol arkadaşım Emre PASLI’ya sonsuz şükranlarımı sunarım. Öğrenim hayatıma başladığım ilk günden itibaren büyük bir özveriyle benimle ilgilenen, emeğini ve sevgisini esirgemeyen, bugünkü başarılarımın mimarı ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim sevgili babacığım Kemal TERZİ’nin anısına ithaf edilmiştir. Sonsuz sevgi ve özlemlerle.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi R.T.E.Ü. BAP tarafından 2015.53001.103.01.02 nolu proje ile desteklenmiştir.

Serap TERZİ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Endüstride Plastikleştirici Olarak Kullanılan Dioktil Adipat ve Dioktil Ftalat Maddelerinin Zebra Balığı Larvaları Üzerine Toksik Etkileri” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 25/04/2016



Serap TERZİ

***Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

ÖZET

ENDÜSTRİDE PLASTİKLEŞTİRİCİ OLARAK KULLANILAN DİOKTİL ADİPAT VE DİOKTİL FTALAT MADDELERİNİN ZEBRA BALIĞI LARVALARI ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİ

Serap TERZİ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN

Sanayi faaliyetlerinden kaynaklanan atık maddelerin ve atık suların göllere, nehirlere ve denizlere karıştığı iyi bilinmektedir. Bu nedenle, üretimi yapılan plastik ve yan ürünlerin de su ortamlarına karışması kaçınılmazdır. Plastikleştirici maddeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik bozunmaya karşı dayanıklı olmaları sebebiyle canlı vücudunda birikebilmekte ve besin zincirine de girerek toksik etkiler oluşturabilmektedirler. Bu çalışmada, dioktil adipat (DOA) ve dioktil ftalat (DOP) plastikleştirici maddelerinin larval zebra balıkları (*Danio rerio*, 72 saatlik) üzerine potansiyel toksik etkileri, stres gen (*p53*, *rad51* ve *xrcc5*) ekspresyonlarındaki değişimler eş zamanlı kantitatif PZR (RT-qPCR) tekniği kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca, DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin oluşturabileceği genotoksik etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, 0-200 mg/L aralığında DOA ve 0-150 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarının % 50'sini öldüren letal konsantrasyonlar sırasıyla $89,99 \pm 8,03$ mg/L ve $54,02 \pm 11,49$ mg/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak DNA zincir kırıkları tespit edilmiştir. DNA hasarının DOP'a (% 31,1) maruz bırakılan larvalarda, DOA'a (% 20,8) maruz bırakılanlara oranla daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Stres gen ekspresyon değişimlerinde ise önemli düzeyde bir farklılık görülmezken, yalnızca 10 mg/L DOP maddesine maruz bırakılan larvaların *xrcc5* gen ekspresyonunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak önemli derecede (5 kat) bir artış belirlenmiştir. Sonuçta oluşan düşük düzeyde toksik etkiler genel olarak benzerlik göstermekle birlikte, DOP'un DOA'a oranla larvalarda 1,5 kat daha toksik olduğu tespit edilmiştir.

2016, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: Dioktil Adipat, Dioktil Ftalat, DNA Hasarı, Gen Ekspresyonu, Zebra Balığı, Akut Toksikite.

ABSTRACT

TOXIC EFFECTS OF DIOCTYL ADIPATE AND DIOCTYL PHTHALATE USED AS PLASTICISER IN INDUSTRY ON ZEBRAFISH LARVAE

Serap TERZİ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN

It is a well-known fact that interference of the majority of industrial wastes and wastewater discharges into rivers, lakes and coastal waters. Therefore, contamination of the aquatic environment by the plastic industrial products and also by-products is inevitable. Also, due to their physical, chemical and biological degradation resistant, plasticisers can accumulate in the body and enter the food chain of living organisms and generate toxic effects. The present study compare potential toxic effects of dioctyl adipate (DOA) and dioctyl phthalate (DOP) plasticisers to larval (72 h post fertilization) zebrafish (*Danio rerio*) by analysing changes in expression levels of stress-related genes (*p53*, *rad51*, and *xrcc5*) by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Another objective was to assess genotoxicity of DOA and DOP plasticisers. The lethal concentrations for 50% mortality (LC₅₀) in larval zebrafish exposed (96 h) to 0-200 mg/L DOA and 0-150 mg/L DOP plasticisers were 89.99 ± 8.03 mg/L and 54.02 ± 11.49 mg/L, respectively. A concentration-dependent increase in DNA strand breaks was detected in blood cells from larvae exposed (96 h) to DOA and DOP plasticisers. DNA damage was higher in DOP (31.1%) than DOA (20.8%) plasticisers exposed larvae. While there were no significant differences in induction of stress-related genes in larvae exposed to plasticisers, there was only statistically significant increase (5 fold) in expression of *xrcc5* gene in larvae exposed to 10 mg/L DOP substance relative to control. The results of the study were shown that consisted low level toxic effects were generally similar in larvae exposed to plasticisers. However, DOP was 1.5 times more toxic than DOA in larvae.

2016, 52 pages

Keywords: Dioctyl Adipate, Dioctyl Phthalate, DNA Damage, Gene Expression, Zebrafish, Acute Toxicity.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLULAR DİZİNİ	IX
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Plastik Maddeler ve Kullanım Alanları	3
1.2.1. Polietilen (PE)	3
1.2.2. Polipropilen (PP)	4
1.2.3. Polistiren (PS)	5
1.2.4. Polietilen Tereftalat (PET)	6
1.2.5. Polivinil Klorür (PVC)	7
1.3. Endüstride Kullanılan Plastikleştirici Maddeler	8
1.4. Plastikleştirici Maddelerin Sucul Ekosistem Üzerine Etkileri	10
1.5. Akuatik Toksikoloji Deneyleri	11
1.6. Biyodenyelerde Deney Canlılarının Seçimi	13
1.7. Gen Ekspresyonu	14
1.8. DNA Hasarı (Comet Assay)	14
1.9. Önceki Çalışmalar	15
1.10. Çalışmanın Önemi ve Amacı	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Kimyasal Maddeler	19
2.2. Deney Canlıları	19
2.3. Test Solüsyonlarının Hazırlanması	20
2.4. Letal ve Subletal Toksikolojik Deneyler	21
2.5. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi	22
2.5.1. Dokudan RNA Eldesi	22

2.5.2.	Revers (Ters) Transkripsiyon	22
2.5.3.	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	23
2.5.4.	Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması	25
2.6.	Hücrel DNA Hasarının Tespiti (Comet Assay)	25
2.7.	İstatistiksel Değerlendirme	26
3.	BULGULAR	27
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR	36
5.	ÖNERİLER	41
	KAYNAKLAR	42
	ÖZGEÇMİŞ	52



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Polietilen kullanılarak üretilmiş plastik tanecikler ve malzemeler	4
Şekil 2.	Polipropilen maddesi kullanılarak üretilmiş tüketici ürünleri	5
Şekil 3.	Polistiren maddesinin kullanıldığı tüketici ürünleri	5
Şekil 4.	Polietilen tereftalat kullanılarak imal edilmiş malzemeler	6
Şekil 5.	Polivinil klorür plastik maddesinin tüketici ürünlerinde kullanımı	7
Şekil 6.	Dioktil adipatın (DOA) kimyasal yapısı	8
Şekil 7.	Dioktil ftalatın (DOP) kimyasal yapısı	9
Şekil 8.	Toksikolojik deneylerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (<i>Danio rerio</i>)	14
Şekil 9.	Larva temininde kullanılan anaç zebra balıkları için bakım üniteleri	19
Şekil 10.	Damızlık zebra balıklarından döl alımı ve embriyo aşamaları	20
Şekil 11.	Zebra balığı larvaları kullanılarak 3 tekerrür olacak şekilde hazırlanmış toksikolojik test üniteleri	21
Şekil 12.	Toksikolojik testlerde DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarının ölüm oranları	27
Şekil 13.	DOA ve DOP uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde Comet oluşumu. (a) Kontrol, (b) solvent kontrol (%1 etil alkol (v/v)), (c) Pozitif kontrol (1 µL/mL H ₂ O ₂), (d) 1 mg/L DOA, (e) 25 mg/L DOA, (f) 0,5 mg/L DOP, (g) 10 mg/L DOP	28
Şekil 14.	96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan larvalardaki DNA hasarları (% kuyruk DNA, Comet assay), P < 0.05	29
Şekil 15.	DOA plastikleştirici maddesinin subletal konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan larvalarda oluşan DNA hasarları. Solvent kontrol: %1 etil alkol (v/v), pozitif kontrol: 1 µg/mL H ₂ O ₂ , P < 0.05	30
Şekil 16.	DOP plastikleştirici maddesinin subletal konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan larvalarda oluşan DNA hasarları. Solvent kontrol: %1 etil alkol (v/v), pozitif kontrol: 1 µg/mL H ₂ O ₂ , P < 0.05	30
Şekil 17.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOA'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki stres gen ekspresyon değişimleri	31
Şekil 18.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOA'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri	32
Şekil 19.	Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki stres gen ekspresyon değişimleri	33

Şekil 20. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri	34
Şekil 21. Toksikolojik testlerde DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarında üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması	34
Şekil 22. Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve plastikleştirici maddelere maruz bırakılan larvalarda görülen anormallikler. (a, b) Normal larvalar, (c, d) canlı fakat anormal larvalar; kan toplanması (mavi oklar), yüzme kesesi deformitesi (siyah oklar), ve spinal eğrilik oluşumu (kırmızı oklar), (e, f) plastikleştirici maddelere maruziyet sonucu ölmüş larvalar	35



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer sekansları	24
---	----



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat
DOA	Dioktil Adipat
DOP	Dioktil Ftalat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
LC ₅₀	Canlıların %50'sini Öldüren Letal Konsantrasyon
LMP	Düşük Erime Isılı Agaroz
NMP	Normal Erime Isılı Agaroz
mm	Milimetre
PVC	Polivinil Klorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
p53	Tümör Baskılayıcı Protein
rad51	DNA Onarım Proteini
RNA	Ribonükleik Asit
xrcc5	DNA Onarım Proteini
β -actin	Beta Aktin
μ m	Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Plastikler ilk kez 20. yüzyılın başlarında üretilmiş ve kullanımı hızla yaygınlaşmıştır (Vural, 1977). Günümüze dek hızlı bir gelişim süreci geçiren plastikler sahip oldukları birçok nitelik açısından diğer malzemelerden üstün hale gelmiş, otomotiv, elektronik ve haberleşme başta olmak üzere birçok alanda kullanılan malzeme cinsi olmuştur. Plastikten üretilmiş ürünler en yeni malzeme türlerinden olmasına rağmen, gündelik yaşamımızda en fazla kullanılan malzemeler haline gelmiştir. Plastiklerin özelliklerinin ve çeşitliliklerinin çok geniş bir aralıkta değişmesi, kısa sürede kullanımlarını yaygınlaştırmış ve ekonomik önem kazandırmıştır (Yaşar, 2001).

Günümüzde geniş uygulama alanı ve düşük maliyeti ile plastik sanayinde en çok kullanılan polimer polivinil klorür (PVC) dür (Xu vd., 2006; Marcilla vd., 2008). PVC; malzeme özelliği, doğasından gelen alev geciktiriciliği, ısı kararlılığı, ekonomikliği ve ürün başarımı gibi nedenlerle birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Basfar, 2002; Marcilla vd., 2008). 50 yılı aşkın bir süredir plastikleştiricilerin gelişmesi ile, PVC en önemli plastiklerden biri haline gelmiştir (Marcilla vd., 2004). PVC; profil, film, levha ve şişe olarak çeşitli sektörlerde pek çok uygulama alanı bulmaktadır. Uygulama alanlarının %34'e varan kısmını esnek PVC olarak adlandırılan plastikleştirilmiş PVC (p-PVC) ürünler oluşturmaktadır (Brebü vd., 2000). Polimerlere eklenen katkılar polimer özelliklerini değiştirmeye ya da polimerin ömrünü uzatmaya yöneliktir (Wensing vd., 2005). Plastikleştirici kullanımı, PVC'nin camsı geçiş sıcaklığını düşürerek esnek ürünler üretiminde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. PVC ve ısı kararlı kılıcılarının çevreye ilişkin olumsuzlukları büyük ölçüde çözümlenebilmişken, plastikleştiricilere ilişkin çevresel sorunları çözüme ulaştırabilmek için çalışmalar sürmektedir.

Plastik malzemeler, oda sıcaklığında genellikle katı halde bulunan, basınç ve ısı yardımıyla ve mekanik yöntemlerle şekillendirilebilen veya kalıplanabilen organik yapıdaki polimerik maddelerdir. Plastik malzemeler genel olarak iki ana sınıfa ayrılırlar. Bunlar; termoplastikler ve termosetlerdir. Termoplastikler; ısı ve basınca maruz kaldıklarında plastik özelliklerini koruyabilen plastikler olup, ısı ve basınç uygulayarak

tekrar şekil kazandırılabilirler. Bu özellik bir mumun eritilip, kalıplandıktan sonra soğutulup başka bir şekle sokulmasıyla benzer şekildedir. Termoplastiklerin kullanım süreleri, malzemenin yorgunluğuna göre değişir ve kendi ağırlıkları altında 55°C ile 120°C arasında, bazen de yapılarına bağlı olmakla birlikte 260 - 270°C'ye varan sıcaklıklarda bozunmaktadırlar. Bu nedenden dolayı termoplastiğin işlenmesi esnasında sıcaklık dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir (Aydın, 2004). Termoplastiklere örnek olarak polietilen, polistren ve polipropilen gösterilebilir.

İnşaat sanayi başta olmak üzere kablo, ambalaj ve boru üretimi, kozmetik, sağlık sektörlerinde ve ayrıca kompozit yakıtlarda geniş kullanım alanına sahip bir polimer olan PVC üretiminde, ikincil plastikleştirici madde olarak en çok kullanılan bağlayıcı maddelerden ikisi, ftalat grubuna giren dioktil adipat (DOA) ve dioktil ftalat (DOP) dir. Ftalatlar kararlı maddelerdir, ısı ve sürtünme nedeniyle serbest hale geçerek canlı organizmaların vücuduna girebilirler. Bu maddelerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerine yönelik veriler oldukça düşük düzeydedir. Su piresi *Daphnia magna* kullanılarak yapılan çalışmalarda akut ve kronik toksisite değerleri belirlenmiş olmasına karşın, bu plastikleştiricilerin çevreye verebileceği zararlar konusunda, balıklar ve algler için akut toksisite oluşturmayacağı ve güvenli bir kullanım alanına sahip olduğu şeklinde, iyimser denilebilecek bir görüş ortaya konulmaktadır (Felder vd., 1986; Anonim, 2006). Söz konusu maddelerin etanol, metanol, dietil eter, n-oktanol ve asetonla çözünebilirken suda çözünmediğini öne süren ticari raporlara rağmen, Çevre Koruma Ajansı (EPA) kayıtlarında bu maddeler için suda az da olsa bir çözünürlük değeri verilmektedir. EPA kayıtlarına göre bu maddelerin ratlar için verilen LD₅₀ değerleri 5600-45000 mg/kg olarak, yüzey sularında bulunabilecek değer olan 0.5 µg/L'nin çok üstündedir. Bu maddelerin genotoksik olmadıkları belirtilmekle birlikte memeli hayvanlarda dölleme, üreme ve gelişimde bazı olumsuz etkiler oluşturabileceği fakat insanlar için ise kanserojenik veya mutajenik olmadıkları belirtilmektedir. Ancak kullanımı sırasında nefes yoluyla alınmasından, deriyle ve gözle temasından kaçınılması gerektiği şeklinde ve ayrıca kronik olarak maruz kalma durumunda zayıflamaya sebep olabileceği, kemik yoğunluğunda azalma, testis ve karaciğer hasarları oluşturabileceğine dair uyarılar yapılmaktadır (Anonim, 2006).

İkincil plastikleştiriciler olarak adlandırılan bu maddelerin buzdolabı sıcaklığı olan 4°C'de bile besinlere geçebildiği (Goulas ve Kontominas, 1996) ve geçişimin sıcaklıkla arttığı bildirilmiştir (Fouad vd., 1999). Bu maddelerin ayrıca, bazı deney hayvanlarının üreme sisteminde baskılanmaya; insanlarda ise solunum problemlerine, göğüs kanseri ve infertiliteye neden olabileceği bildirilmektedir (Anonim, 1999). Plastik üretim atıkları doğrudan ya da dolaylı olarak denize deşarj edilip besin zincirine girebilir. Bu çalışmada, özellikle sucul ortamda yaşayan canlılara etkisi neredeyse bilinmeyen DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin hem moleküler toksikolojik çalışmalarda, hem de akvaryum balıkçılığında yaygın şekilde kullanılan zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının genetik yapısında neden olabileceği toksik etkiler araştırılmıştır.

