ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nikel ve Çinko Nanopartiküllerinin Midye (*Unio delicatus*) Antioksidan Sistemi Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi

Sihem GÖZEOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Nikel ve Çinko Nanopartiküllerinin Midye (*Unio delicatus*) Antioksidan Sistemi Üzerine Olan Etkilerinin Incelenmesi

Sihem GÖZEOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 01/12/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI (Danışman) ……

: Prof. Dr. Mustafa CANLI ……

: Prof. Dr. Tamer KAYIŞ ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-16272

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VII
1. GİRİŞ 1
1.2. Metal Nanopartikülleri 3
1.3. Nanopartiküllerin Sucul Ekosistemlere Etkileri 5
1.4. Midyeler (Bivalvialar) 6
1.5. Hepatopankreas 13
1.6. Antioksidan Sistem 14
1.6.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Genel Özellikleri 14
1.6.2. Antioksidanlar 19
1.6.3. Organik Biyomoleküller ve Enerji Metabolizması 22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 25
3. MATERYAL VE METOT 33
3.1. Materyal 33
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 33
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 34
3.2. Yöntem 34
3.2.1. Antioksidan Sistem Parametreleri Ölçümü 35
3.2.2. Organik Madde Ölçümü Analizleri 39
3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 43
3.2.4. İstatistiksel Analizler 45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 47
4.1. Bulgular 47
4.1.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi 47
4.1.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi 48
4.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi 50
4.1.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi 51
4.1.5. Organik Madde Ölçümleri 53
4.2. Tartışma 54
4.2.1. İyonik ve Nanopartikül Metal Formlarının Antioksidan Sistem Üzerindeki Etkileri 55
4.2.2. NiO ve ZnO nanopartiküllerinin etkileri 56

4.2.3. İyonik ve nanopartikül metal formlarının enerji metabolizmasındaki etkileri 58
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....61
5.1. Sonuçlar.....61
5.2. Öneriler.....61
KAYNAKLAR.....63
ÖZGEÇMİŞ 75

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nikel ve Çinko Nanopartiküllerinin Midye (*Unio delicatus*) Antioksidan Sistemi Üzerine Olan Etkilerinin Incelenmesi

Sihem GÖZEOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Midyeler yerleşik yaşam biçimleri ve suyu filtre ederek beslenmeleri nedeniyle sucul ortamlar için önemli biyoindikatör hayvanlardır. Bu çalışmada, nikel (NiO) ve çinko (ZnO) nanopartiküllerinin (18 nm) farklı derişimleri (0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/L) etkisinde 14 gün kalan tatlı su midyelerinin (*Unio delicatus*) antioksidan sistemlerinin tepkileri ve enerji kaynakları olan organik moleküllerin (karbonhidrat, lipit, protein) düzeyleri incelenmiştir. Midyelerin beslenmesi laboratuvarda üretilen tek hücreli alglerle (*Cholorella vulgaris*) yapılmıştır (250.000 alg/ml). Deneyler sonunda, midye mortalitesi görülmemekle beraber, nanopartiküllerin midyelerin hepatopankreas dokusunda antioksidan sistem enzimleri üzerinde anlamlı etkilerinin olduğu görülmüştür. NiO ve ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerde katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon S-transferaz aktivitelerinde anlamlı ($p<0.05$) değişimler görülmüştür. Diğer taraftan, en yüksek derişiminde ilk enerji kaynakları olan glikoz ve lipit düzeylerinde anlamlı ($p<0.05$) azalmalar olurken, protein düzeyinde bir değişim gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bu çalışmanın verileri NiO ve ZnO nanopartikülünün midyelerde oksidatif strese neden olduğunu ve hayvan metabolizmasının bu durumu düzeltmek amacıyla enerji tüketimini artırdıkları şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metal Nanopartikül, Midye, Antioksidan, Hepatopankreas, Organik Madde

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Investigation of the Effects of Nickel and Zinc Nanoparticles on the Antioxidant System of Mussels (*Unio delicatus*)

Sihem GÖZEOĞLU

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Esin Gülnaz CANLI

Department of Biology

ABSTRACT

Mussels are important bioindicator organisms for aquatic environments due to their sessile lifestyle and filter-feeding habits. In this study, the responses of antioxidant systems and the levels of organic molecules that serve as energy sources (carbohydrates, lipids, and proteins) were investigated in freshwater mussels (*Unio delicatus*) exposed for 14 days to different concentrations (0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/L) of nickel (NiO) and zinc (ZnO) nanoparticles (18 nm). The mussels were fed in the laboratory with cultured unicellular algae (*Chlorella vulgaris*) at a concentration of 250.000 cells/mL. At the end of the experiments, no mortality was observed among the mussels; however, the nanoparticles had significant effects on antioxidant enzyme activities in the hepatopancreas tissue. Significant ($p<0.05$) changes were detected in the activities of catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and glutathione S-transferase in mussels exposed to NiO and ZnO nanoparticles. Furthermore, at the highest concentration, significant ($p<0.05$) decreases were observed in glucose and lipid levels—the primary energy sources—while no significant change ($p>0.05$) was detected in protein levels. These findings indicate that exposure to NiO and ZnO nanoparticles induces oxidative stress in mussels and that the animals increase their energy consumption as a compensatory response to counteract this stress.

Keywords: Metal Nanoparticle, Mussel, Antioxidant, Hepatopancreas, Organic Molecules

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince görüşlerini ve desteğini benden eksik etmeyen, deneylerimin sürdürülmesi esnasında yardım eden ve yol gösterici olan danışmanım Doç. Dr. Esin Gülnaz CANLI'ya teşekkürlerimi sunarım. Sınav jürimde yer alan Prof. Dr. Mustafa CANLI ve Prof. Dr. Tamer KAYIŞ hocalarıma da tezimde yapmış oldukları katkılardan dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Aynı zamanda bu süreçte Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na da çok teşekkür ediyorum. Ayrıca anlayışı ve desteğiyle her zaman yanımda olan eşim Mehmet GÖZEOĞLU'na ve sevgisiyle bana güç veren oğlum Giray GÖZEOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Reaktif nitrojen türleri 15
Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri 15
Çizelge 3.1. CAT aktivitesi ölçümü yöntemi 36
Çizelge 3.2. GPx aktivitesi ölçümü yöntemi 37
Çizelge 3.3. GR aktivitesi ölçümü özet tablosu 38
Çizelge 3.4. GST aktivitesi ölçümü özet tablosu 39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Doğada Ağır Metal Birikimi. Dijital Kaynak 1 2
Şekil 1.2. Ni-NP'in tıpta yapay deri olarak kullanılması 5
Şekil 1.3. Bissus iplikçikleri ile tutunan midyeler 7
Şekil 1.4. Bir midyenin anatomik ve morfolojik özellikleri. 7
Şekil 1.5. Kavkı ve manto 8
Şekil 1.6. Midyenin iç yapısı 9
Şekil 1.7. Tatlı su midyesinin yaşam döngüsü 10
Şekil 1.8. Bivalviaların boşaltım sistemi 11
Şekil 1.9. Gıda olarak tüketimi 12
Şekil 1.10. Katalaz enziminde hem grubu görünümü 20
Şekil 1.11. GST reaksiyonu 21
Şekil 3.1. Tatlı su midyesi *Unio delicatus* Lea, 1863. Gölbaşı, Hatay 33
Şekil 3.2. Protein standart rekreasyon eğrisi. 40
Şekil 3.3. Karbonhidrat standart rekreasyon eğrisi 42
Şekil 3.4. Lipit tayini standart rekreasyon eğrisi 43
Şekil 3.5. NiO (A) ve ZnO (B) nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsü. 44
Şekil 3.6. NiO nanopartikülünün XRD deseni. 44
Şekil 3.7. ZnO nanopartikülünün XRD deseni. 45
Şekil 4.1. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda CAT aktivitesi.. 47
Şekil 4.2. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda CAT aktivitesi.. 48
Şekil 4.3. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GPX aktivitesi.. 49
Şekil 4.4. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GPX aktivitesi. 49
Şekil 4.5. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GR aktivitesi.. 50
Şekil 4.6. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GR aktivitesi. 51
Şekil 4.7. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi.. 52
Şekil 4.8. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi. 52

Şekil 4.9. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda glikoz, protein ve lipit düzeyleri. 53
Şekil 4.10. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda glikoz, protein ve lipit düzeyleri.. 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

μm : Mikrometre
BAL : British Anti-Lewisite / Dimercaprol
CAT : Katalaz
DMPS : Dimerkaptopropanesulfonik Asit
DMSA : Dimerkaptosüksinic Asit
EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit
GPX : Glutatyon peroksidaz
GR : Glutatyon redüktaz
GST : Glutatyon S-transferaz
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IgG : İmmünoglobülin G
Kcal : Kilo kalori
mm : milimetre
mtDNA : Mitokondrial DNA
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Nm : Nanometre
NP : Nanopartikül
p53 : Tümör Baskılayıcı Protein
PSU : Practical Salinity Unit
SOD : Süperoksit Dismutaz
TEM : Transmission Electron Microscope
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