1.2. Plastik Maddeler ve Kullanım Alanları

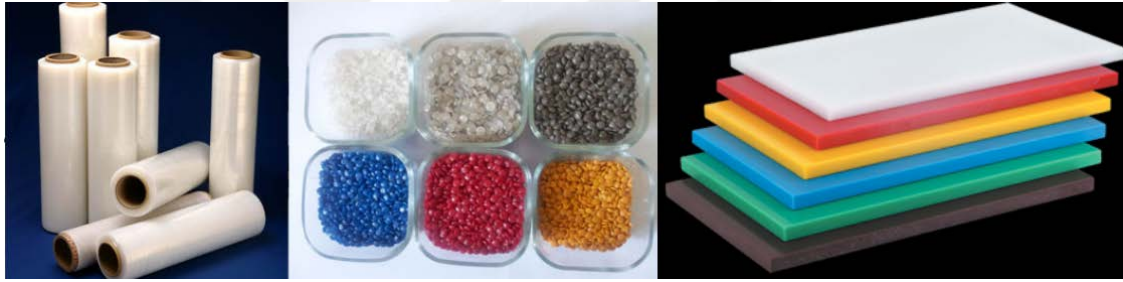
Zaman içerisinde bilim ve teknolojiye meydana gelen ilerlemeler, ilk zamanlarda çok az olan malzeme kullanımını, hem malzemelerin çeşitliliklerini hem de değer ve kalitelerini yükseltmeleri doğrultusunda hızlı bir şekilde arttırmıştır. Uzun bir süre boyunca kullanılan metal, odun ve seramik gibi malzemelerin yanında plastikler ancak 20. yüzyılın başlarında tanınmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze dek hızlı bir gelişim süreci geçiren plastikler sahip oldukları birçok nitelik açısından diğer malzemelerden üstün hale gelmiş, otomotiv, elektronik ve haberleşme başta olmak üzere birçok alanda kullanılan malzeme cinsi olmuştur (Yaşar, 2001).

1.2.1. Polietilen (PE)

Etilen monomerinin polimerizasyonu işlemiyle oluşan, uzun zincirli bir yapıda olan makromoleküllü polimer, polietilen olarak isimlendirilmektedir. Polietilen bir homopolimerdir. Polietilen; yüksek darbe ve kimyasal dayanımı, aşınma direnci düşük sürtünme katsayısı, su geçirmeme, geniş çalışma ısısı, kendinden yağlama özelliği, mekanik işlemede kolaylık, kolay temizlenebilme ve antibakteriyel gibi özellikleri nedeniyle birçok sektörde kullanılmaktadır. Makine endüstrisinde; kızak ayakları, sürtünme plakaları, dişli çark üretiminde, kömür ve maden endüstrisinde; bunker, tank ve siloların kaplanması, kağıt endüstrisinde vakum kasası örtüsü, hidrofolyo kasası olarak, gıda ve ambalajlamada; et ve balık işleme masası olarak kullanılmaktadır

(Yılmaz, 1998). Tarihte ilk üretilen polietilen, alçak yoğunluklu polietilen olarak adlandırılan AYPE'dir (Ezdeşir vd., 1999). Düşük yoğunluklu polietilen, polietilenin yüksek basınç süreci (1600 atm ve 200 °C'de tüp reaktörlerde) ile üretilmesiyle elde edilmektedir. AYPE filmler parlak ve maliyeti düşük olmakla birlikte işlenmesi kolaydır. Bu filmlerin kullanım alanları; inşaat örtüsü, yiyecek paketleme, çöp ve gübre poşetleri ve kimyasal madde üreticileri tarafından kullanılan dayanıklı poşetlerden oluşmaktadır (Keskin, 1996).

Günümüz plastikleri içerisinde en fazla üretim oranına sahip olan polietilenin toplam üretimi plastiklerin üretiminin % 40'ını oluşturmaktadır. Birçok plastik işleme yöntemiyle şekillendirilebilen polietilen; film, levha, profil v.b. ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. (Ezdeşir vd., 1999) (Şekil 1).



Şekil 1. Polietilen kullanılarak üretilmiş plastik tanecikler ve malzemeler.

1.2.2. Polipropilen (PP)

Polipropilen, doymamış veya az doymuş lineer bir hidrokarbon polimer olup, izoaktik ve ataktik olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. İzoaktik polipropilen kristal yapıya sahip polimer, ataktik polipropilen ise kristal olmayan katı yapılar olup yapısı gelişigüze'dir. Polipropilenin nitelikleri molekül ağırlığına bağlı olarak da değişebilmektedir. Düşük molekül ağırlığı olan sert ve kırılğan, molekül ağırlığı yüksek olan polipropilen ise yumuşaktır. Yüksek molekül ağırlığı olan polimerin ergime sıcaklığı yüksektir. Düşük molekül ağırlığı olan polimerler ise daha akıcı ve yapısal özellikleri daha sağlamdır. Isı ve ışığın etkisiyle kolayca bozunabilir ve kolay bir şekilde renk verilemez. Su absorpsiyonu ve geçirgenliği düşüktür. Günümüz dünyasında 150'den fazla üretilmiş polipropilen çeşidi bulunmaktadır. Polipropilenin bu kadar fazla türde üretilmesi, beraberinde polipropilenin kullanım alanlarını da oldukça geliştirmiştir.

Polipropilen, çeşitli ev aletleri, ev eşyası, paketleme filmi, otomobil yedek parçası, tel ve kablo kaplamalarında, gıda ambalajlanmasında, kaplama ve laminasyon malzemesi olarak, yer döşemesi ve halı üretiminde, çuval lifi ve halat üretiminde, akü kabı üretiminde, meşrubat şişesi kasalarında, laboratuvar malzemeleri yapımında, oyuncak üretiminde, radyatör ızgaralarında, sentetik çim üretiminde, plastik boru yapımında, mühendislik plastiklerinin uygulamalarında, optik ve elektrik malzemelerin üretiminde, halı, keçe, paspas, profil, levha ve ilaç ambalaj endüstrisinde kullanılmaktadır (Ezdeşir vd., 1999) (Şekil 2).



Şekil 2. Polipropilen maddesi kullanılarak üretilmiş tüketici ürünleri.

1.2.3. Polistiren (PS)

Ticari anlamda ilk polistiren üretimi Amerika Birleşik Devletleri'nde 1938 yılında gerçekleştirilmiştir. Stiren monomerinin polimerizasyonu sonrasında elde edilen polimer, genel amaçlı polistiren olarak da adlandırılır. Polistiren polimerinin kullanım yerleri, gıda ambalajı, radyo ve televizyon kabinleri, teyp ve video kasetleri, buzdolabı parçaları, dekoratif yapı malzemeleri, masa, sandalye, mobilya, mutfak gereçleri ve oyuncak sanayidir (Yaşar, 2001) (Şekil 3).



Şekil 3. Polistiren maddesinin kullanıldığı tüketici ürünleri.

1.2.4. Polietilen Tereftalat (PET)

Polietilen tereftalat (PET), termoplastik polyester reçinesi özelliğinde bir ambalaj malzemesidir. Polyester kelimesi Yunanca pek çok anlamına gelen “poly” ve asitlerin alkollere etkisiyle elde edilen bir bileşik olan “ester” kelimelerinden türemiştir. PET; polyester; alkol, etilen glikol (EG), asit ve tereftalik asit (TPA)’ten oluşmuştur ve kimyasal ismi polietilen tereftalattır (Plastics Europe, 2008).

PET’i oluşturan hammaddeler ham petrolden elde edilir. Rafine işlemlerinden sonra, ham petrol çeşitli petrol ürünlerine dönüştürülür ve sonuçta iki tane PET hammaddesi elde edilir. Bu hammaddeler artıldıktan sonra, bir katalizör yardımıyla kanal şeklindeki bir fırında 300 °C’ye kadar ısıtılır. Kimyasal reaksiyon sırasında oluşan çok sayıdaki tekil moleküller (monomerler) birbirleriyle ester bağlarıyla birleşerek polimerleri oluştururlar. Reaksiyonlar ilerledikçe karışım oldukça koyu bir kıvama gelmeye başlar ve sonunda uygun bir kıvama ulaşır. Bu aşamada, reaktörden makarnaya benzer şekilde çıkan PET çubuklar su altında hızlı bir şekilde soğutulur ve sonra küçük tanecikler halinde kesilir. PET’in içecek şişesi olarak kullanılacağı durumlarda, içlerinde bulunan bazı yabancı maddelerin damıtılması ve fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla, bu katı tanecikler erime noktasının altındaki değerlere kadar ısıtılır. PET, farklı çeşitleri var olan filmler, manyetik kayıt filmleri, X-ışını filmleri, fotoğraf filmleri ve pekçok ambalaj malzemesi yapımında kullanılan plastik bir üründür. Tekstil sanayinde halıların arka yüzlerinin kaplanmasında ve battaniye yapımında da kullanım alanı bulmaktadır. Gıda endüstrisinde özellikle de yağ ve içecek şişelerinde ambalaj malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Plastics Europe, 2008) (Şekil 4).



Şekil 4. Polietilen tereftalat kullanılarak imal edilmiş malzemeler.

1.2.5. Polivinil Klorür (PVC)

Polivinil klorür (PVC), kristal özellik göstermeyen plastiklerin başında gelir. PVC açık sarı veya beyaz renkli toz polimeridir. Normal PVC içerisinde %53-55 oranında klor bulunur. PVC'yi 60°C sıcaklığa kadar işlemek mümkündür (Aydın, 2004). PVC, geniş uygulama alanı ve düşük maliyeti ile plastik sanayinde en çok kullanılan polimerdir (Xu vd., 2006; Marcilla vd., 2008). Toz PVC polimeri işlenirken, sıcaklık artışı ile PVC'den hidrojen klorür ayrılması ve polienlerin oluşumu yoluyla süreç sırasında bozunur (Egbuchunam vd., 2007). Son ürün özelliklerinin iyileştirilmesi için PVC'ye plastikleştirici ve diğer katkı maddeleri ilavesi ile plastisol elde edilir. Plastisollerin uygun sıcaklıkta jelleşmesi sırasında moleküler bir polimer-plastikleştirici karışımı vermek üzere plastikleştiricinin polimer içinde yayınması ile kauçuksu, sağlam ürünler elde edilir. İşleme sürecinde PVC'nin bozunmasını önlemede kullanılan Ca^{+2} ve Zn^{+2} esaslı, sinerjik etkili ısıl kararlı kılıcı karışımları sağlığa zararlı değildir (Ulutan vd., 2006).

PVC'nin sert ve esnek olarak iki çeşit kullanımı vardır. Sert PVC daha çok duvar kaplamaları, boru, pencere profili vb. alanlarda kullanılmaktadır. Bu malzemelerin hava şartlarına dayanıklılık, yüksek mukavemet, sert ve kendi kendine yanmazlık gibi özellikleri bulunmaktadır. Esnek veya yumuşak PVC çeşitleri ise daha çok oyuncak ve eldiven yapımı, kablo sanayi ve yer döşemeleri üretiminde kullanılmaktadır. PVC'nin düşük ısı kararlılığına sahip olması, ısıtıldığı zaman metal yüzeylere yapışma özelliğinin yüksek olmasını sağlamaktadır. Hava şartlarına yüksek dayanıklılık göstermesi, kolay işlenebilmesi, metal yüzeylere tutunma özelliğinin olması ve iyi elektriksel özelliklerinin bulunması nedeni ile PVC, kablo imalatında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Aydın, 2004) (Şekil 5).

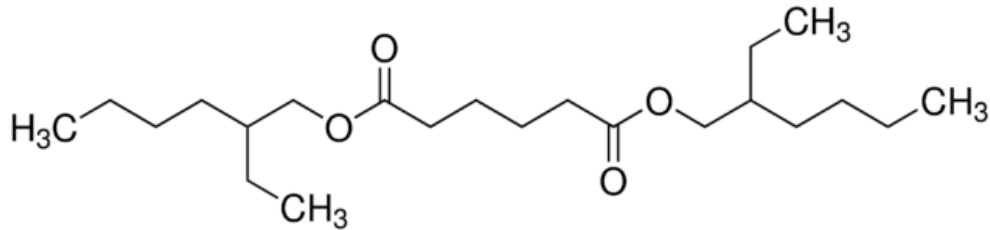


Şekil 5. Polivinil klorür plastik maddesinin tüketici ürünlerinde kullanımı.

1.3. Endüstride Kullanılan Plastikleştirici Maddeler

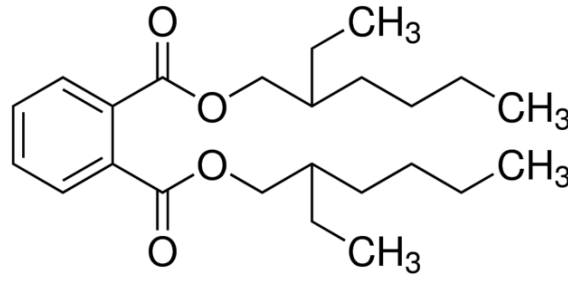
Plastikleştiriciler, polimer reçinesine eklendiğinde polimerin esneklik, işlenebilirlik gibi bazı özelliklerini iyileştiren düşük molekül ağırlıklı, sentetik organik moleküllerdir. Genellikle organik madde içeren, yüksek kaynama noktasına sahip, düşük erime noktalı ve yüksek molekül ağırlıklı sıvılar veya katılardan oluşmaktadır. En yaygın kullanılan plastikleştiriciler fosforik asit esterleri ve karboksilik asitler (Marcilla vd., 2008).

Genel amaçlı plastikleştiricilerden olan ve ftalik asit diesterleri (benzen 1,2-dikarboksilik asit) olarak bilinen ftalatlar, uzun zincirli alkoller ile ftalik anhidritin esterleşmesi ile üretilirler (Cadogan, 2002). Ftalatlar ve adipatlar, özellikle dioktil ftalat (DOP) olarak adlandırılan dietil-hegzil ftalat (DEHP), di-izononil ftalat (DINP), di-izodesil ftalat (DIDP) ve dioktil adipat (DOA) (Şekil 6), PVC uygulamalarında en çok kullanılan (Cano vd., 2002) ve polimerle uyumluluğu ve kattığı özellikler kayda değer ölçüde olduğu için “birincil etkili” grubundan plastikleştiricilerdir (Marcilla vd., 2004; Kurt-Çömlekçi, 2011).



Şekil 6. Dioktil adipatın (DOA) kimyasal yapısı.

Ftalatlar ilk olarak 1926’da PVC katkı maddesi olarak kullanılmıştır ve günümüzde de oldukça yaygın ve önemli bir katkı maddesi olarak plastik içeren hemen hemen her araç ve gereçte bulunmaktadır. DOP, yıllardır (Şekil 7) PVC sanayinde kullanılan genel amaçlı plastikleştiriciler içinde, endüstri standardı olarak işlem görmektedir ve diğer plastikleştiriciler için de bir referans olarak değerlendirilmiştir (Oehlmann, vd., 2009).



Şekil 7. Dioktil ftalatın (DOP) kimyasal yapısı.

DOP, ucuz olması, piyasadan kolayca sağlanabilmesi, uçuculuğunun ve sudaki çözünürlüğünün düşük olması yönleriyle en yaygın kullanılan plastikleştiricidir. Bununla birlikte ftalatlar, özellikle DOP, ürünlere kimyasal olarak bağlanmadıkları ve düşük molekül ağırlıklarından dolayı değme ortamlarına (gaz, sıvı veya katı) kolayca göç ederek, bu ortamların kirlenmesine yol açarlar (Goulas vd., 2007; Zygoura vd., 2007). Bu sorun ftalatlara seçenek olabilecek plastikleştiricilerin geliştirilmesi ve kullanımı konusunu gündeme getirmiştir.

Plastiklerin ısı ve basınçla biçimlendirilmesini kolaylaştırmak, esnekliğini artırıp kırılgenliğini azaltmak amacıyla kullanılan plastikleştiriciler hareket halindeki küçük moleküllü katkı maddeleridir ve dış ortama, özellikle de temas halinde oldukları besinlere geçebilirler (Vural, 1977). Plastikleştirme, polimere kimyasal bağlanma olmayan plastikleştiriciler ile yapıldığında kaçınılmaz olarak temasta buldukları ortama göç olgusu gerçekleşir ve göçün olduğu ortam kirlenir (Goulas vd., 2007; Zygoura vd., 2007). Plastikleştiricilerin çevremizdeki yayılımını etkileyen en önemli faktörler; plastikleştirici türü, molekül ağırlığı, polimer ile uyumu, derişimi, plastikleştirme süreci ve taşınma koşullarıdır. Polimer plastikleştirici uyumu arttıkça göç miktarı azalır. Polimerin plastikleştirici ile uyumu bu ikisinin karışabilirliğini belirler ve uyum, çözünürlük parametresi ile öngörülebilir (Kurt-Çömlekçi ve Ulutan, 2010).

Plastikleştirici göçü, son ürünün dış görünüşünü bozmakta ve çevresel sorunlar, gıda kirlenmesi (Wormuth vd., 2006), oyuncak uygulamalarına uygun olmayış (Marcilla vd., 2004) gibi nedenlerle ürünün ticarileştirilmesini kısıtlamaktadır. Bilimsel kaynaklarda esnek filmlerden, oyuncak, conta, kan ve serum torbası gibi malzemelerden gıdaya, gıda ve salya eşdeğeri ortamlara plastik göçüne ilişkin çok sayıda çalışma

bulunmaktadır (Zygoura vd., 2007; Ekelund vd., 2008). DOA'nın buzdolabı sıcaklığında 4°C'da bile besinlere geçebildiği (Goulas ve Kontominas, 1996) ve geçişimin sıcaklıkla arttığı bildirilmiştir (Fouad vd., 1999).

1.4. Plastikleştirici Maddelerin Sucul Ekosistem Üzerine Etkileri

Plastikleştirici maddeler, kullanım alanlarının çok olması ve kalıcı özellik göstermelerinden dolayı çevrede yaygın şekilde bulunabilmektedirler. Dünyada, esnek PVC ve bazı plastiklerin üretiminde her yıl milyonlarca ton ftalat kullanılmaktadır. Bunun sonucunda çevreye ve insan sağlığına olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır. Yanma sonucunda dioksin ve furan gibi zehirli gazlar oluşturan ftalatların birçok canlı türünün genetik yapısı ve üreme kabiliyeti üzerinde zararlı etkilerinin ortaya çıkmasından sonra ABD ve birçok Avrupa ülkesinde son 20 yıldan beri kullanımları kısıtlanmıştır. Son zamanlarda katı atıklar, atık sular, yüzey suları ve sediment örnekleriyle yapılan araştırmalar sonucunda plastikleştirici maddelerin hala önemli bir kirletici olduğu tespit edilmiştir (Ballschmiter ve Zell, 1980; Travis ve Hester, 1991; Quingyu vd., 2001; Anonim, 2009). Çok sayıda kaynaktan ortaya çıkabilen plastikleştirici maddelerin önemli bir bölümü genellikle doğrudan akarsular, göller ve kıyı suları gibi su sistemlerine deşarj edilmektedir. Son zamanlarda özellikle iç ve kıyı suları olmak üzere sucul çevrenin yoğun bir şekilde plastik malzeme atıklarıyla kirletildiği görülmektedir. Bu yüzden de plastik kaynaklı kirlenmeden dolayı oluşan çevresel problemler, daha çok sucul çevredeki biyolojik dengenin olumsuz etkilenmesi ve su ürünlerinin kirlenmesi şeklinde kendini göstermektedir (Şişman, 2007).

Plastikler ve plastikleştirici maddeler bozunmaya karşı yüksek seviyede direnç gösterdikleri için çevrede uzun süre kalabilmektedirler. Bu maddeler suda çözünme özelliği göstermezken, yağda çözünürlüklerinin çok yüksek seviyede olması nedeniyle canlı vücudunda, özellikle yağ dokularında birikebilirler. Plastikleştirici maddelerin kuş ve deniz memelilerinin üreme sistemleri üzerine zararlı etkileri araştırılmış ve sucul ekosistem üzerinde bazı problemler oluşturabileceği tespit edilmiştir (Anonim, 2009). Sucul çevrede yaşayan canlılar üzerindeki toksik etkileri ve insanlarda da kanserojenik etki oluşturabilme potansiyelleri, bu bileşiklerin daha fazla dikkate alınmasını gerekli hale getirmiştir (Alkhatib ve Weigand, 2002). Plastikleştiriciler çevrede olduğu gibi sucul

canlı vücudunda da birikim oluşturabilmektedir. Lipofilik yapılarından dolayı yağlı balıklarda yağsız balıklara oranla daha yüksek düzeylerde bulunabilmektedir (Mozaffarian vd., 2006). Plastikleştirici maddeler sazan balıklarında testosteron, östrojen ve kortizol salgılanmasını baskılamakta ve yumurtlamayı geciktirebilmektedir (Bengtsson, 1980). Bazı balık türleri (*Cyprinus carpio*, *Aconthobrama marmid*, *Chandrostoma regium*, *Siluris glanis*) kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada plastikleştirici maddelerin seviyeleri irdelenmiş ve çalışma sonucunda balıkların karaciğer ve kas dokusunda daha fazla birikime neden oldukları belirlenmiştir (Erdogru vd., 2005). Sucul çevrede temiz ve yoğun kirliliğin olduğu alanlardan alınan balık örneklerinde dokulardaki plastikleştirici madde konsantrasyonları karşılaştırılmış, kirliliğin yoğun olduğu bölgelerden örneklenen sazan balıklarının kas dokularında yüksek oranda bu maddelerden bulunduğu tespit edilmiştir (Verweij vd., 2004). Diğer bir çalışmada, , plastikleştirici maddelerin subletal konsantrasyonlarının zebra balığında embriyolojik gelişimde yavaşlamaya, kalp ve perikardiyal alanda daralmaya, kan dolaşımında azalmaya, yumurtadan çıkan larva sayısında düşmeye, teratojenik etkilere ve ölümlere sebep olduğu ortaya konulmuştur (Şişman, 2007).

1.5. Akuatik Toksikoloji Deneyleri

Canlı organizma hücrelerinde kimyasal maddelere maruz kalma nedeniyle önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin tespit edilmesi ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik araştırmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978). Toksikolojik deneyler, sadece kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymak için değil, bu maddelerin zehirlilik etkilerinin görülmeyeceği konsantrasyon değerlerini belirlemek için de yapılmaktadır. Toksikolojik testlerde uzun süreli madde maruziyetine bağlı zehirlilik etkileri belirlenecek ise, deneyin gerçekleştirildiği süre içerisinde de aynı özellikteki kimyasal maddelerin, su miktarlarının ve test şartlarının uygulanması gerekmektedir (Altınok vd., 2011). Ayrıca, beklenen zehirlilik etkisinin belirlenmesine yönelik deneylerde, bu etkiye neden olduğu bilinen bir kimyasalın, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin doğru işleyip işlemediğinin de test edilmesi gerekmektedir (Saygi vd., 1991; CPMP, 2000).

Toksikolojik deneylerde kullanılan deney canlıları artan miktarlarda toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak bu maddelerin canlılar üzerindeki etkileri araştırılır. Bu araştırmalarda; ölümler, üreme ve denge bozuklukları, gelişme durumları, yüzme yetenekleri, histolojik ve biyokimyasal değişimler ve organların aktiviteleri gibi faktörler incelenir. Testlerde kullanılan materyal tek bir kirletici olabileceği gibi birden fazla madde içeren kompleks bir karışım da olabilir (APHA, 1992; Laufer ve Nation, 1999). Toksikolojik deneylerde aynı özelliklere sahip canlılar, farklı miktarlarda toksik maddeye maruz bırakılmaktadır. Toksik madde dışındaki faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması bakımından testlerde ayrıca kontrol grubu kullanılır (EPA, 1993; Ünsal, 1998).

Zehirlilik deneyleri; testin süresine, test ortamına, toksik madde ilavesine ve amaçlarına göre sınıflandırılmaktadır. Test sürelerine göre yapılan sınıflandırmada testler, akut ve kronik olmak üzere iki şekilde gruplandırılır. Akut toksikolojik testler, deney süresi 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimleri kullanılarak yapılmaktadır. Deney süresi, deneyde kullanılacak canlı türüne göre de değişiklik göstermektedir. Bu süre boyunca kullanılan organizmanın büyüme ve gelişimi de göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik testlerde deney süresi bir hafta ile bir ay arasında olabilir veya daha uzun süreler de kullanılabilir. Bu test türünde genellikle farklı toksik madde miktarlarının organizmaların üreme ve gelişmeleri üzerine etkileri incelenmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998). Toksikolojik deneyler, kirletici ilavesine göre statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olacak şekilde üç gruba ayrılmaktadır. Statik testlerde deneye tabi tutulacak organizmalar uygun bir düzenek içerisinde hazırlanmış deney ortamına konur ve deney süresi boyunca herhangi bir değişiklik yapılmaz. Bu deneylerde metabolizma sonucu oluşan atıkların su kalitesinde meydana getireceği olumsuzlukları gidermek amacıyla genellikle 96 saatlik süre tercih edilmektedir. Yarı statik toksik testlerde, deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenmekte olup, bu zaman aralıkları toksik madde ve deneyde kullanılan organizma türüne göre değişmektedir. Bu test türünde genellikle farklı zaman dilimleri tercih edilmektedir. Bu sayede, statik testlerde metabolizma atıkları ve diğer bazı nedenlerden kaynaklanan su kalitesindeki değişimlerin olumsuz etkileri ortadan kaldırılmış olmaktadır. Sürekli akış sistemli testlerde ise, deney ortamı devamlı olarak yenilenir ve deney süresince su kalitesinde metabolizma atıkları nedeniyle

herhangi bir değişiklik meydana gelmez. Bu testler doğal ortam şartlarını en iyi şekilde temsil eden deney sistemleridir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Zehirlilik testleri, toksik maddelerin zararlı etkilerini ve su kalitesini belirlemek, atıkları ve bu atıkların boşaltıldığı alanları izlemek, gıda zincirinin üst seviyesindeki canlıları korumak, insanlar tarafından tüketilen su ürünlerinin sağlık açısından zararlı olup olmadıklarını belirlemek ve toksik maddelerin organizmalar üzerindeki uyarıcı etkilerini ve biyolojik birikimini gözlemlemek için yapılmaktadır. Ayrıca, farklı toksik maddelerin canlı organizmalara olan etkilerini karşılaştırmak ve bu toksik maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da bu testler yaygın şekilde gerçekleştirilmektedir (Nowak, 1992; Arnold vd., 1996; Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

1.6. Biyodeneyleerde Deney Canlılarının Seçimi

Toksikolojik deneylerde kullanılacak olan canlılar mümkün olduğunca ekosistemi temsil edebilecek yerli türler olmalıdır. Seçilecek olan bu türün ekolojik ve ekonomik öneme sahip olması ve teminin de kolay olması gerekmektedir. Tür içi ve türler arasında duyarlılık farklılık gösterdiğinden mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığına sahip canlılar seçilmelidir. Bu türlerin laboratuvar koşullarına dayanıklılığının yüksek ve kültürlerinin de yapılabilir olması gerekir. Seçilecek türler en az bir ay süreyle laboratuvarında sağlıklı şartlarda muhafaza edilebilmelidir. Deney canlılarının biyolojilerinin, tuzluluk, pH ve sıcaklık isteklerinin önceden bilinmesi gerekir. Canlı organizmanın gıda zincirindeki düzeyi, ekonomik yönden önemi ve en hassas evresi bilinmelidir. Ayrıca, denemede kullanılacak organizmalar uygun boyda olmalıdır (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995; Atamanalp, 2004).

Sunulan bu tez çalışmasında deney canlısı olarak zebra balığı (*Danio rerio*) (Şekil 8) larvaları tercih edilmiştir. Çalışmamızda bu türün tercih edilme nedenleri; laboratuvar şartlarına uyum yeteneklerinin yüksek olması, genel fizyolojisi, genetik yapısı ve davranışlarının iyi bilinmesi, embriyonun dış ortamda gelişmesiyle tüm safhalarının izlenebilmesi ve değişiklik yapılabilmesi, birçok insan hastalık ve gelişim genleriyle benzer genler bulundurması, genetik analizler için uygun olması, insan genlerinin

karşılaştırmalı haritalanmasında kullanılması ve haftada yaklaşık birey başına 120-150 yumurta üretebilme kapasitesine sahip olmaları gibi özellikleridir.



Şekil 8. Toksikolojik deneylerde anaç olarak kullanılan zebra balıkları (*Danio rerio*).

1.7. Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu ya da gen ifadesi, DNA dizisi olan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi süreci için kullanılan bir terimdir. DNA’da bulunan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA) sentezi suretiyle kopyalanması (transkripsiyon) ve kopyalanan genetik bilgilerin bir protein molekülü haline dönüştürülmesi (translasyon) işlemlerinin tamamı gen ifadesi (ekspresyonu) olarak adlandırılır. DNA’nın farklı genlere karşılık gelen bölgelerindeki baz dizilimleri, o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit dizisini belirler. DNA’daki baz dizilimlerinin proteinin amino asit dizisini nasıl şifrelediği genetik ve biyokimyasal yöntemlerin birlikte kullanılması ile tespit edilmiştir (Yauk ve Berndt, 2007).

Gen ifadesinin en genel ölçüm amacı karşılaştırmadır. Farklı hücrelerdeki genlerin mRNA miktarlarını karşılaştırma, bir organ veya dokudaki tümör hücresiyle normal bir hücrenin karşılaştırılması, farklı sürelerle ilaç uygulanan veya zehirli kimyasallara maruz bırakılan canlıların genlerindeki ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması gibi amaçlarla yapılmaktadır (Suter vd., 2004).

1.8. DNA Hasarı (Comet Assay)

DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak sağlayan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını belirlemek ve miktarını tespit etmek için uygulanan hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. 1988 yılında “Alkali Comet Assay” olarak tanıtılmasından sonra çeşitli değişikliklerle geliştirilerek çok farklı tiplerde DNA hasarının belirlenmesinde kullanılır hale gelmiştir. Yaşlanma, moleküler epidemiyoloji, klinik ve genetik toksikoloji alanlarında önemli uygulamaları olan “Comet Assay” tekniği, son yıllarda giderek artan bir sıklıkta apoptozis, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında da yerini almıştır. İşlem basamakları; hücre süspansiyonunun ve mikroskop lamalarının hazırlanması, lizis işlemi, alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması, elektroforez ve nötralizasyon işlemi, DNA'nın boyanması ve cometlerin görüntülenmesi, comet sayımı ve DNA hasarının tespit edilmesi gibi aşamaları kapsamaktadır (McKelvey-Martin vd., 1993).

1.9. Önceki Çalışmalar

PVC, malzeme özelliği, doğasından gelen alev geciktiriciliği, ısıl kararlılığı, ekonomikliği ve ürün başarımı gibi nedenlerle birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Basfar, 2002; Marcilla vd., 2008). 50 yılı aşkın bir süredir plastikleştiricilerin gelişmesi ile, PVC en önemli plastiklerden biri olmuştur (Brebü vd., 2000; Marcilla vd., 2004). Uygulama alanlarının %34'e varan kısmını esnek PVC olarak adlandırılan plastikleştirilmiş PVC (p-PVC) ürünler oluşturmaktadır (Brebü vd., 2000). Dioktil ftalat (DOP) en çok kullanılan, ancak toksik etkilerinden dolayı son 20 yıldır çeşitli çevre ve sağlık örgütleri tarafından en çok karşı çıkılan plastikleştiricilerden biridir (Heudorf vd., 2007; Marcilla vd., 2008; Pant vd., 2008). İkincil plastikleştiriciler olan adipatlardan en yaygın kullanılanı ise dioktil adipat (DOA), özellikle ülkemizde PVC üretiminin esas girdilerinden biridir. DOA'nın buzdolabı sıcaklığında besinlere geçebildiği (Goulas ve Kontominas, 1996) ve geçişimin sıcaklıkla arttığı bildirilmiştir (Fouad vd., 1999). DOA, bazı deney hayvanlarının üreme sisteminde baskılanmaya; insanlarda ise solunum problemlerine ve göğüs kanserine neden olabilmektedir (Anonim, 1999).

Hayvanlar üzerindeki deneyler DOP ve DOA'nın özellikle üremeye ilişkin çeşitli sağlık sorunlarına neden olduğunu göstermektedir (Koch vd., 2003). Fareler üzerinde yapılan deneylerde maruz kalınabilecek derişimin çok üstünde dozlarda DOP spermle etkileşim yaparken, düşük derişimde kısa süreli etkileşimin üremeye olumsuz etki yapmadığı görülmüştür. DOP'un başka dokulardaki zararlı etkileri çok fazla çalışılmamış olsa da tiroid, böbrek ve kan ile etkileşime ilişkin çalışmalar yapılmıştır. DOP'un insanlarda kanser yapma potansiyeline ilişkin bir çalışma bulunmamakla birlikte, uzun süre yüksek doz DOP temasının farelerde karaciğer kanserine yol açması nedeniyle Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IACR) 2000 yılında insanlar için de kanserojen olabileceğine karar vermiştir (Koch vd., 2003). DOA ile hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ağızdan, temasla ve solumayla sınırlı zehirli etkisi olduğunu, cilt ve gözü tahriş ettiğini göstermiştir (Cho vd., 2008).

Son zamanlarda, katı atıklar, sediment, yüzey suları ve atık su örnekleriyle yapılan araştırmalar sonucunda plastikleştirici maddelerin halen önemli bir kirlilik sebebi olduğu tespit edilmiştir (Ballschmiter ve Zell, 1980; Travis ve Hester, 1991; Quingyu vd., 2001; Anonim, 2009). Plastikler ve plastikleştirici maddeler parçalanmaya karşı yüksek seviyede dayanıklılık gösterdikleri için sucul çevrede uzun süre kalabilmektedirler. Bu maddelerin suda çözünme özellikleri olmamasına rağmen, yağda kolayca çözünebilmeleri canlı organizmaların yağ dokularında birikim oluşmasına neden olmaktadır. Bazı sucul organizmaların üreme sistemleri üzerine plastikleştirici maddelerin muhtemel etkileri araştırılmış ve sucul çevre üzerinde bazı problemlere neden oldukları tespit edilmiştir (Anonim, 2009).

Plastikleştiriciler çevrede olduğu gibi sucul organizmaların vücudunda da birikim oluşturma potansiyeline sahiptir. Yağda çözünme özelliklerinden dolayı yağlı balık dokularında yağsız balıklara nazaran daha yüksek oranda bulunabilmektedirler (Mozaffarian vd., 2006). Birkaç farklı balık türü kullanılarak yapılan bir çalışmada plastikleştirici maddelerin seviyeleri irdelenmiş ve çalışma sonucunda balıkların özellikle kas ve karaciğerlerinde birikimin daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Erdogrul vd., 2005). Bir su kaynağında, temiz ve aşırı kirliliğin olduğu alanlardan yapılan balık örneklemelelerinde, dokulardaki plastikleştirici madde konsantrasyonları araştırılmış,

yüksek oranda kirliliğin olduğu bölgelerde yakalanan sazan balıklarının dokularında yüksek miktarda bu maddelerden bulunduğu ortaya konulmuştur (Verweij vd., 2004).