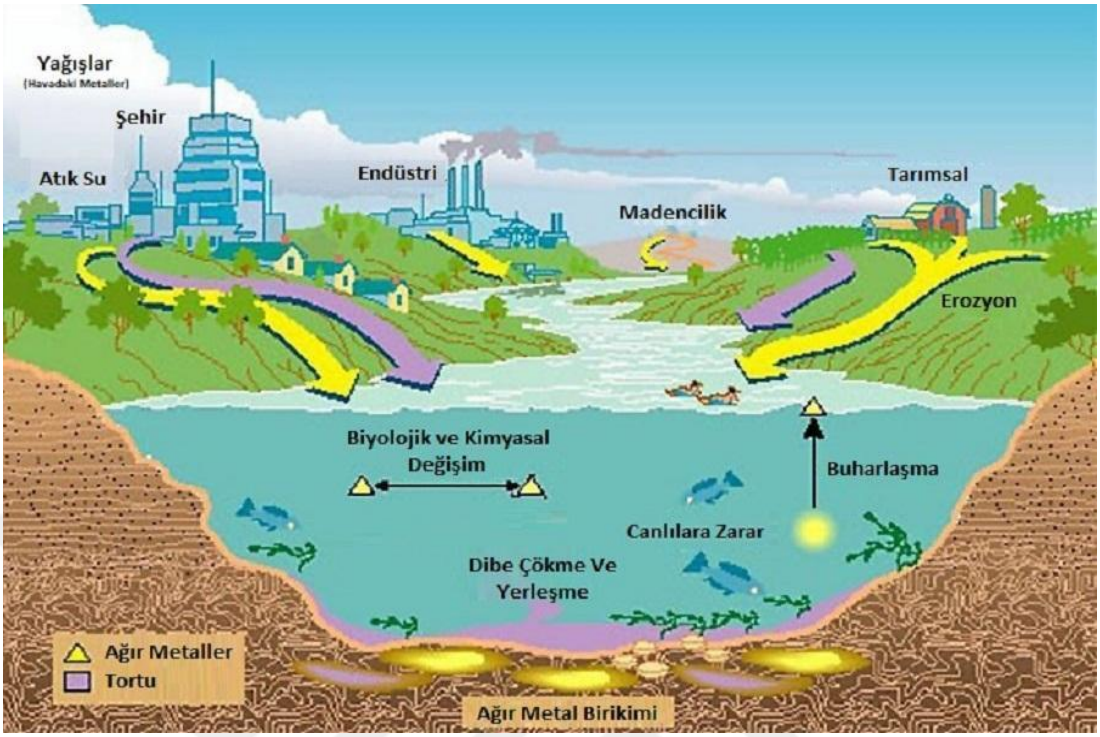
1. GİRİŞ

1.1. Ağır Metaller

Dünya nüfusunun hızla artması nedeniyle günümüz insanları tüketim toplumuna dönüşmüştür. Tüketimin artması da madencilik ve sanayileşmenin hız kazanmasına ve tarım arazilerinin yetersizliğine neden olmuştur. Bu durum, dünyada gıda sorununun önlenebilmesi için daha fazla sanayileşmeyi beraberinde getirmiş ve sonuçta çevreye daha fazla ksenobiyotik salınmasına sebep olmaktadır. Çevreye salınan bu ksenobiyotiklerden ağır metaller düşük oranlarda sucul ortamlarda normalde de bulunmaktadır. Yüzyıllardır insanlar metalleri işleyerek kullanmışlardır. Ağır metaller, genellikle yüksek yoğunluğa (5 g/cm³'ün üzerinde) ve toksik etkiye sahip olan metal veya metaloidleri ifade etmektedir. Periyodik tabloda çoğu geçiş metali grubunda yer alır. ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA); Cd, Cr, As, Hg, Pb, Cu, Zn ve Ni gibi ağır metalleri, zararlı, kalıcı ve geri döndürülemez özellikleri nedeniyle öncelikli kontrol edilen kirleticiler arasında sınıflandırmıştır (Chen ve ark. 2015). Örneğin bu metaller arasında Zn ve Cu, insanlar, hayvanlar ve bitkiler için belirli düzeylerde yaşamsal faaliyetler için gereklidir ancak bu metallerin aşırı miktarlarda alınması durumunda toksik etkileri olabilmektedir. Buna karşılık, Cd, Hg ve As gibi metaller ise biyolojik olarak gerekli değildir ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki göstermektedir (Rai ve ark., 2019). Cd, U ve As gibi ağır metallerin biyolojik olarak parçalanmasının çok zor olduğu, bunların besin zincirinde birikimi ve sonunda insanlara kadar ulaşarak toksisiteye sebep olduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2023).

Ağır metaller hem doğal yollarla (kayaçların erozyonu, volkanik faaliyetler vb.) hem de insan faaliyetleriyle (sanayi, madencilik, tarım ilaçları, yakıt kullanımı, elektronik atıklar vb.) çevreye yayılabilmektedir. Ancak artan nüfusla beraber sanayinin hız kazanması ile doğaya salınımları (gaz, sıvı, katı) çok fazla artmıştır ve toksisiteleri nedeniyle geçmiş yıllarda birçok toplu ölüm felaketleri yaşanmıştır. Bu felaketlerden birisi, 1950'lerde görülen Minimata körfezi (Japonya) olayında cıva ile kontamine olan balıklarla beslenen insanlarda sakatlanmalar ve hatta can kayıpları yaşanmıştır (Mance, 1987). Bir kimya fabrikası, metil cıva içeren atıklarını Minamata Körfezi'ne boşalttığından balık ve deniz ürünleri tüketen binlerce insan zehirlenerek sinir sistemi hasarları, doğum kusurları ve ölümler meydana gelmiştir. Diğer bir olay ise 1930-1960 yıllarında Jinstsu nehrine bir madencilik şirketi fazla seviyede kadmiyum boşaltarak bu bölgedeki, tarım arazilerinde yetişen pirinçlerle beslenen insanlarda "itai itai" hastalığı görülmüş (Goyer, 1991) ve bu hastalık neticesinde kemik yumuşaması, böbrek yetmezliği ve dayanılmaz kemik ağrıları görülmüştür. Yine Zambiya'da Kabwe'deki kurşun ve çinko madenleri 1900'lerin başından itibaren kontrolsüz şekilde işletilerek bölgede yaşayan çocuklarda dünya ortalamasının katbekat üzerinde kurşun seviyeleri tespit edilmiş, zihinsel gelişim geriliği ve ciddi sağlık sorunları ortaya çıkmıştır. Bu facia nedeniyle Pearl Earth Uluslararası Çevre Örgütü tarafından Kabwe, "dünyanın en kirli şehirlerinden biri"olarak kabul edilmektedir. Bir başka örnek, Çin'deki Pearl River Deltası'ndan avlanılan

tilapya balıklarında yüksek düzeyde Pb (8,62 mg/kg) tespit edilmiştir (Leung ve ark., 2014).



Şekil 1.1. Doğada Ağır Metal Birikimi. Dijital Kaynak 1

Ağır metaller insanlar veya hayvanlar tarafından hava, su veya besin ile alındığında çeşitli dokularda veya hayvanın bütün vücudunda birikmektedir. **Biyolojik** olarak parçalanamadığından uzun süre çevrede kalırlar ve besin zincirinin farklı halkalarında dolaşırlar (Yan ve ark., 2018). Ayrıca ağır metallerin biyobirikimi ve biyomagnifikasyonu, besin zincirinin çeşitli basamaklarında meydana gelmekte ve nihai olarak insana ulaşarak insan sağlığını etkilemektedir. Bu elementler, azot, kükürt ve oksijen içeren biyolojik bileşiklere bağlanarak proteinlerin, enzimlerin, hormonların ve diğer biyomoleküllerin yapısını ve işlevlerini etkileyebilmektedir. Oluşan stres, organizmanın enerji düzeylerini bozarak enerji gereksinimlerini karşılamak için protein ve lipitlerin mobilize edilmesine neden olmaktadır (Banday ve ark., 2019). Ağır metallerin detoksifikasyonunda en etkili tıbbi yöntem şelasyon uygulanmasıdır. Şelat oluşturma ligant denen yüklü veya yüksüz elektron vericiler ile metal iyonlarının etkileşmesi sonucu meydana gelmektedir. Şelatör maddeler metallerle bağlanarak onların idrar veya dışkı yoluyla atılmasını sağlar. Şelattörler su ortamından metallerin hayvanlar tarafından tarafından da alınmasını etkiler.

Kullanılan en yaygın şelatörler:

EDTA (Etilendiamintetraasetik asit): Kurşun, kalsiyum gibi metaller için kullanılır. DMSA (Dimerkaptosüksinic Asit): Kurşun, cıva, arsenik için yaygın kullanılır.

DMPS (Dimerkaptopropanesulfonik Asit): Özellikle cıva için etkilidir.

BAL (British Anti-Lewisite / Dimercaprol): Arsenik ve kurşun için yaygın kullanılır.

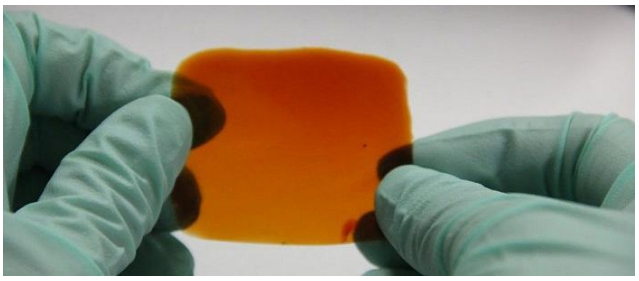
1.2. Metal Nanopartikülleri

Nano kelimesi, Uluslararası Birim Sistemi'nde 10^{-9} yani bir milyarda bir anlamına gelmektedir. Ayrıca kelime anlamı olarak da yunanca ve latincede 'cüce' anlamına gelmektedir. Maddeler nano boyutlara geldiğinde ışığı ve elektriği iletmeyen veya sert yapıda olmayan maddeler tam tersi özellikler gösterebilmektedirler (Mark vd., 2007; Crane vd., 2008). Bu özellikleri nedeniyle sanayide kullanım alanları daha cazip hale gelmektedir.