Yapılan tüm çalışmalar plastikleştirici maddelerin, çevreye ve insan sağlığına etkileri yönünden dikkatle izlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bu doğrultuda Avrupa ve Amerika’da çeşitli uzmanlık panellerinde plastikleştiricilerin risk değerlendirmesi yapılmıştır. 2008 yılında DOA ve DOP, insan üremesinde zehirli etkisi olan maddeler olarak “Çok Yüksek Önem Arz Eden Maddeler” (Substances of Very High Concern; SVHC) listesinde 14 madde arasına alınmıştır (Koch vd., 2003). Ayrıca, bu maddelerin yılda 1 tonu aşan miktarının özel onayla kullanılması ve bunların yerine geçecek zararsız olanlarının saptanması için yapılacak Ar-Ge çalışmalarının desteklenmesi gerektiği not edilmiştir (AB Direktifleri, 2007). Dünya genelinde tüm bu farkındalıklar artarken son yıllarda DOP’un yerini alacak ve PVC uygulamalarında genel amaçlı olarak kullanılacak plastikleştiriciler önerilmiştir. Doksanların sonuna kadar PVC’de başlıca DOP kullanılırken, 2000’lerde bunların yerini farklı plastikleştiriciler almıştır (Wensing vd., 2005).

1.10. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Plastik ve plastikleştirici maddelere maruz kalma konusunda risk altında bulunan ortamlardan biri de özellikle su kaynakları ve sucul ortamlardır. Plastikleştirici maddelerin su ortamındaki davranışları, sucul organizmalar tarafından vücuda alınma kapasitesi ve sucul canlılarda oluşturabileceği potansiyel toksik etkileri konusunda günümüze kadar yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Plastikleştirici maddelerin çevremizde oluşturabileceği risklerin belirlenebilmesi için öncelikle sucul canlılar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, plastikleştirici maddelerin sucul canlılardaki toksisite mekanizmalarını tespit edebilmek için oksidatif stres nedeniyle oluşabilecek DNA hasarları ve stres gen ekspresyonlarındaki değişimlerin moleküler düzeyde belirlenmesi de önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, zebra balığı larvaları kullanılarak ticari amaçla imal edilen DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin genel ekotoksikolojik özelliklerinin belirlenmesi ve

moleküler genetik düzeyinde toksik etkilerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla bu çalışmada;

1- Konsantrasyon-etki deneyleri yardımıyla DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin letal (LC₅₀) ve subletal konsantrasyonlarının belirlenmesi,

2- Subletal konsantrasyonlarda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde oluşabilecek DNA hasarlarının belirlenmesi,

3- Testlerde kullanılan zebra balığı larvalarının stres gen (*p53*, *rad51* ve *xrcc5*) ekspresyonlarındaki değişimlerin real-time PZR tekniği ile belirlenmesi ve

4- Plastikleştirici maddelere maruz bırakılan larvaların morfolojik yapılarında meydana gelebilecek anormalliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında plastik endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmakta olan dioktil adipat (DOA, %99) ve dioktil ftalat (DOP, %>99,5) plastikleştirici maddeleri zebra balığı larvalarında toksikolojik açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan plastikleştirici maddeler ve diğer kimyasal maddeler aracı medikaller aracılığıyla temin edilmiştir.

2.2. Deney Canlıları

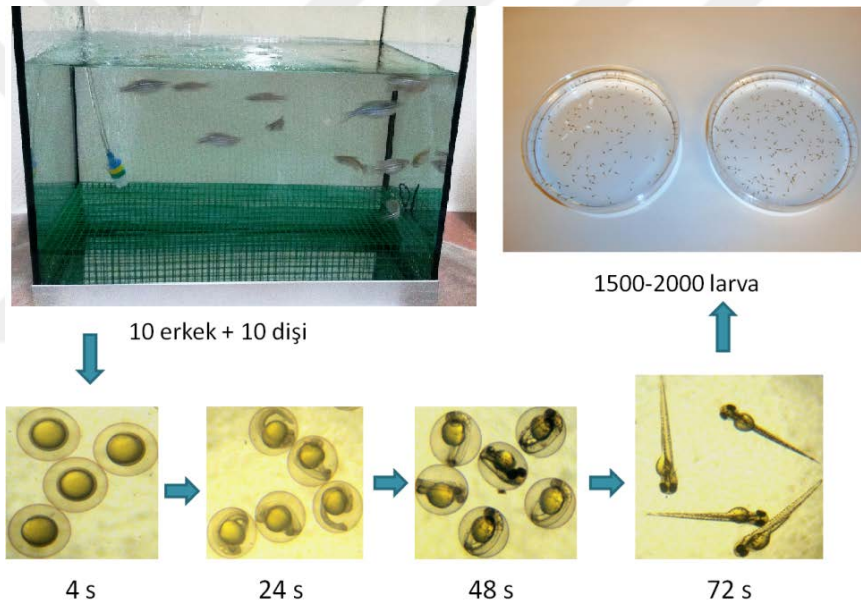
Toksikolojik deneylerde anaç olarak kullanılan 8-10 aylık zebra balıkları Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Akuatik Toksikoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir (Şekil 9). Anaç zebra balıklarının 20 litrelik akvaryumlar içerisinde üremeleri sağlanmış, akvaryumların tabanına yerleştirilen gözenekli ızgaralar yardımıyla anaç balıkların yumurtaları yemeleri engellenmiştir. Daha sonra, akvaryum tabanında biriken döllenmiş yumurtalar sifonlanarak toplanmış ve petri plaklarına aktarılmıştır.



Şekil 9. Larva temininde kullanılan anaç zebra balıkları için bakım üniteleri.

Konsantrasyon-etki ve gen ekspresyon deneyleri için haftalık olarak 1500-2000 civarında larva elde edilmiştir. Döllenmeden 72 saat sonra yumurtadan çıkan sağlıklı

larvalar toplanarak deneylerde kullanılmıştır (Şekil 10). Anaç balıkların laboratuvar şartlarına adaptasyonunda ve toksikolojik deneylerde en az 24 saat süreyle dinlendirilmiş klor içermeyen şebeke suyu kullanılmıştır. Anaç balıklara günlük olarak yapılan yemlemede bir defa *Artemia* sp., sabah ve akşam olmak üzere iki defa Tetramin hazır yem verilmiştir. Balıklar 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulamasına tabi tutulmuştur. Test suyunun pH'sı, çözülmüş oksijen miktarı ve sıcaklığı günlük olarak, toplam sertlik, nitrat, nitrit ve amonyak miktarları haftalık olarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda, su sıcaklığı; $27,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH; $7,4 \pm 0,3$, çözülmüş oksijen; $7,6 \pm 0,4$ mg/L, toplam sertlik; $54,09 \pm 1,8$ mg/L CaCO_3 , nitrit; $<0,1$ mg/L, nitrat; <20 mg/L ve toplam amonyak; $<0,02$ mg/L olarak ölçülmüştür.



Şekil 10. Anaç zebra balıklarının üreme işlemi ve embriyo aşamaları.

2.3. Test Solüsyonlarının Hazırlanması

Toksikolojik testlerde kullanılmak üzere DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin çözeltilerinin hazırlanmasında saf su kullanılmıştır. Ayrıca, bu maddelerin su içerisinde iyi çözünmemeleri nedeniyle her bir test sistemi içerisinde solvent olarak %1 (v/v) oranında saf etil alkol ilave edilmiştir. Konsantrasyon-etki deneyleri için 6 farklı letal, DNA hasar ve gen ekspresyon deneyleri için ise 5 farklı subletal konsantrasyonlar kullanılmıştır.

2.4. Letal ve Subletal Toksikolojik Deneyler

Toksikolojik deneylerde kullanılan plastikleştirici maddelerin letal ve subletal konsantrasyonlarını, ayrıca larvalarda meydana gelebilecek DNA hasarları ve gen ekspresyon değişimlerini belirlemek amacıyla içerisinde 200 mL dinlendirilmiş şebeke suyu bulunan 400 mL'lik beherler kullanılmış deneyler 3 tekerrür olacak şekilde yürütülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Zebra balığı larvaları kullanılarak 3 tekerrür olacak şekilde hazırlanmış toksikolojik test üniteleri.

Toksikolojik testlerde döllenmeden 72 saat sonra yumurtadan çıkan sağlıklı larvalar, 96 saatlik süreyle plastikleştirici maddelere maruz bırakılmıştır. Test sistemlerinin her biri içerisine 30'ar adet larva konulmuş ve her bir deneme için kontrol grubu oluşturulmuştur. Test ünitelerinin üzeri plastik kapaklar yardımıyla kapatılmış ve deneyler süresince test sistemlerinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Konsantrasyon-etki deneyleri sonunda ölü larvalar plastik pastör pipeti yardımıyla toplanarak sayılmış ve LC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. DNA hasar ve gen ekspresyon deneyleri için ise, maruziyet işlemi sonunda canlı larvalar toplanarak ependorf tüplerine aktarılmış ve işlem aşamasına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.5. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Belirlenmesi

2.5.1. Dokudan RNA Eldesi

Zebra balığı larvalarından toplam RNA izolasyonu, larvalar bütün halde ve bir ependorf tüpü içerisinde 30 adet larva olacak şekilde RNeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; larvaların içerisinde tutulduğu tüplere lizis işlemi için RLT tamponu ilave edilmiş ve prob sonikatör kullanılarak larvaların homojenizasyonu sağlanmıştır. Elde edilen solüsyon Qiashredder spin tüpüne aktarılmış ve 13000 g'de santrifüj edilmiştir. Tüpün alt kısmında biriken süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve lizati temizlemek için 1:1 oranında %70'lik etanol eklenmiştir. Daha sonra tüp içerisinde bulunan solüsyonun tamamı RNeasy mini tüpe aktarılmış, 13000 g'de santrifüj edilmiş ve tüpün alt kısmında biriken sıvı atılmıştır. Örnek içerisinde bulunan DNA'yı uzaklaştırmak için örnekler DNase çözeltisine tabi tutularak 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlemden sonra, mini tüp yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine konularak yıkama işlemi için üzerine RPE tamponu ilave edilmiştir. Tekrar 13000 g'de santrifüj işleminden sonra mini tüp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine RNA stoklama çözeltisi eklenmiştir. Son aşamada santrifüj işlemi yapılmış ve RNA'nın mini tüpdeki silika jel membrandan ayrılarak mikrosantrifüj tüpünde toplanması sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda 30 larva bulunan her bir örnekten yaklaşık olarak 30 µL RNA çözeltisi elde edilmiştir.

RNA'nın elde edilmesinden sonra NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak örneklerdeki RNA'nın kalitesi ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Spektrofotometrede ölçüm için 2 µL örnek kullanılmış, RNA konsantrasyonunun ≥ 100 ng/µL ve RNA kalitesinin 260/280: 1,8-2,1 değerlerinde olması sağlanmıştır. Bütün işlemler soğuk ortamda ve buz içerisinde yapılmıştır.

2.5.2. Revers (Ters) Transkripsiyon

İzole edilen RNA örneklerinden ImProm-II Revers Transkriptaz Kiti (Promega) kullanılarak tamamlayıcı DNA'lar (cDNA) elde edilmiştir. Bu amaçla, NanoDrop ile RNA konsantrasyonu ölçülen örnekler alınmış ve bütün örneklerin son konsantrasyonu

100 ng/ μ L olacak şekilde nükleaz içermeyen su ilave edilerek seyreltilmiştir. Daha sonra PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tüplerine 8 μ L seyreltilmiş kalıp RNA ve 16 μ L revers transkripsiyon reaksiyon karışımı eklenmiştir. İçerisinde örnekler bulunan PZR tüpleri Termal Cycler (Bio-Rad, T100) cihazına yerleştirilmiş ve 1,5 saat süreyle reaksiyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon şartları; tutunma (annealing) 25°C’de 5 dakika, uzama (extension) 42°C de 60 dakika, ve revers transkriptaz enziminin inaktive olması için 70°C’de 15 dakika olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon işleminin sonunda elde edilen tamamlayıcı DNA örnekleri bir sonraki analiz işlemine kadar -80°C’de saklanmıştır.

Revers transkripsiyon analizinde aşağıda miktarları verilen reaksiyon karışımı kullanılmıştır.

- Nükleaz içermeyen su	6,6 μ L
- 5 x Reaksiyon tamponu	4 μ L
- MgCl ₂ (25mM)	2,4 μ L
- dNTP karışımı (herbiri 10 mM)	1 μ L
- Hegzanükleotid primerler	1 μ L
- Reverse Transkriptaz	1 μ L
- Kalıp RNA	8 μ L

2.5.3. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Gen ekspresyon değişimlerinin belirlenmesine yönelik deneylerde, hedef gen olarak; hücre döngüsünü düzenleyen tümör baskılayıcı ve kanser oluşumunu önleyici görev yapan *p53*, DNA onarım proteini olan, DNA’nın çift zincir kırıklarının onarımında görev alan *rad51* ve yine çift zincir DNA kırıklarının uç kısımlarına tutunarak tamir işlemini gerçekleştiren *xrcc5* proteinlerini kodlayan genler seçilmiştir. Ayrıca ekspresyon değişimlerini karşılaştırmalı olarak hesaplamak amacıyla standart gen olarak, sitoskeletal sistemde görev alan hücre yapısı, bütünlüğü ve hareketinden sorumlu beta aktin (*β -actin*) proteinini kodlayan gen tercih edilmiştir. Her bir gene özgü primerler Bio Basic firmasından sağlanmıştır. Nükleotid primer sekansları ve hedef ampikon bölgesi büyüklükleri Tablo 1’de belirtilmiştir.

Tablo 1. Zebra balığı hedef genleri için nükleotid primer sekansları.

Hedef gen	Primer	Nükleotid dizisi 5' - 3'	Amplikon büyüklüğü
<i>p53</i>	Forward	TTG TCC CAT ATG AAG CAC CA	200 bp
	Reverse	TTT CCT GTC TCT GCC TGG AC	
<i>rad51</i>	Forward	ACT AGC CGT CAC CTG CCA GC	133 bp
	Reverse	ACT GCC CAC CAG ACC ATA CCG TT	
<i>xrcc5</i>	Forward	AGA AGT TTG TCC AGC GGC AGG TG	216 bp
	Reverse	GAG CAT CGA GCC AGT CTG CCT G	
<i>β-actin</i>	Forward	ACA CAG CCA TGG ATG AGG AAA TCG	138 bp
	Reverse	TCA CTC CCT GAT GTC TGG GTC GT	

Eş zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılacak olan mastır karışımı; forward primer, revers primer ve SYBR green (SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix, Sigma-Aldrich) floresan boya karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. Revers transkripsiyon reaksiyonu sonucu elde edilen DNA örnekleri 1:10 oranında seyreltilmiş ve 3 tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca, reaksiyon etkinliğinin kontrolü amacıyla standart DNA örnekleri de 3 tekerrür olacak miktarda hazırlanmıştır. Real-time PZR reaksiyonunda sırasıyla negatif kontrol, nükleaz içermeyen su, 1:10 oranında seyreltilmiş DNA örnekleri ve son olarak da reaksiyonun etkinliğini belirlemek için farklı oranlarda seyreltilmiş standart DNA örnekleri kullanılmıştır. Örneklerin pipet yardımıyla 0,2 mL'lik tüplere konulmasından sonra tüpler real-time PZR cihazına yerleştirilmiştir. PZR işlemi için real-time PZR cihazı (Qiagen, Rotor-Gene 3000) kullanılmış ve reaksiyon 40 döngü (2 saat 40 dakika) olacak şekilde aşağıda belirtilen şartlarda yürütülmüştür.

a. Bekleme aşaması

94 °C, 2 dakika

b. Döngü aşaması

1. adım 94°C, 15 saniye

2. adım 55°C, floresan kapalı, 1 dakika

3. adım 72°C, floresan açık, 1 dakika

c. Erime eğrisi aşaması

1. adım 94°C, 15 saniye

2. adım 60°C, 1 dakika

3. adım 94°C, 15 saniye

d. 4 °C de bekleme

2.5.4. Gen Ekspresyon Değişimlerinin Hesaplanması

Eş zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan bilgisayar programı yardımıyla, DNA replikasyonu sırasında oluşan floresan ışınım miktarının istatistiksel olarak önemli miktarda arttığı seviyedeki döngü sayıları (Threshold Cycle, C_T) eş zamanlı olarak kaydedilmiştir. Elde edilen, eşik seviyesindeki döngü sayıları kullanılarak aşağıda verilen formüller yardımıyla gen ekspresyonlarındaki değişimler kat değişim olarak ifade edilmiştir.

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

$$\Delta C_T = \text{ortalama } C_T \text{ hedef gen} - \text{ortalama } C_T \text{ standart gen } (\beta\text{-actin})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ örnek} - \text{ortalama } \Delta C_T \text{ kontrol}$$

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

Ayrıca, PZR reaksiyonunun düzgün çalışıp çalışmadığının bir göstergesi olarak reaksiyonun etkinliği hesaplanmıştır. Bu amaçla elde edilen veriler yardımıyla standart eğri oluşturulmuş ve eğrinin eğimi belirlenerek $10^{(-1/\text{eğim})} - 1$ formülünde yerine yazılarak etkinlik değeri hesaplanmıştır. Reaksiyonun düzgün bir şekilde çalışması için etkinlik değerinin 0,9 ile 1,1 (%90 - %110) aralığında olması gerekmektedir. Real-time PZR reaksiyonunun etkinliğinin bu değer aralığından farklı hesaplanması durumunda, hatanın kaynağı belirlenerek reaksiyon tekrarlanmıştır.