Nanoteknoloji ilk olarak, fizikçi Richard Feynman'ın 1959 yılında malzemelerin ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi amacıyla başlamıştır. Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte metaller günümüzde daha yaygın olarak nanopartikül formunda karşımıza çıkmaktadır. Mühendislik ürünü metal oksit nanopartiküllerinin genellikle (1-100 nm) aralığında küçük boyutlara sahip olması, geniş yüzey alanı, elektronik, optik ve kristal özellikleri, özgün yüzey yapıları, fonksiyonel grupları, reaktiviteleri, şekilleri, çökelme davranışları, organik ve inorganik kaplamaları onları daha kullanışlı hale getirmiştir (Handy ve Shaw, 2007). Ayrıca nanopartiküllerin yüzeyine proteinler tutunabilmektedir ve bu bağlanma proteinlerin türü ve nanopartikül özelliklerine bağlıdır (Cedervall ve ark., 2007). Tüm bu özellikleri nedeniyle son derece özgün olup, son yıllarda hızlı bir şekilde insan yaşamının her türlü kullanım alanında yer almaktadır. Özellikle nanobiyoteknoloji uygulamaları, yaşam kalitesinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Tekstil, beyaz eşyalar, ilaç endüstrisi, diş macunu, filtreler, güneş kremi, boyalar, nemlendirici, çocuk oyuncakları, enerji üretimi, su arıtımı, paketleme ürünleri, besin endüstrisi ve elektronik cihazlar gibi kullanım alanları ile yaşamımızın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Metal nanopartiküllerinden antimikrobiyal etkilerinden dolayı gümüş ve bakır nanopartikülleri tercih edilmekte olup, antibakteriyel ve antifungal ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin küçük boyutları nedeniyle organizmalar tarafından daha kolay alınabildikleri ve çevrede daha uzun süre kalabildikleri bilinmekle birlikte, bu etki boyuta bağlı dışsal bir özelliktir (Auffan ve ark., 2009). Daha küçük boyut, parçacıkların reaktivitesinin artmasına ve çeşitli özelliklerinin değişmesine neden olur; bu da biyoloji ve tıpta birçok yeni uygulama alanının açılmasını sağlamaktadır. NP'lerin kendine özgü özellikleri arasında artmış reaktivite ve hücre zarlarına girme yeteneğinin yüksek olması da bulunmaktadır (Oberdörster ve ark., 2005). Böylece, nanoteknoloji alanı son yirmi yılda büyük bir gelişme göstererek laboratuvar aşamasından uygulamalı teknolojilere geçiş yapmıştır. Bu gelişmeler ve kullanım sıklığı artışı ile nanopartiküllerin güvenliği ile ilgili sorular düşündürücü hale gelmektedir (Najahi-Missaoui ve ark., 2020). Uluslararası düzeyde nanopartikül teknolojisinin ve nano ürünlerin önemli hale gelmesi ve kullanım düzeyinin giderek artmasıyla beraber Çevre Koruma Örgütü (EPA) başta olmak üzere bu ürünlerin Amerika ve Avrupa'da birçok kurum tarafından olumsuz etkilerinin tespit edilmesi araştırmalarına başlanmıştır (Wiesner ve ark., 2006).

Çinko canlılar için esansiyel bir element olup, belli bir konsantrasyondan fazlası toksik etki göstermektedir. Hatta düşük düzeylerde çinkonun hücresel savunmaları uyarırken, yüksek düzeylerde toksisiteye ve oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Franco ve ark., 2006). Çinkonun alınım düzeyleri ve etkileri bilinirken, nanopartikül formu ile ilgili yeterince bilgi bulunmamaktadır. Metal nanopartikülleri arasında yıllık küresel üretimi 550 ile 10.000 ton arasında tahmin edilen ZnO nanopartikülleri, SiO_2 ve TiO_2'den sonra en çok üretilenler içinde üçüncü sırada bulunmaktadır. Bu yaygın kullanım, üretilen toplam ZnO NP miktarının yaklaşık %95'inden fazlasının çevreye girmesine yol açmaktadır (Wu ve ark., 2025). Zn nanopartikülleri genellikle küresel, çubuk veya plaka şekillerinde olabilmektedir. En yaygın formları elemental Zn, ZnO ve bazen ZnS gibi bileşiklerdir. En sık kullanılan formu ise ZnO NP'dir. Sucul ekosistemlere giriş yolları endüstriyel atık suları, arıtma tesisi çıkışları, kozmetik ürünler, boya ve kaplama kalıntıları, atık deşarjları gibi yollarla yüzey sularına ulaşabilmektedir. ZnO NP'ler, su ortamında çözünerek Zn^{2+} iyonu salabilir ve bu iyonlar da toksiktir. Literatürde yapılan çalışmalar, kıyı ve haliç sularında sıcaklık ve tuzluluğun mevsimsel ve bölgesel olarak değiştiğini, midyelerin yüksek sıcaklık ve tuzlulukta partikül filtrasyonu yoluyla daha fazla çinko biriktirdiğini ve böylece ZnO-NP toksisitesinin arttığını ortaya koymuştur (Lai ve ark., 2023). pH ve iyonik şiddet gibi çevresel faktörlere bağlı olarak partiküller birleşerek agregasyona uğrayabilmektedir. Çinko oksit nanoparçacıkları, kütle halindeki (bulk) formlarına kıyasla gelişmiş özelliklere sahiptir ve bu nedenle enerji üretimi, tıp ve kimya endüstrisi gibi birçok sektörde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Williams ve ark., 2019). Özellikle, geliştirilmiş opaklıkları ve UVA spektrumunda geniş ışık emilimi sayesinde mineral güneş kremlerinde giderek daha fazla tercih edilmektedirler (Schneider ve Lim, 2019).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC Monographs), insanlarda kanserojen risklerin değerlendirilmesinde nikel (Ni) bileşiklerini 1. sınıf kanserojen maddeler olarak sınıflandırmıştır (I.A.R.C. and WHO, 1990). Metalik nanomalzemeler arasında nikel nanopartikülleri en yaygın kullanılan türlerden biridir (Griffitt ve ark., 2008). Elementel nikel (Ni^0) ve nikel oksit (NiO) formunda bulunabilirler. Küresel ya da düzensiz şekilli olabilmektedirler. Ni NP'ler, yüksek yüzey enerjisi, yüksek manyetizma, düşük erime noktası, yüksek yüzey alanı ve düşük yanma noktası gibi yeni özelliklere sahip ürünler vermektedir. Ayrıca katalizörler, manyetik malzemeler, biyomedikal uygulamalar, otomobil katalitik konvertörleri, lityum iyon pilleri, iletken macun, elektrokimyasal sensörler ve biyosensörler gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Hatta kendini iyileştirme özelliği bulunan ve yapay deri olarak kullanılabilen nikel nanopartikül takviyeli polimerler, tıp alanında yenilikler sunmaktadır (Şekil 1.2). Bu kadar yaygın kullanımı doğrultusunda maruziyet kaçınılmaz hale gelmekte, ancak sağlık ve çevresel etkileri ve toksisiteleri halen tam olarak açıklanamamıştır.



Şekil 1.2. Ni-NP'in tıpta yapay deri olarak kullanılması

1.3. Nanopartiküllerin Sucul Ekosistemlere Etkileri

Özellikle tüm kirleticilerin olduğu gibi nanopartiküllerin de doğada son varış yeri sucul ekosistemler olmaktadır. Ekotoksikolojik çalışmalarda sucul organizmalar besin zincirinde önemli bir yere sahiptir. Dipte yaşayan sucul canlılardaki alınım, suda yaşayan diğer organizmalarda birikimin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ilk araştırılması gereken, kolloit partiküller ve nanopartiküllerin sedimentlerle ilişkisi, küçük partiküllerin hidrodinamik davranışları, toksisitenin artmasına sebep olan ve diğer kimyasal kirleticiler ile oluşan sinerjistik etki, metallere ve lipofilik organik bileşiklere bağlanma özellikleri, canlıların vücuduna girme şekilleri, yüzey yapısı, parçacık boyutu ve su ekosistemleri üzerine etkileridir (Moore, 2006). Nanopartiküller su ortamında pH, iyonik kuvvet ve organik madde ile etkileşerek çökelip biyoalınımı değiştirebilmektedir. Nanopartiküllerin üretimi ve kullanımı arttıkça, bunlar özellikle kanalizasyon, çöplükler, genel yüzey akışı ve diğer noktasal veya yayılı kaynaklardan girdiler alan su ortamlarına girecektir. Ayrıca yağmurla toprak yüzeylerinden su sistemlerine taşınabilmektedir.