2.6. Hücresel DNA Hasarının Tespiti (Comet Assay)

Plastikleştirici maddelere 96 saat süreyle maruz kalan larvalar deney süresi sonunda 1,5 ml'lik santifirüj tüplerine (bir tüpte 30 adet larva) alınmış ve üzerine 350 μ L RLT buffer (Qiagen) eklendikten sonra doku homojenizatörü yardımıyla homojenize edilerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra 10 μ l hücre süspansiyonu 180 μ l %0,5'lik LMP (düşük erime ısı) agaroz ile karıştırılmıştır (LMP agaroz 37°C'de bekletilerek kullanılmıştır). Üzerinde hücre sayımı yapılan rodajlı lamaların ilk aşamada %1'lik NMP (normal erime ısı) agaroz ile yüzeyleri kaplanmış ve bir gün süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur. Hücrelerin üzerini kaplama işlemi için lameller kullanılmıştır. Daha sonra

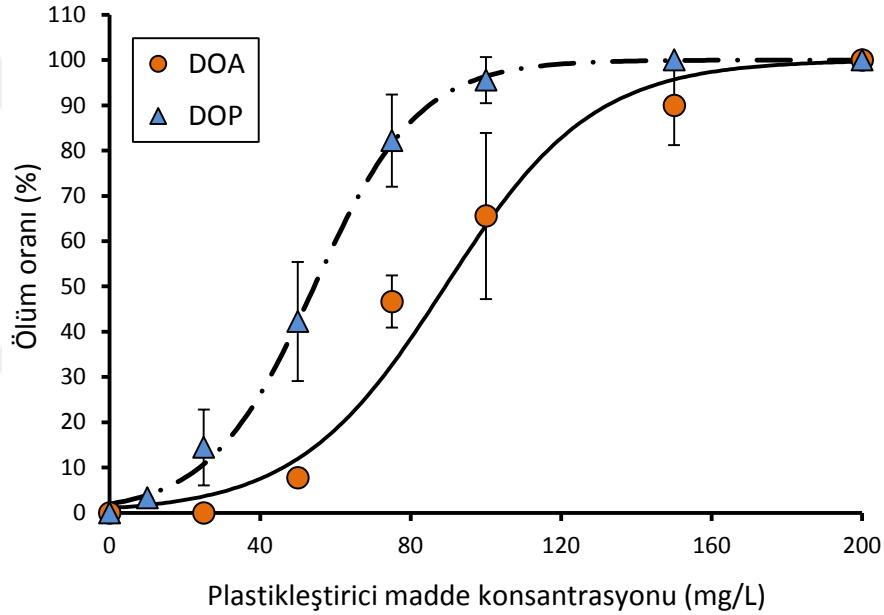
ikinci tabaka olarak hazırlanmış hücre süspansiyonu ve LMP karışımından 75 µl kullanılarak ikinci tabaka oluşturulmuş ve üzeri lamelle kapatılmıştır. Bu işlemden sonra bir saat süreyle agarozun donması beklenmiştir. Üçüncü tabakada örnekler sadece 75 µL %0,5 LMP agarozla kaplanmış ve yine üzeri lamelle kapatılarak agarozun donması beklenmiştir. Hazırlanan slaytlar daha önce hazırlanmış ve +4°C'de bekletilen lizis solüsyonu içerisinde (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, pH 10, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) en az 1 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. Slaytlar yan yana elektroforeze yerleştirilmiş ve +4°C'de 20 dakika sıcaklık dengelenmesi için bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler 20 dakika (24 V, 300 mA) +4°C'de elektroforezde yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra slaytlar nötralize buffer içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve 0,5 mg/mL konsantrasyonunda Etidium Bromür ile boyanmıştır. Pozitif kontrol için hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Son olarak boyanmış slaytlar 20X'da floresan mikroskop altında görüntülenmiş ve sonuçlar Comet Assay programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada gerçekleştirilen konsantrasyon-etki deneylerinin tamamı bağımsız olarak 3 farklı zamanda tekrarlanmış ve tüm veriler ortalama standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef gen ekspresyon seviyeleri, kontrol örneklerinin ortalamaları ile karşılaştırılarak kat değişim olarak ifade edilmiştir. Farklı test koşulları altında hedef genler ve *β-actin* gen ekspresyonlarındaki önemli farklılıkları belirlemek amacıyla eşit değişkenler için veri değerlerine önce Levene testi, sonrasında ise ANOVA testi uygulanmıştır. Çoklu gruplar arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır. LC₅₀ değerleri Probit analiz metoduna göre belirlenmiştir.

3. BULGULAR

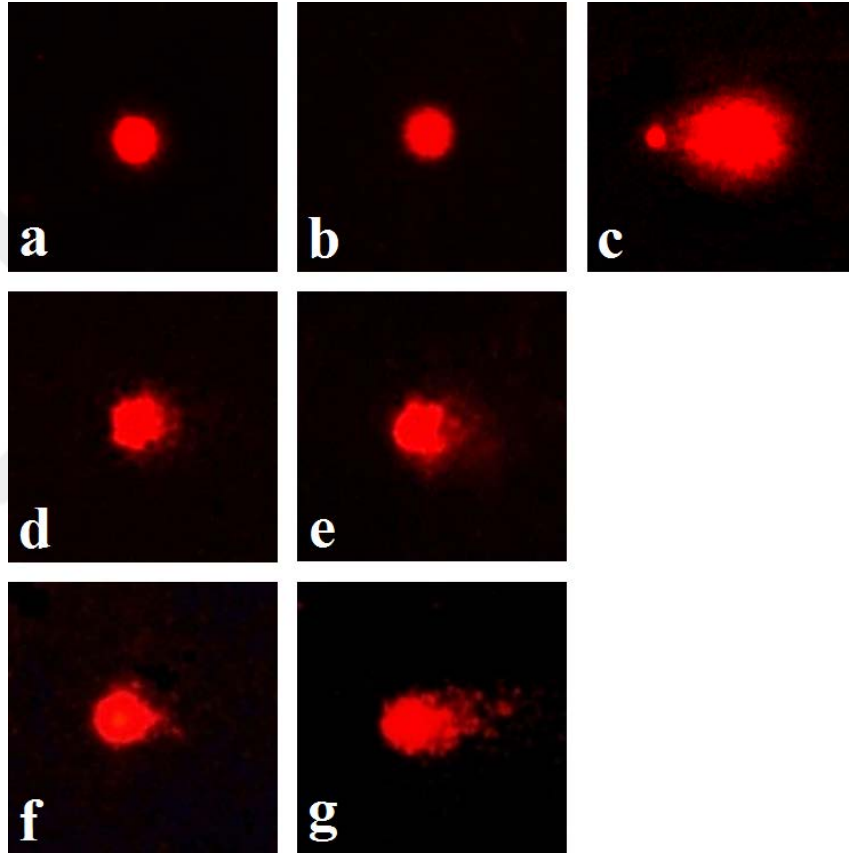
Plastik sanayinde yaygın şekilde kullanılan plastikleştirici maddelerin zebra balığı larvalarındaki toksisite düzeylerini ve LC₅₀ değerlerini belirlemek amacıyla, bu çalışmada dioktil adipat (DOA) ve dioktil ftalat (DOP) kullanılmış ve bu maddelerin zehirlilik düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, 96 saat süreyle DOA ve DOP'un üç tekerrür olacak şekilde yapılan konsantrasyon-etki deneyleri sonucunda LC₅₀ değerleri sırasıyla 89,99 ± 8,03 mg/L (GA: 74,26 - 109,40) ve 54,02 ± 11,49 mg/L (GA: 47,88 - 60,69) olarak hesaplanmıştır (Şekil 12).



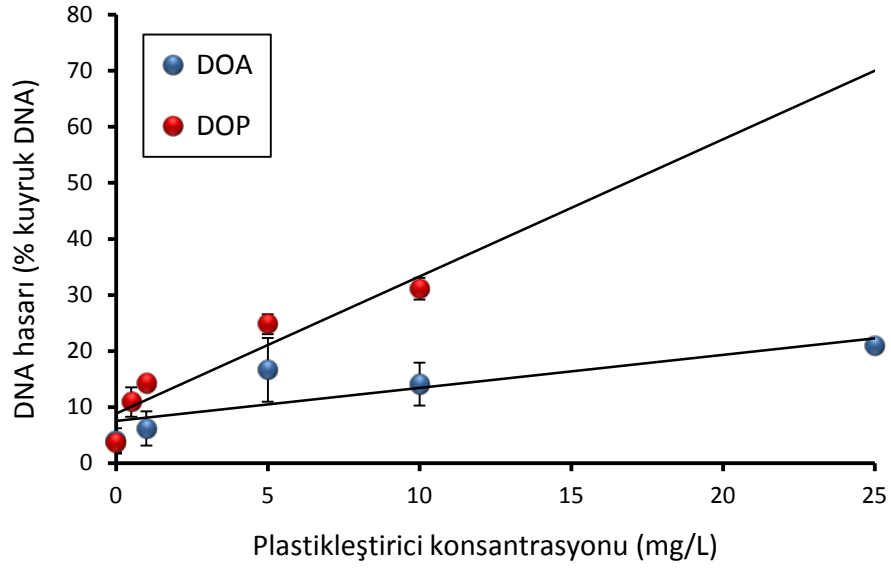
Şekil 12. Toksikolojik testlerde DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarının ölüm oranları.

DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz kalan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde oluşabilecek DNA hasarlarını belirlemek aracılığıyla "Comet Assay" tekniği kullanılmıştır. Subletal konsantrasyonlarda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan larvaların DNA'larında maruziyet konsantrasyonuna bağlı olarak düşük derecede hasar tespit edilmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol grubuna H₂O₂ uygulanması sonucunda oluşan hasarın DOA ve DOP uygulanan larvalarda oluşan hasardan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 13).

En yüksek subletal konsantrasyonlarda DOA (25 mg/L) ve DOP (10 mg/L) plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan larvaların Comet analizi sonucunda oluşan ortalama DNA hasarları, kontrol grubuna oranla sırasıyla % 20,8 ve % 31,1 olarak hesaplanmıştır ($P < 0,05$). En düşük konsantrasyonlarda DOA (1 mg/L) ve DOP (0,5 mg/L) plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan larvaların Comet analizi sonucunda ise oluşan ortalama DNA hasarları, kontrol grubuna oranla sırasıyla % 6,2 ve % 10,9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 14).

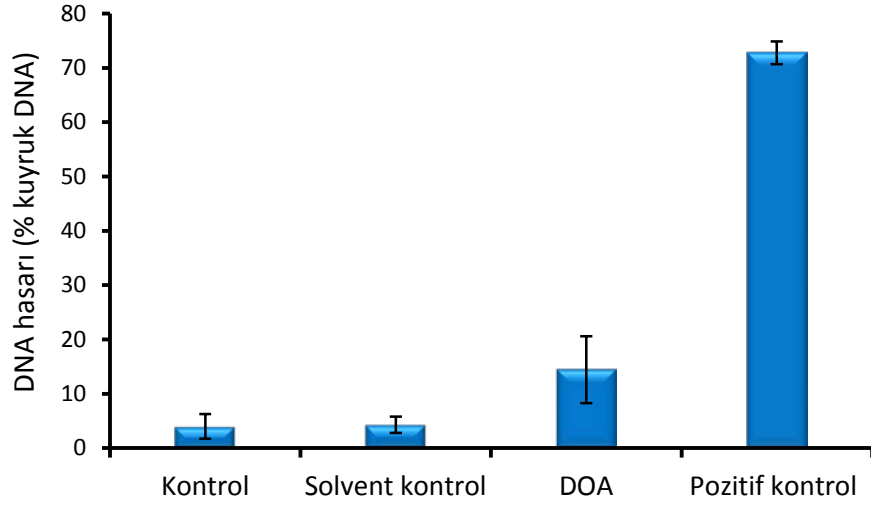


Şekil 13. DOA ve DOP uygulanan zebra balığı larvalarının kan hücrelerinde Comet oluşumu. (a) Kontrol, (b) solvent kontrol (%1 etil alkol (v/v)), (c) Pozitif kontrol (1 µL/mL H₂O₂), (d) 1 mg/L DOA, (e) 25 mg/L DOA, (f) 0,5 mg/L DOP, (g) 10 mg/L DOP.

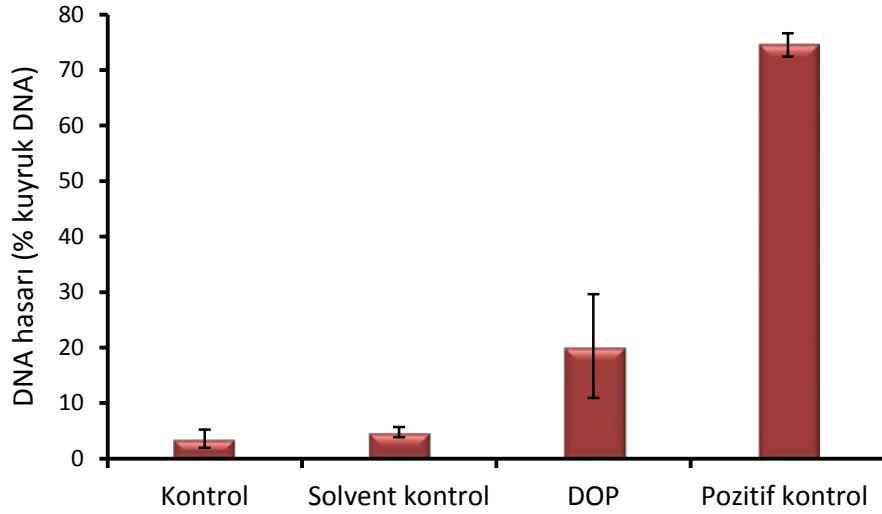


Şekil 14. 96 saat süreyle subletal konsantrasyonlarda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan larvalardaki DNA hasarları (% kuyruk DNA, Comet assay), $P < 0.05$.

Yapılan comet analizleri sonucunda kullanılan DOA ve DOP konsantrasyonlarının ortalama DNA hasarları sırasıyla %14,5 ve % 20,3 olarak hesaplanmıştır. Plastikleştirici maddelerin su içerisinde çözünmelerini sağlamak amacıyla solvent olarak (%1 v/v) kullanılan etil alkolün kontrol grubuna oranla önemli bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2 'nin (1 $\mu g/mL$) ise larva hücrelerinin DNA'larında ortalama %73,6 oranında hasar meydana getirdiği belirlenmiştir (Şekil 15, 16).

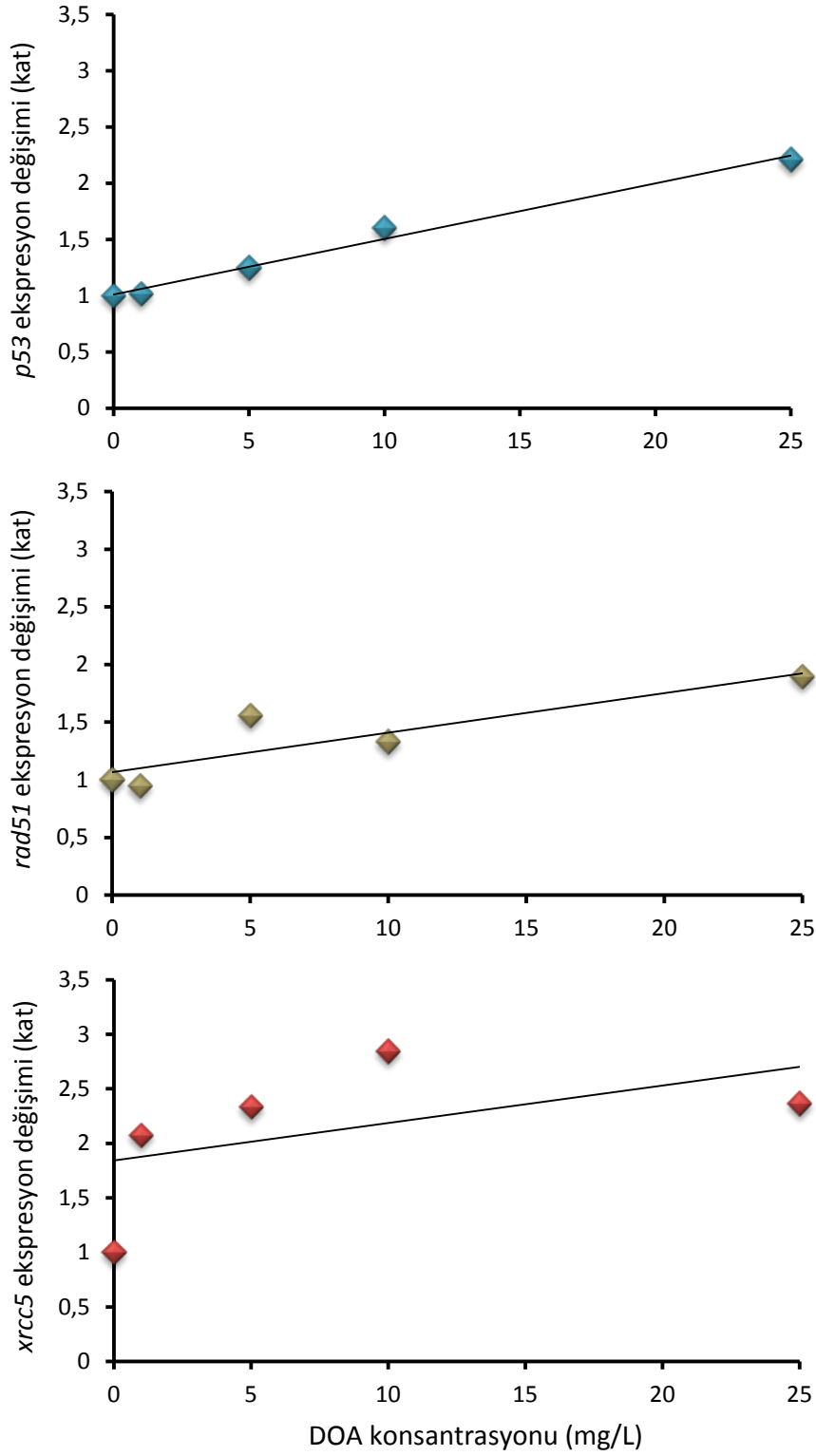


Şekil 15. DOA plastikleştirici maddesinin subletal konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan larvalarda oluşan DNA hasarları. Solvent kontrol: %1 etil alkol (v/v), pozitif kontrol: 1 µg/mL H₂O₂, P < 0.05.