Günümüzde nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla modelleme teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. TiO_2 nanopartikül konsantrasyonunun İskandinav sucul ekosistemlerinde yapılan bir araştırmada 0,0007-0,0245 µg/L aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Mueller ve Nowack, 2008; Perez vd., 2009). Birleşik Krallık'ta doğal ortamlarda çinko oksit nanopartkülleri konsantrasyonlarının tahminleri, suda 100 µg/L'nin altında, toprakta ise birkaç mg/kg düzeyinde değişmektedir (Boxall ve ark. 2007). Başka bir çalışmada ise, suda 76 µg/L, toprakta 3194 µg/kg çinko oksit nanopartİkülünün tahmini çevresel konsantrasyon (PEC) değerleri bildirilmiştir (Ferreira da Silva ve ark. 2011). Her ne kadar bu PEC değerleri düşük olsa da, ZnO nanopartikülünün yaygın kullanımı göz önüne alındığında, çevredeki seviyelerin zamanla artması beklenmektedir (Corsi ve ark. 2014). Çeşitli araştırmalara göre, 2010 yılında küresel ZnO nanopartikülü üretimi yıllık 1000 ton civarında tahmin edilmiştir (Piccinno ve ark., 2012).

Özellikle sucul organizmalar, nikel nanopartiküllerine çeşitli yollarla maruz kalabilirler. Şöyle ki üreticiler ve kullanıcılar tarafından yüzey sularına yapılan doğrudan deşarjlar, nikel nanopartikülü içeren atıkların gömüldüğü depolama alanlarından sızma yoluyla, toprak yüzeyinde çökmüş nikel nanopartikülünün aşınması ve havada asılı kalan nanopartiküllerin yüzey sularına çökmesi yoluyla olabilmektedir. Suda ya doğrudan su kolonundan çökelip sediment oluşturabilir ve/veya aglomerasyon (topaklanma) yapıp çökelerek sedimentte birikebilmektedir; bentik

o**rganizmalar sedimentteki bu partikülleri sindirecek veya hücre içine alarak nikel nanopartikülleri ile** doğrudan etkileşime girebilmektedirler (Meyer ve ark., 2020).

1.4. Midyeler (Bivalvialar)

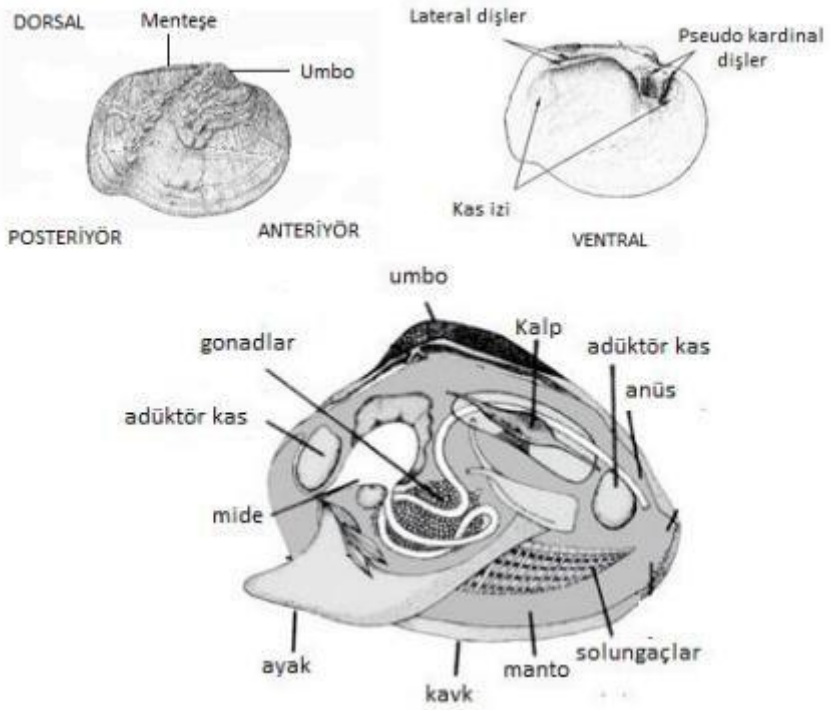
Midyeler, Mollusca (yumuşakçalar) şubesine ait olup, iki kapaklı kabuklarıyla karakterize edilen bir hayvan sınıfıdır. Latince "bis" (iki) ve "valvae" (bir kapının yaprakları) kelimelerinden türemiştir. Midyeler, istiridyeler, taraklar ve kum midyeleri bu sınıfa dahil olan en bilinen örneklerdir. Bivalvialar, hem tatlı su hem de deniz ortamlarında geniş bir yayılıma sahiptirler ve dünya ekosistemlerinde önemli roller üstlenirler (Yıldırım, 2023).