Şekil 16. DOP plastikleştirici maddesinin subletal konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan larvalarda oluşan DNA hasarları. Solvent kontrol: %1 etil alkol (v/v), pozitif kontrol: 1 µg/mL H₂O₂, P < 0.05.

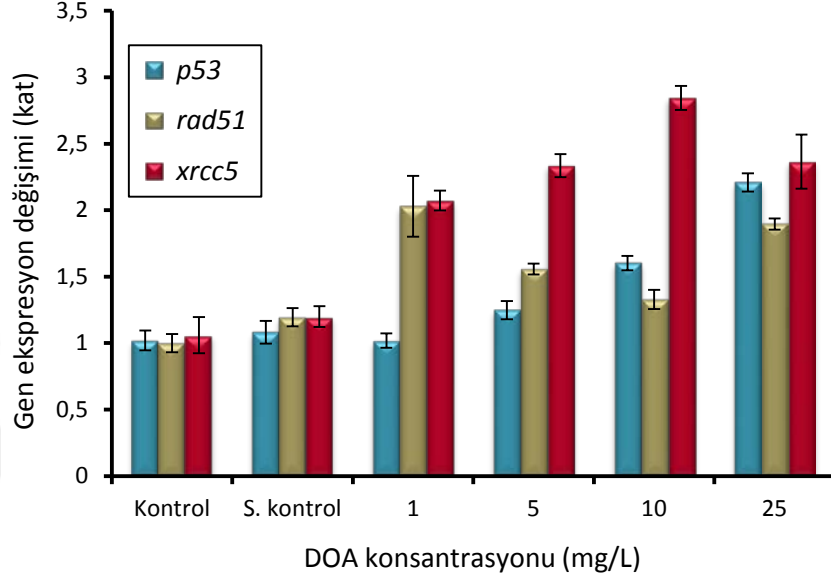
DOA'nın gen ekspresyon değişimleri açısından değerlendirildiği deneme sonuçlarında, 96 saat süreyle en yüksek subletal konsantrasyon olan 25 mg/L'ye maruz kalan zebra balığı larvalarında *p53*, *rad51* ve *xrcc5* genleri için kontrol grubuna oranla sırasıyla; 2,2, 1,9 ve 2,4 kat artış meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DOA maddesine maruz kalan zebra balığı larvalarındaki stres genlerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde bir ekspresyon değişiminin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 17).



şekil 17. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOA'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki stres gen ekspresyon değişimleri.

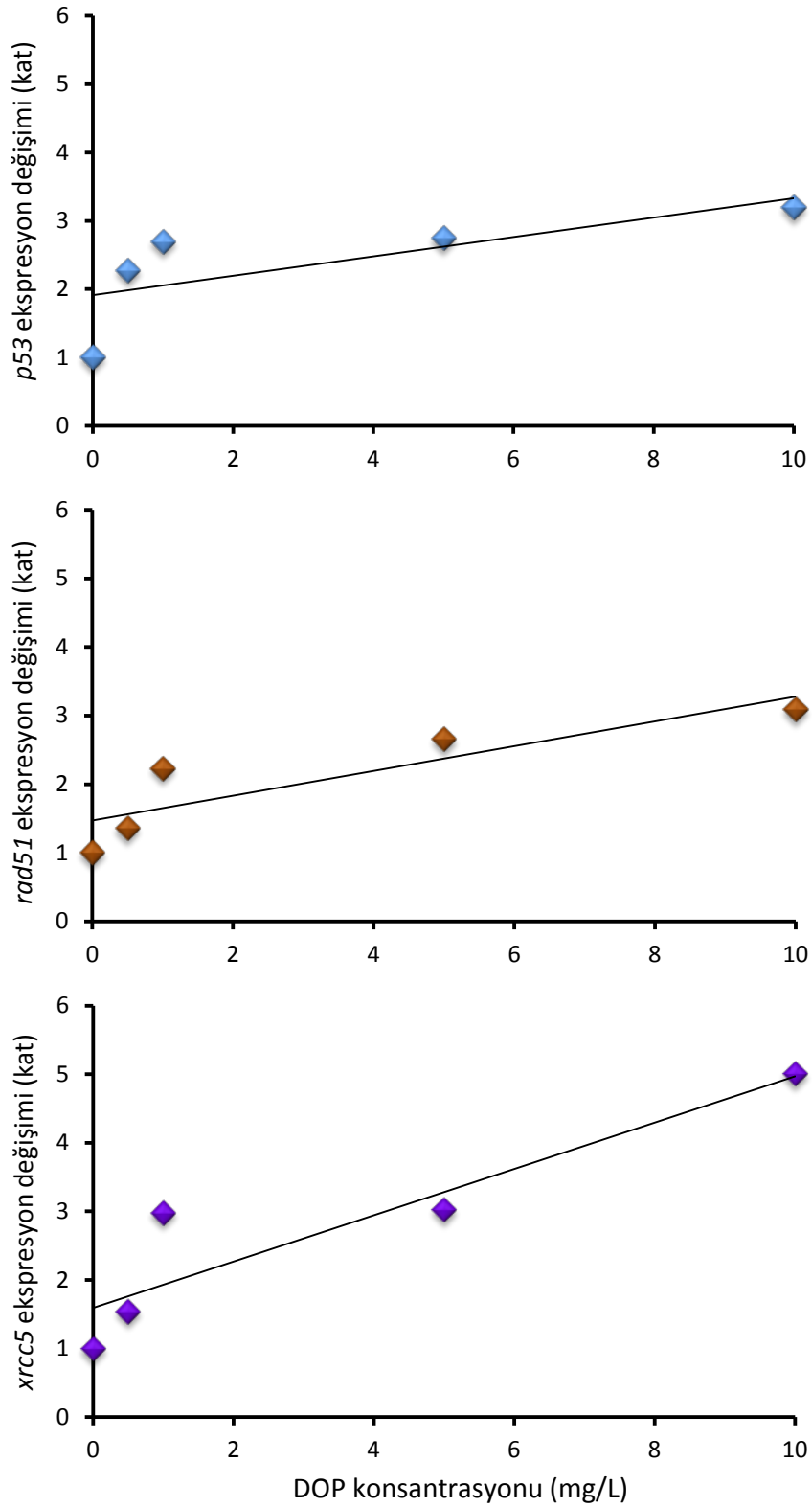
Farklı konsantrasyonlarda DOA'ın larvalarda bulunan stres genlerindeki ekspresyon değişimleri açısından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda, DNA onarım

proteinlerini kodlayan *rad51* ve *xrcc5* genlerinde tümör baskılayıcı proteinini kodlayan gen olan *p53* genindeki ekspresyon değişimine göre daha yüksek oranda bir artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOA'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri.

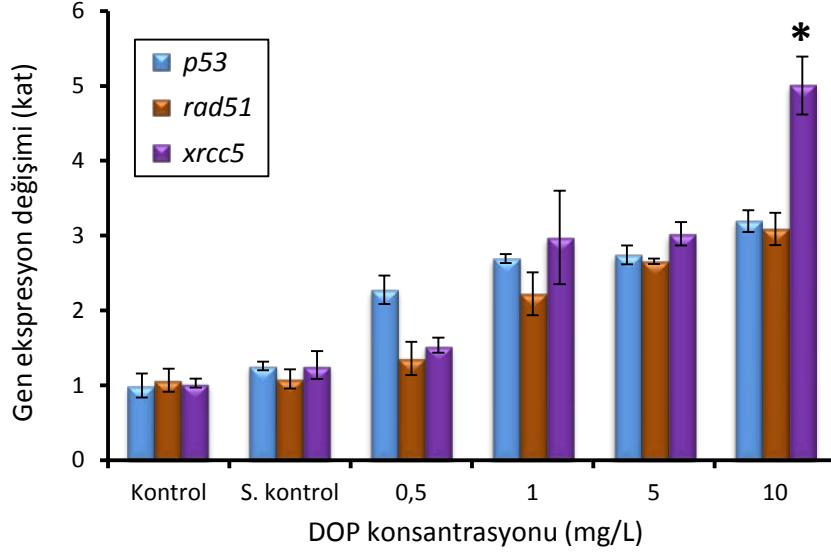
DOP'un stress gen ekspresyon değişimleri açısından değerlendirildiği test sonuçlarında, 96 saat süreyle en yüksek subletal konsantrasyon olan 10 mg/L'ye maruz kalan zebra balığı larvalarında *p53*, *rad51* ve *xrcc5* genleri için kontrol grubuna oranla sırasıyla; 3,2, 3,1 ve 5,0 kat artış meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DOP maddesine maruz kalan zebra balığı larvalarındaki *p53* ve *rad51* genlerinde önemli düzeyde bir ekspresyon değişimi olmamakla birlikte *xrcc5* geninde ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir gen ekspresyon artışı tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki stres gen ekspresyon değışimleri.

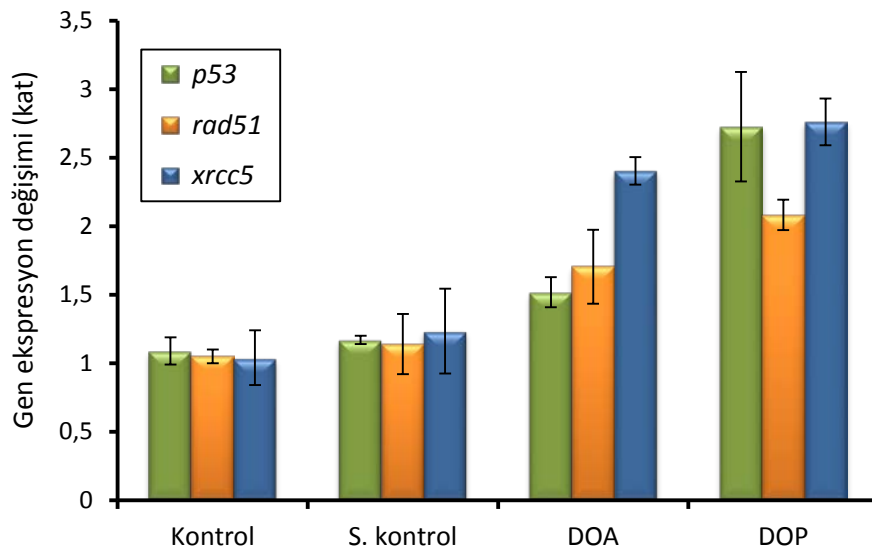
Farklı konsantrasyonlarda DOP'un larvalarda bulunan stres genlerindeki ekspresyon değışimleri açısından karşılaştırıldığı çalışma sonucunda, DNA onarım

proteinlerini kodlayan *xrcc5* geninde *p53* ve *rad51* gen ekspresyon değişimlerine oranla istatistiksel olarak önemli oranda bir artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 20).



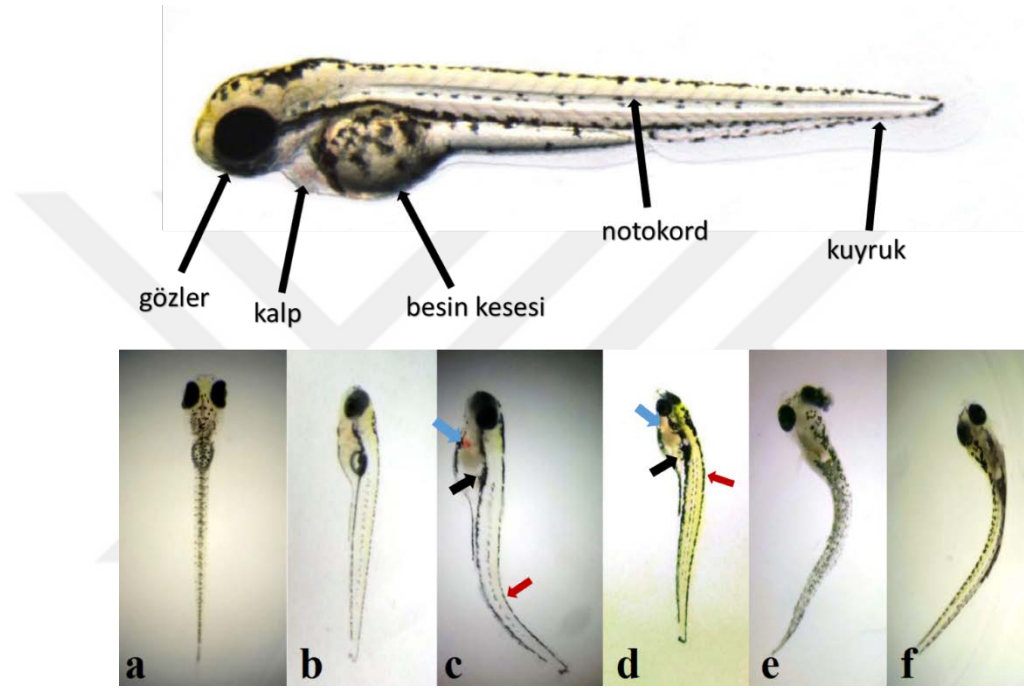
Şekil 20. Toksikolojik testlerde 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarındaki üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimleri.

DOA ve DOP plastikleştirici maddelerinin zebra balığı larvalarındaki gen ekspresyon değişimleri açısından karşılaştırıldığı deneme sonuçlarında DOP'un DOA'ya oranla ortalama 1,5 kat daha toksik olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Toksikolojik testlerde DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı larvalarında üç farklı gende oluşan ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması.

DOA ve DOP plastikleştirici maddeleri sucul organizmalar üzerinde toksik etkilere ve bunun sonucunda da ölümlere neden olabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan plastikleştirici maddeler, zebra balığı larvalarında; perikardiyal bölgede kan toplanması (hiperemiya), notokord eğriliği, renkte kararma, besin kesesinde şişme, yüzme kesesinde deformasyon ve karın bölgesinde plastikleştirici madde birikimi gibi etkiler oluşturabilmekte ve ileri aşamada da ölümlerine sebep olabilmektedir (Şekil 22).



Şekil 22. Zebra balığı larvasının vücut bölümleri ve plastikleştirici maddelere maruz bırakılan larvalarda görülen anormallikler. (a, b) Normal larvalar, (c, d) canlı fakat anormal larvalar; kan toplanması (mavi oklar), yüzme kesesi deformitesi (siyah oklar), ve spinal eğrilik oluşumu (kırmızı oklar), (e, f) plastikleştirici maddelere maruziyet sonucu ölmüş larvalar.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sanayi atıklarının temiz sulara, içme sularına, deniz ve nehirlere karışması, başta balıklar olmak üzere, algler, kerevitler ve su piresi gibi sucul mikroorganizmaları da etkilemekte ve bioakümülyasyona neden olmaktadır (Laughlin vd., 1978; Adams vd., 1995). Avrupa’da plastikleştirici maddelerin PEC (Priority Existing Chemicals: Önceliği Olan Kimyasallar) raporlarına göre tatlı su ve sedimentlerde biriken miktarları 0,4 mg/L ve 0,231 mg/kg olarak belirtilmiştir. Plastikleştirici maddelerin tatlı sularda biriken miktarları, endüstrinin daha yaygın olduğu İngiltere gibi ülkelerde ise 33,5 mg/L’ye kadar çıkabilmektedir. Almanya ve Japonya gibi ülkelerde ise tatlı sularda biriken miktarlar 98 mg/L olarak tespit edilmiştir (Oehlmann vd., 2009).

Farmakoloji, toksikoloji ve çevre bilimlerinde bir kimyasalın bir canlı organizma üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bazı parametreler kullanılmaktadır. Bunlar EC₅₀ (etken konsantrasyon 50), IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon 50), LC₅₀ (ortalama öldürücü konsantrasyon) ve LD₅₀ (ortalama öldürücü doz) gibi kimyasal ya da patojenlerin etkin dozlarının belirlenmesini sağlayan referans bilgilerdir. EC₅₀/IC₅₀ değeri genelde ilaçların biyoaktivite değerlendirmelerinde kullanılır (Sebaugh, 2011). LC₅₀ ve LD₅₀ ise bir kimyasal veya patojenin bir canlı popülasyonunun yarısını öldürdüğü konsantrasyon veya dozdur ve birimi genellikle “mg (kimyasal)/kg (vücut ağırlığı)” olarak alınır. LC₅₀ toksikoloji çalışmalarında ve yaygın olarak sucul organizmalarda akut toksisiteyi belirlemede kullanılır. LC₅₀ değerleri standart değerler olduğundan, kimyasallar arasında nispi toksisite veya türler arası toksisite farkları LC₅₀ değerleri kullanılarak belirlenebilir (Rispien vd., 2002). Bunların yanı sıra, NOEC (etki görülmeyen konsantrasyon) ve LOEC (en düşük etki görülen konsantrasyon) değerleri de kullanılmaktadır. NOEC ve LOEC, kullanılan metodun tetkik limitlerini belirlemede araştırmacılara yardımcı olan parametrelerdir (Murado ve Prieto, 2013). Plastikleştirici maddeler kullanılarak yapılan toksikolojik çalışmalarda *Tetrahymena thermophila*’da DMP, DEP ve DBP’nin EC₅₀ değerleri sırasıyla 537 mg/L, 132 mg/L ve 7 mg/L olarak bulunmuştur (Jaworska vd., 1995). DBP’nin türler arası hesaplanan EC₅₀ değerleri ise kırmızı yıllık balığı (*Fundulopanchax gardneri*) için 4,3 mg/L, zebra balığı (*Danio rerio*) için 2,2 mg/L, sarı tatlı su levreği (*Perca flavescens*) için 0,35 mg/L’dir (Staples vd., 1997). Kanada Çevre Koruma Konseyi’nin raporuna göre ftalatların sarı tatlı su levreği (*Perca flavescens*),

alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), ay balığı (*Mola mola*), kedi balığı (*Pseudobagrus fulvidraco*) ve minnov (*P. Promelas*) için 96 saat LC₅₀ değerleri 0,35 ile 3,96 mg/L arasında değişmektedir (ECB, 2004). Benzer şekilde, ftalatlar kullanılarak yapılmış olduğumuz çalışmalarda da 0-200 mg/L aralığında DOA ve 0-150 mg/L aralığındaki konsantrasyonlarda DOP'a maruz bırakılan zebra balığı larvalarının % 50'sini öldüren letal konsantrasyonlar sırasıyla 89,99 mg/L ve 54,02 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada elde ettiğimiz LC₅₀ değerlerinin önceki çalışmalara göre yüksek olması ve toksik etkilerin daha düşük düzeyde olmasının nedeninin maddelerin sudaki çözünürlükleri ve balık türlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ftalatlar kozmetik sanayinde, plastik malzemesi olarak ve polimerlerin yapısında sağlamaştırıcı ve esnekleştirici madde olarak, boya ve vernik üretiminde, oyuncakların yapısında ve birçok alanda yaygın şekilde organik çözücü olarak kullanılmaktadır (Staples vd., 1997; Rudel vd., 2003; Huang vd., 2008). Ancak polimerlere kimyasal olarak bağlanmadıklarından çevreye kirlenici olarak salınımı son derece yüksektir ve doğal yaşamı olduğu kadar insan sağlığını da tehdit etmektedir. Ftalatların birçoğunun karsinojenik ve mutajenik etkiye sahip olduğu, bunun yanında endokrin bozucu kimyasallar (EDC) olarak değerlendirildikleri ve hayvan türlerinde antiandrojenik etki oluşturdukları belgelenmiştir (Mylchreest vd., 1998; ECHA, 2008). Ftalatlar ince bağırsaktan absorbe edildikten hemen sonra hızlıca hidrolize olmakta ve glukuronid bileşikleri halinde idrarla vücut dışına atılmaktadır. Ftalatların 7 günde idrarla vücut dışına atılan miktarı yalnızca %60'dır (Calafat vd., 2004). Bu bilgi bize ftalatların organizmada birikebildiği ve canlılarda kronik toksisiteye ve metabolik bozukluklara sebebiyet verebileceğini göstermektedir. Nitekim, yapılmış olduğumuz çalışmalarda da DOA ve DOP'a maruz kalan zebra balığı larvalarının mikroskopik analizlerinde larvaların besin keselerinde bu maddelerin birikim oluşturduğu ve morfolojik bozukluklara neden oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, *p53*, *rad51* ve *xrcc5* gen ekspresyonlarındaki değişimlere bakıldığında, plastikleştirici maddelere maruz kalan larvalarda konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna oranla önemli bir fark görülmemiştir. En yüksek subletal konsantrasyonda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz kalan larvalarda 3 farklı gen ekspresyonunda sırasıyla ortalama 2,2 ve 3,8 kat artış tespit edilmiştir. Düşük

konsantrasyonlarda ise gen ekspresyonlarında önemli bir değişim görülmemiştir. Bu durumun nedeni, muhtemelen DNA onarım mekanizmasının daha erken harekete geçmesinden kaynaklanmaktadır (Checkik ve Koller, 2009). Canlı organizmalarda hücrenin hayatta kalmasında, DNA onarımının öneminden ve standart gen olarak kullanılmalarından dolayı, bu onarım genleri devamlı olarak uyarılırlar (Kim vd., 2001; Iwanaga vd., 2004; Bladen vd., 2007). Bu nedenle, aktif şekilde bölünen hücrelerde belirli oranda, DNA onarım genlerine ait transkriptler devamlı olarak yüksek miktarda bulunabilirler (Lu ve King, 2009) ve DNA onarım aktivitesindeki artış nedeniyle de önemli bir ekspresyon değişimi görülmez. Bu çalışmada incelenen *p53*, *rad51* ve *xrcc5* gen ekspresyonlarında ortalama 3 kat değişim görülmüştür. Bu sonuçlar daha önce yapılan ve düşük seviyede ekspresyon değişimi görülen çalışma sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir (Sandrini vd., 2009). Karasal hayvanlar ile yapılan bir çalışmada DBP ve DEHP gibi yüksek molekül ağırlıklı ftalatların vücut tarafından absorbe edildiği ve toksik etki oluşturduğu, ancak diğer ftalatlara göre daha düşük bioakümülyasyon değerlerine sahip oldukları, bunun yanında DMP ve DEP gibi ftalatların ise absorpsiyonunun daha düşük bulunduğu bildirilmiştir (Hu vd., 2005). DEHP'nin 70-500 mg/L konsantrasyon aralığında Diptera larvalarında HSP70 (Isı Şoku Proteini-70) ve hemoglobin genlerinin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (Lee vd., 2006). Vertebrata'da ısı şoku proteinlerinin steroid hormon reseptör aktivasyonu ve stabilizasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Gillesby vd., 1998). *Pimephales promelas*'da 100 mg/L BBP maruziyetinde vitellogenin proteininin indüklendiği ve östrojenik aktivitenin arttığı, sazan balığında (*C. carpio*) ise 20 mg/L DEP maruziyetinde vitellogenin sentezinin arttığı bildirilmiştir (Harries vd., 2000; Barse vd., 2007). DEHP ve DBP sazan balığında steroid hormon sentezi ve metabolizmasını bozarak androjen-östrojen dengesini değiştirebilmekte ve tüm üreme sisteminde hasar bırakabilmektedir. Plastikleştirici maddelerin özellikle balıklarda stres genlerini indükleyebilmesi ve bu genlerin regülasyonlarındaki anormal değişimlerin izlenmesi çevresel bir kirlenici olan ftalatlar için markır potansiyeli olduğunu göstermektedir (Allen vd., 2008).

β-actin geninin ekspresyon düzeylerinin hiçbir durumda değişiklik göstermemesi hedef genlerin (*p53*, *rad51* ve *xrcc5*) normalizasyonu için standart gen olarak seçilmesine olanak sağlamaktadır. Casadei vd. (2011) 8 farklı zebra balığı standart genini analiz ettikleri bir çalışmada kantitatif PZR'nda normalizasyon için en uygun genin hangisi

olduğunu belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlarda, β -actin'in larvaların farklı gelişim aşamalarında en fazla ifade edilen gen olduğunu ve ekspresyonun en yüksek ve en sabit düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da hedef genlerle standardizasyon işleminde β -actin geni tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz bırakılan zebra balığı larvalarında konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarlarında düşük seviyede bir artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde, insan hücreleri ve zebra balığı kullanılarak yapılan bir karşılaştırma deneyinde 20 mg/L toksik madde maruziyeti sonucunda insan hücrelerinde % 20 ve 100 mg/L maruziyet sonucunda ise zebra balıklarında kontrol grubuna oranla % 50 oranında DNA hasarı tespit edilmiştir (Ng vd., 2011; Zhao vd., 2013). Hücrel oksidatif stres; protein yapısının bozulması, iyon kaybı, membran peroksidasyonu ve DNA zincir kırıkları gibi pekçok zararlı etkiye neden olabilmektedir. Çevresel kirleticiler, direkt olarak canlı vücudunda bulunan bazı bileşiklerle ve onların metabolitleriyle etkileşime girerek ve dolaylı olarak da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna zemin hazırlayarak DNA da hasar meydana getirebilirler (Oliveira vd. 2009). Bu çalışmada, subletal konsantrasyonlarda DOA ve DOP plastikleştirici maddelerine maruz kalan larvalarda kontrol grubuna oranla sırasıyla % 20,8 ve % 31,1 oranında DNA hasarı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Zhu vd., (2011) yaptıkları bir çalışma sonucunda toksik kimyasallara maruz bırakılan zebra balıklarının karaciğer hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak artan oranda DNA hasarı tespit etmişlerdir.

Sazan balığı ve ftalatlarla yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda, 1000 nM DEHP konsantrasyonunun sazan balığı böbreğinde fagositik hücrelerde süperoksit anyonunun üretiminde ve fagositik aktivitede artış; DBP ile DEHP maruziyetinin ise sazan balığı makrofajlarında nitrik oksit üretimini arttırdığı rapor edilmiştir (Watanuki vd., 2003). Genel olarak ftalatların *in vitro* çalışmalarda hepatik östrojen reseptörü için β -östradiol ile yarıştığı bilinmektedir ve immün sistem hücrelerinden olan makrofaj ve lenfositlerin de östrojenik reseptörlere sahip olması, kortizol, östrojen ve büyüme hormonu gibi hormonlarla yarışabilen çevresel kirletici endokrin bozucuların balık immün sistemini olumsuz etkileyeceği söylenebilir. Benzer şekilde yapmış olduğumuz çalışmada da, zebra balığı larvalarında metabolik aktivitenin bozulduğu ve immün sistemin olumsuz

etkilenmesi nedeniyle morfolojik yapıda da önemli değişimlerin oluştuğu tespit edilmiştir.

Kimyasalların ileriye dönük ekolojik risk değerlendirmelerinde genellikle toksik etki mekanizması hakkında üretilen veriler sınırlıdır. Ekolojik etkileri saptamak için geliştirilen test yöntemleri, çok çeşitli canlı türlerinde uygulanır ve son nokta etkilerini incelemeyi kapsar. Etki mekanizmasının bilinmesi, kirletici maddenin çevresel konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılabilir, strese neden olan ve strese özgü moleküler indikatörlerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Bununla birlikte, hareket mekanizmasının bilinmesi türler arası biyolojik etkilerin tahmin edilmesi, kimyasal yapı ve biyolojik organizasyon seviyelerinin etkili bir şekilde anlaşılabilmesi ve tepki hassasiyetinin, zaman ve kaynak kullanımının belirlenmesine olanak sağlayabilir (Ankley vd., 2009. Endokrin bozucu kimyasalların belirlenmesinde mekanistik yaklaşımlar için teknolojik gelişmelerden, genomik ve matematiksel biyolojiden yararlanılarak, organizmalardaki stres bağımlı ve ters tepkiler için önceden çıkarım yapma ve konsantrasyon belirleme gibi araştırmacının kullanımına sunulabilecek yararlı bilgiler oluşturulabilir (Neumann ve Galvez, 2002). Bu çalışmada kullanılan plastikleştirici maddelerin de endokrin bozucu kimyasallardan olduğu bilinmekle birlikte, elde edilen sonuçlara göre bu maddelerin balıklarda düşük düzeyde hüresel strese neden oldukları tespit edilmiştir.

Son zamanlarda bilim insanları plastik ve yan ürünlerin geliştirilmesinin bilime, sağlık sektörüne ve teknolojiye faydalı olacağı konusunda hemfikirdirler, fakat onların çevreye, özellikle de sucul çevreye salınımı insanlarda, canlı organizmalarda ve hassas ekosistemlerde zararlı etkilere neden olabilmektedir. lkeler, endüstriler ve bağımsız bir çevresel bilim topluluğu arasında etkin bir iç ilişkisinin geliştirilmesi, uygun ekotoksikolojik çalışmaların geliştirilmesini kolaylaştıracak, çevresel zararların belirlenmesini ve önlenmesini sağlayacaktır. Günümüzde plastikleştirici maddelerin su ortamındaki davranışları, organizmalar tarafından vcoda alınma mekanizması ve potansiyel toksik etkileri konusunda halen çok az bilgi mevcuttur. Yapılan bu çalışma, plastikleştirici maddelerin çevremizde oluşturabileceği risklerin tespit edilebilmesine kolaylık sağlayabilecek ve gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir.

5. ÖNERİLER

Plastikleştirici maddelerin sucul çevrenin en değerli üyesi olan balıklar üzerinde bazı zararlı etkilere yol açması, balıklarda birikim oluşturarak insan sağlığını da tehdit eder hale gelmesi, bu bileşiklerin daha fazla önemsenmesini gerekli kılmıştır. Bu kimyasalların sucul ortamlara farklı yollardan ulaşmasının önüne geçilmesinin, zararlarının azaltılmasında en etkili yöntem olacağı düşünülmektedir.

Plastik endüstrisi, günümüz dünyasında ekonomik büyümede, sağlık sektöründe ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda plastik malzemelerin ve yan ürünlerin de üretim, geliştirme, taşınma, kullanım ve sonrasında imha işlemleri esnasında farklı ekosistemlerle teması kaçınılmazdır. Bundan dolayı bu maddelerin çevre sağlığı üzerinde oluşturabileceği riskler göz önünde bulundurulmalıdır.

Plastikleştirici maddelerin çevresel düzeylerinin günümüzde çok düşük seviyelerde olduğu düşünülmeyle birlikte bu konuda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle yeni izleme ve ölçme tekniklerinin geliştirilerek ekotoksikolojik çalışmalar vasıtasıyla çevresel seviyelerinin zararlı düzeyde olup olmadığı belirlenmelidir.

Plastikleştirici maddelerin suda çözünmemeleri ve yağ gibi özellik göstermelerinden dolayı, yapılacak çalışmalarda bu maddelerin doğal ekosistemlerde gösterecekleri kararlılığın ve çözünmede diğer organik maddelerin etkisinin araştırılması için yüzey suyu örneklerinden yararlanılmalıdır.

Maruz kalma süresini artırarak gerçekleştirilecek deneylerle canlıların uzun vadede davranışlarındaki değişikliklerin incelenmesi de plastikleştirici maddelerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli bulgular sağlayabilir. Av-avcı ilişkisi içinde olan canlılarla yürütülecek kronik testler vasıtasıyla uzun vadede bu maddelerin izleyeceği yollar ve besin zincirinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adams, W.J., Biddinger, G.R., Robillard, K.A. and Gorsuch, J.W., 1995.** A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1569-1574. DOI: 10.1897/1552-8618
- Alkhatib, C. and Weigand, C., 2002.** Parameters affecting partitioning of 6 PCB congeners in natural sediment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 78, 1-17. DOI: 10.1023/A:1016180422675
- Allen, Y.T., Katsiadaki, I., Pottinger, T.G., Jolly, C., Matthiessen, P., Mayer, I., Smith, A., Scott, A.P., Eccles, P., Sanders, M.B., Pulman, K.G.T. and Feist, S., 2008.** Intercalibration exercise using a stickleback endocrine disrupter screening assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 404-412. DOI: 10.1897/07-228R.1
- Altinok, I., Capkin, E. and Boran, H., 2011.** Influence of bioassay volume, water column height, and octanol-water partition coefficient on the toxicity of pesticides to rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 596-600. DOI: 10.1007/s00128-011-0281-4
- Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Miller, D.H., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovi, D., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, L., Wang, R. and Watanabe, K.H., 2009.** Endocrine disrupting chemicals in fish : Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology*, 92, 168-178. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.01.013
- Anonim, 1999.** Plastic Wrap. www.nsc.org/ehc/minute/em990517.htm. Son erişim tarihi: 02.09.2008.
- Anonim, 2006.** US EPA: Technical factsheet on: Di (2-ethylhexyl) adipate. *Nation Primary Drink Water Reg*, 141, 13-61.
- Anonim, 2009.** Poliklorlu Bifenil Ve Poliklorlu Terfenillerin Kontrolü Hakkında Yönetmelik, Çevre ve Orman Bakanlığı, Resmi Gazete, Sayı: 26739.
- APHA/AWWA/WEF, 1992.** Standart Methods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1, 167 p.
- Arnold, H., Pluta, H.J. and Braunbeck, T., 1996.** Cytological alterations in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to low concentrations of waterborne endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 39-52. DOI: 10.3354/dao025039

- Arnot, J.A. and Gobas, F.A., 2006.** A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 14, 257-297. DOI: 10.1139/A06-005
- Atamanalp, M., 2004.** Akuatik Toksikoloji Ders Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Erzurum, 8 s.
- Avrupa Birliği Direktifleri, 2007.** Committed to Sustainable Development, Ftalatların Çevre ve İnsan Sağlığı Açısından Risk Değerlendirmesi, 10 p.
- Aydın, H., 2004.** PVC Üretimi ve Katkı Maddeleri, Eskişehir.
- Ballschmiter, K. and Zell, M., 1980.** Baseline studies of the global pollution .1. occurrence of organohalogens in Pristine European and Antarctic aquatic environments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 8, 15-35. DOI: 10.1080/03067318008071876
- Barse, A.V., Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K. and Jadhao, S.B., 2007.** Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of *Cyprinus carpio* to diethyl phthalate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 36-42. DOI: 10.1016/j.pestbp.2006.08.009
- Basfar, A.A., 2002.** Flame retardancy of radiation cross-linked poly(vinyl chloride) (PVC) used as an insulating material for wire and cable. *Polymer Degradation and Stability*, 77, 221-226. DOI: 10.1016/S0141-3910(02)00037-X
- Bengtsson, B.E., 1980.** Long- term effects of PCB (Clophen A 50) growth, reproduction and swimming performance in the minnow, *Phonixus phonixus*. *Water Research*, 14, 681-688. DOI: 10.1016/0043-1354(80)90127-X
- Bladen, C.L., Navarre, S., Dynan, W.S. and Kozlowski, D.J., 2007.** Expression of the Ku70 subunit (XRCC6) and protection from low dose ionizing radiation during zebrafish embryogenesis. *Neuroscience Letters*, 422, 97-102. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.05.045
- Brebu, M., Vasile, C., Rovana-Antonie, S., Chiriac, M., Precup, M., Yang, J. and Roy, C., 2000.** Study of the natural ageing of PVC insulation for electrical cables. *Polymer Degradation and Stability*, 67, 209-221. DOI: 10.1016/S0141-3910(99)00114-7
- Cadogan, D., 2002.** Health and environmental impact of phthlates. *Plastics Additives & Compounding*, 4, 28-29.
- Calafat, A.M., Slakman, A.R., Silva, M.J., Herbert, A.R. and Needham, L.L., 2004.** Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *Journal of Chromatography-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 805, 49-56. DOI: 10.1016/j.chromb.2004.02.006

- Cano, J. M., Marin, M.L., Sanchez, A. and Hernandis, V., 2002.** Determination of adipate plasticizers in poly(vinyl chloride) by microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography*, 963, 401-409. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00642-8
- Casadei, R., Pelleri, M.C., Vitale, L., Facchin, F., Lenzi, L., Canaider, S., Strippoli, P. and Frabetti, F., 2011.** Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis. *Gene Expression Patterns*, 11, 271-276. DOI: 10.1016/j.gep.2011.01.003
- Castle, L., Mayo, A. and Gilbert, J., 1989.** Migration of plasticizers from printing inks into foods. *Food Additives and Contaminants*, 6, 437-443.
- Checkik, G. and Koller, D., 2009.** Timing of gene expression responses to environmental changes. *Journal of Computational Biology*, 16, 279-290. DOI: 10.1089/cmb.2008.13TT
- Cho, W.S., Han, B.S., Ahn, B., Nam, K.T., Choi, M., Oh, S.Y., Kim, S.H., Jeong, J. and Jang, D.D., 2008.** Peroxisome proliferator di-isodecyl phthalate has no carcinogenic potential in Fischer 344 rats. *Toxicology Letters*, 178, 110-116. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.02.013
- CPMP, 2000.** The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity, CPMW/SWP/1042/99, 1-9.
- Egbuchunam, T.O., Balköse, D. and Okieimen, F.E., 2007.** Effect of zinc soaps of rubber seed oil (RSO) and/or epoxidised rubber seed oil (ERSO) on the thermal stability of PVC plastigels. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 1572-1582. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.05.002
- Ekelund, M., Azhdar, B., Hedenqvist, M.S. and Gedde U.W., 2008.** Long-term performance of poly(vinyl chloride) cables, Part 2: Migration of plasticizer. *Polymer Degradation and Stability*, 93, 1704-1710. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.030
- EPA, 1993.** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C., EPA/600/4-90/027F.
- Erdogrul, O., Covaci, A. and Schepens, P., 2005.** Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaraş, Turkey. *Environment International*, 31, 703-711. DOI: 10.1016/j.envint.2005.01.002
- European Chemicals Agency, 2008.** ECHA, Member State Committee Support Document for Identification of Dibutyl Phthalate (DBP) As A Substance of Very High Concern.

- European Chemicals Bureau, 2004.** EURAR (European Union Risk Assessment Report), Dibutyl Phthalate, Luxembourg.
- Ezdeşir, A., Erbay, E., Taşkıran, İ., Yağcı, M.A., Cöbek, M. ve Bilgiç, T., 1999.** Polimerler I, PAGEV Yayınları, İstanbul, 17-167 s.
- FAO, 1987.** Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shorterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper Number: 247, Roma, 81 p.
- Felder, J.D., Adams, W.J. and Saeger, V.W., 1986.** Assessment of the safety of dioctyl adipate in freshwater environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5, 777-784. DOI: 10.1897/1552-8618
- Fouad, M.M.K., El Sayed, A.M. and Mahdy, A.N., 1999.** Migration of DINP and DOP plasticisers from PVC sheets into food. *Environmental Management and Health*, 10, 297-302. DOI: 10.1108/09566169910289577
- Gillesby, B.E. and Zacharewski, T.R., 1998.** Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 3-14. DOI: 10.1897/1551-5028
- Goulas, A.E. and Kontominas, M.G., 1996.** Migration of dioctyl adipate plasticizer from food-grade PVC film into chicken meat products: Effect of gamma-radiation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 202(3), 250-255. DOI: 10.1007/BF01263549
- Goulas, A.E., Zygoura, P., Karatapanis, A., Georgantelis, D. and Kontominas, M.G., 2007.** Migration of di(2-ethylhexyl) adipate and acetyltributyl citrate plasticizers from food-grade PVC film into sweetened sesame paste (halawa tehneh): Kinetic and penetration study. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 585-591. DOI: 10.1016/j.fct.2006.10.003
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. and Clesceri, L.S., 1985.** Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition, 541 p.
- Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R., 2000.** Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*, 34, 3003-3011. DOI: 10.1021/es991292a
- Hasselberg, L., Grøsvik, B.E., Goksøyr, A. and Celander, M.C., 2005.** Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology*, 4, 2, 2005. DOI: 10.1186/1476-5926-4-2
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. and Angerer, J., 2007.** Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 623-634. DOI: 10.1016/j.ijheh.2007.07.011

- Hu, X., Wen, B., Zhang, S. and Shan, X., 2005.** Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 26-34. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.02.012
- Huang, P.C., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y. and Lee, C.C., 2008.** Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor, *Chemosphere*, 73, 539-544. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.019
- Jaworska, J.S., Hunter, R.S. and Schultz, T.W., 1995.** Quantitative structure-toxicity relationships and volume fraction analyses for selected esters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 86-93.
- Keskin, Ş., 1996.** Plastik İşleme Teknikleri ve Kalite Kontrol, TMMOB, Kimya Mühendisleri Odası, Plastikler, 139-145 s.
- Kim, G.W., Noshita, N., Sugawara, T. and Chan, P.H., 2001.** Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 32, 1401-1407.
- Klauning, J.E., 2000.** Pesticide Toxicology, Evaluating Safety and Risk, Purdue Pesticide Programs, Purdue University Cooperative Extension Service, PPP-40, Indiana University School of Medicine.
- Koch, H.M., Drexler, H. and Angerer, J., 2003.** An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 77-83. DOI: 10.1078/1438-4639-00205
- Kurt-Çömlekçi, G. ve Ulutan, S., 2010.** Plastik ve Ambalaj Teknolojisi, Ekim 2010, 66-70 s.
- Kurt-Çömlekçi, G., 2011.** Water Vapor Transport Properties of Plasticized PVC Films. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Kusk, K.O., Krüger, T., Long, M., Taxvig, C., Lykkesfeldt, A.E., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Andersen, H.R., Hansen, K.M.S., Nellemann, C. and Bonfeld-Jørgensen, E.C., 2011.** Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 413-426. DOI: 10.1002/etc.385
- Laufer, B. and Nation, P.A., 1999.** Vocabulary-size test of controlled productive ability. *Language Testing*, 16, 36-55 p.
- Laughlin, R.B., Neff, J.M., Hrungr, Y.C., Goodwin, T.C. and Giam, C.S., 1978.** The effects of three phthalate esters on the larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (Holthuis). *Water, Air & Soil Pollution*, 9, 323-336.

- Leblond, V.S., Bisson, M. and Hontela, A., 2001.** Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*O. mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *General and Comparative Endocrinology*, 121, 1, 48-56. DOI: 10.1006/gcen.2000.7556
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H. and Choi, J., 2006.** Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, 65, 1074-1081. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.02.042
- Loomis, T.A., 1978.** *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232 p.
- Lu, C. and King, R.D., 2009.** An investigation into the population abundance distribution of mRNAs, proteins, and metabolites in biological systems. *Bioinformatics*, 25, 2020-2027. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp360
- Marcilla, A., Garc, S. and Garcia-Quesada, J.C., 2008.** Migrability of PVC plasticizers. *Polymer Testing*, 27, 221-233. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2007.10.007
- Marcilla, A., Garcia, S. and Garcia-Quesada, J.C., 2004.** Study of the migration of PVC plasticizers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71, 457-463. DOI: 10.1016/S0165-2370(03)00131-1
- McCarthy, J.F. and Whitmore, D.K., 1985.** Chronic toxicity of di-n-butyl and di-n-octyl phthalate to *Daphnia magna* and the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4, 167-179. DOI: 10.1897/1552-8618
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P. and Collins, A., 1993.** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*, 288, 47-63. DOI: 10.1016/0027-5107(93)90207-V
- Mozaffarian, D. and Rimm, E.B., 2006.** Fish intake, contaminants, and human health: Evaluating the risks and the benefits. *Journal of The American Medical Association*, 296, 1885-1899. DOI: 10.1001/jama.296.15.1885
- Murado, M.A. and Prieto, M.A., 2013.** NOEC and LOEC as merely concessive expedients: Two unambiguous alternatives and some criteria to maximize the efficiency of dose-response experimental designs. *The Science of the Total Environment*, 461, 576-586. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.098
- Mylichreest, E., Cattley, R.C. and Foster, P.M., 1998.** Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism, *Toxicological Sciences*, 43, 47-60. DOI: 10.1093/toxsci/43.1.47

- Neumann, N.F. and Galvez, F., 2002.** DNA microarrays and toxicogenomics: Applications for ecotoxicology. *Biotechnology Advances*, 20, 391–419, 2002. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00025-3
- Ng, K.W., Khoo, S.P.K., Heng, B.C., Setyawati, M.I., Tan, E.C., Zhao, X.X., Xiong, S.J., Fang, W.R., Leong, D.T. and Loo, J.S.C., 2011.** The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 8218-8225. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.036
- Nowak, B., 1992.** Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. *Aquatic Toxicology*, 23, 65-83. DOI: 10.1016/0166-445X(92)90012-C
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kresten, O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, R., Kusk, O. and Tyler, C.R., 2009.** A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 364, 2047-2062. DOI: 10.1098/rstb.2008.0242
- Okubo, T., Suzuki, T., Yokoyama, Y., Kano, K. and Kano, I., 2003.** Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay in Vitro. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26, 1219-1224.
- Oliveira, M., Maria, V.L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M. and Santos, M.A., 2009.** Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*-an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 157, 959-967. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.10.019
- Pant, N., Shukla, M., Patel, D.K., Shukla, Y., Mathur, N., Gupta, Y.K. and Saxena, D.K., 2008.** Correlation of phthalate exposures with semen quality. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, 112-116. DOI: 10.1016/j.taap.2008.04.001
- Plastics Europe, 2008.** Association of Plastics Manufacturers. Home, Discover Plastics, Plastics Materials, PET. <http://www.plasticseurope.org>. Son erişim tarihi: 08.05.2014.
- Quingyu, M., Shaogang, C. and Xiaobai, X., 2001.** Sorption phenomena of PCBs in environment. *Chinese Science Bulletin*, 46, 89-97.
- Rand, G.M., 1995.** *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Second Edition, ISBN 1-56032-090-7, 1148 p.
- Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W. and McCall, D., 2002.** Alternative methods for the median lethal dose (LD50) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity. *ILAR Journal*, 43, 233-243.

- Rudel, R.A., Camann, D.E., Spengler, J.D., Korn, L.R. and Brody, J.G., 2003.** Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental Science & Technology*, 37, 4543-4553. DOI: 10.1021/es0264596
- Saito, I., Onuki, A. and Seto, H., 2001.** Determination of organic phosphate triesters in indoor and outdoor air. *Journal of Aerosol Research*, 16, 209-216. DOI: 10.11203/jar.16.209
- Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E. and Marins, L.F., 2009.** Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology*, 95, 285-291. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.02.016
- Saygi, S., Deniz, G., Kutsal, O. and Vural, N., 1991.** Chronic effect of cadmium on kidney, liver, testes and fertility of male rats. *Biological Trace Element Research*, 31, 209-214.
- Sebaugh, J.L., 2011.** Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128-134. DOI: 10.1002/pst.426
- Sen, A., Ulutas, O.K., Tutuncu, B., Ertas, N. and Cok, I., 2010.** Determination of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) induction in leaping mullet (*Liza saliens*) from the highly contaminated Aliaga Bay, Turkey. *Environmental Monitoring & Assessment*, 165, 87-96. DOI: 10.1007/s10661-009-0928-3
- Shen, H., 2005.** Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods. *Talanta*, 66, 734-739. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.12.021
- Staples, C.A.S., Dams, W.J.A., Arkerton, T.F.P., Orsuch, J.W.G., Iddinger, G.R.B. and Einert, K.H.R., 1997.** Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Environmental Toxicology Reviews*, 16, 875-891. DOI: 10.1002/etc.5620160507
- Suter, L., Babiss, L.E. and Wheeldon, E.B., 2004.** Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chemistry & Biology*, 11, 161-171. DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.02.003
- Şişman, T., 2007.** Poliklorlubifenil Bileşiklerinin *Danio rerio*'nun (Zebra balığı) Gelişimi Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum, 107 s.
- Travis, C.C. and Hester, S.T., 1991.** Global chemical pollution. *Environmental Science & Technology*, 25, 814-819. DOI: 10.1021/es00017a001
- Tyler, C.R., Filby, A.L., van Aerle, R., Lange, A., Ball, J., Santos, E.M., Christer H. and Peter, K., 2008.** Fish toxicogenomics. *Advances in Experimental Biology*, 2, 324-325.

- Ulutan, S., Yapar, S., Kocagül, A.Ş. ve Tüzüm-Demir, P., 2006.** PVC/DOP nanokil kompozitlerinin ısı davranışı. I. Polimerik Kompozitler Sempozyumu, Bildiri Kitabı, 17-19 Kasım 2006, KMO Ege Bölge Şb., İzmir, 405-416 s.
- Ünsal, M., 1998.** Kirlilik Deneyleri-Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi, T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No:11, 168 s.
- Verweij, F., Booijb, K., Satumalaya, K., Molena, van der N. and Oosta, van der R., 2004.** Assessment of bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp. *Chemosphere*, 54, 1675-1689. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.002
- Vural, N., 1977.** Toxicological assessment of plastic food containers used in Turkey. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 7(2):163-181.
- Watanuki, H., Gushiken, Y. and Sakai, M., 2003.** In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells by Di-n-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate. *Aquatic Toxicology*, 63, 119-126. DOI: 10.1016/S0166-445X(02)00172-8
- Wensing, M., Uhde, E. and Salthammer, T., 2005.** Plastics additives in the indoor environment - flame retardants and plasticizers. *Science of the Total Environment*, 339, 19-40. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.10.028
- Wormuth, M., Scheringer, M., Vollenweider, M. and Hungerbühler, K., 2006.** What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Analysis*, 26, 803-824. DOI: 10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x
- Xu, Z.P., Saha, S.K., Braterman, P.S. and D'Souza, N. 2006.** The effect of Zn, Al layered double hydroxide on thermal decomposition of poly(vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability*, 91, 3237-3244. DOI: 10.1016/j.polyimdeggradstab.2006.07.006
- Yaşar, H., 2001.** Plastikler Dünyası, MMO Yayınları, Ankara, 2. Baskı, (3-89,97,107,112,115,116,118,119,121,123,125,127,131,132).
- Yauk, C.L. and Berndt, M.L., 2007.** Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48, 380-394. DOI: 10.1002/em.20290
- Yılmaz, F., 1998.** Plastik & Ambalaj Teknolojisi, Eylül sayı 28.
- Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H. and Lv, L., 2013.** Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 136-137, 49-59. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.03.019

Zhu, L.S., Dong, X.L., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Su, J. and Yu, C.W., 2011.
DNA damage and effects on glutathione-S transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 26, 480-488.
DOI: 10.1002/tox.20575

Zygoura, P.D., Goulas, A.E., Riganakos, K.A. and Kontominas, M.G., 2007.
Migration of di-(2-ethylhexyl)adipate and acetyltributyl citrate plasticizers from food-grade PVC film into isooctane: Effect of gamma radiation. *Journal of Food Engineering*, 78, 870-877. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.12.004



ÖZGEÇMİŞ

Serap TERZİ, 1987 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini 2004 yılında Trabzon'da tamamladı. 2008 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksekokulu Su Ürünleri Bölümü'nden mezun olduktan sonra 2010 yılında başladığı lisans eğitimini 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü'nde tamamladı. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilimdalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir.