En belirgin özellikleri, sırt kısmında bir menteşe (ligament) ile birbirine bağlı iki simetrik veya asimetrik kabuğa sahip olmalarıdır. Kabuklar, kaslar tarafından açılıp kapanabilmekte ve hayvanı dış etkenlerden korumaktadır. Bivalvialaın çoğunun vücut yapısı, yanal olarak basık ve bilateral simetriye sahiptir. Taksonomik bir öneme sahip olan kavkı türlere göre farklı şekil ve renkte olabilmektedir. Kavkının dolayısıyla midyenin ön tarafı, anteriorda yer alan umbo ve pseudokardinal dişlerin konumuna göre belirlenmektedir (Şekil 1.4). Büyük oranda kalsiyum karbonattan oluşan kavkı, diğer molluska üyeleri kavkılarına benzer olarak üç tabakalı bir yapıya sahiptir. Embriyonal olarak tek parçalı bir üniteden gelişerek, sekonder olarak iki parçalı bir yapıya dönüşmektedir. Kalkerleşme ise kavkının sırt kısmında bir çift noktadan başlamakta ve kenarlara doğru ilerleyerek halkalı bir yapıya dönüşmektedir. Halkalar bazı türlerde yaş tayininde değerlendirilmektedir (Yıldırım, 2023).

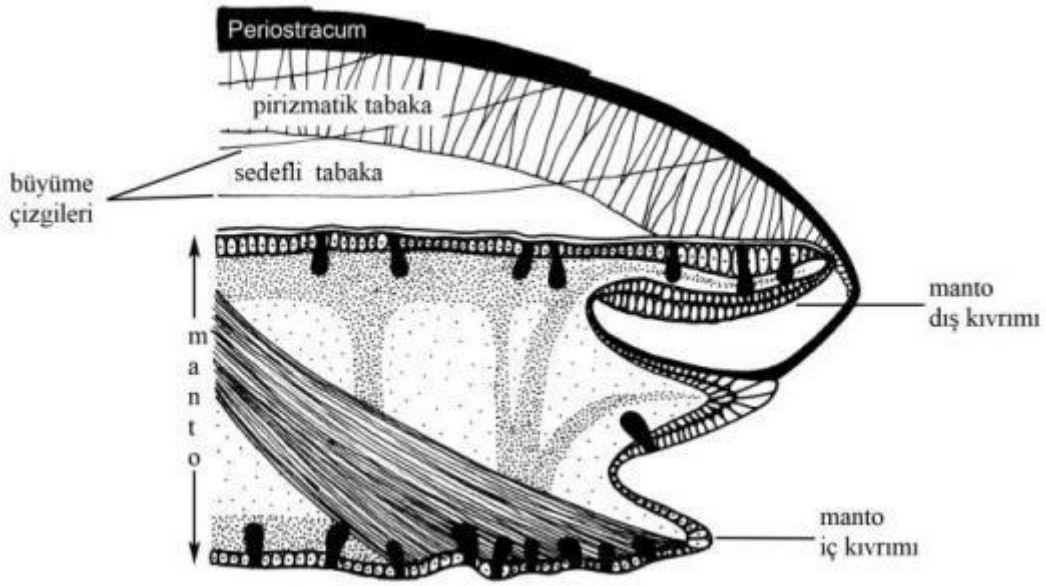
Midyeler, Molusca şubesinde olmalarına rağmen, radulaları ve odontoforları (radular etrafındaki kıkırdaksı yapılar) körelmiştir veya hiç yoktur. Genellikle kama veya balta şeklinde bir ayağa sahiptirler. Bu nedenle balta ayaklılar olarak da ismlendirilmektedirler. Bu ayak, kum veya çamura gömülmek, hareket etmek veya bissus iplikçikleri ile zemine tutunmak için kullanılır (Şekil 1.3 ve 1.4). Bazı türlerde örneğin istiridyelerde ayak körelmiş veya çok küçük olduğundan sabit bir yaşam sürmektedirler.



Şekil 1.3. Bissus iplikçikleri ile tutunan midyeler (Dijital kaynak 3)



Şekil 1.4. Bir midyenin anatomik ve morfolojik özellikleri. (http://owl.fish.washington.edu)'den



Şekil 1.5. Kavkı ve manto (https://www.digitalatlasofancientlife.org/learn/mollusca/bivalvia/)

Midyeler, sesil epibentik veya bissus iplikçikleri ile çeşitli zeminlere bağlı bir yaşam sürdürebilmektedirler. Genel olarak yetişkinlik dönemlerinden az hareketli bir yaşam sürdürürler ve hipertrofik solungaçları ile filtratif bir beslenme gösterirler (Yıldırım, 2023). Filtrasyonla solungaçlar üzerine sıkışan besin partikülleri, genellikle silli yapıdaki mekanizmalar ile ağıza iletilmektedir. Bu özellikleri ile sucul ekosistemlerde askıdaki organik materyaller başta olmak üzere ağız açıklıklarına uygun büyüklükteki partikülleri filtre ederek, ekosistemlerde önemli yer edinmektedirler. Bununla birlikte derin deniz midyelerinde simbiyotik yollarla beslenen türler ile yüzebilen denizsel formlar, yine gemilerin ahşap kısımlarını, kili veya taşı delerek oluşturdukları oyuklarda yaşayan türler de mevcuttur (Williams ve ark., 2004).

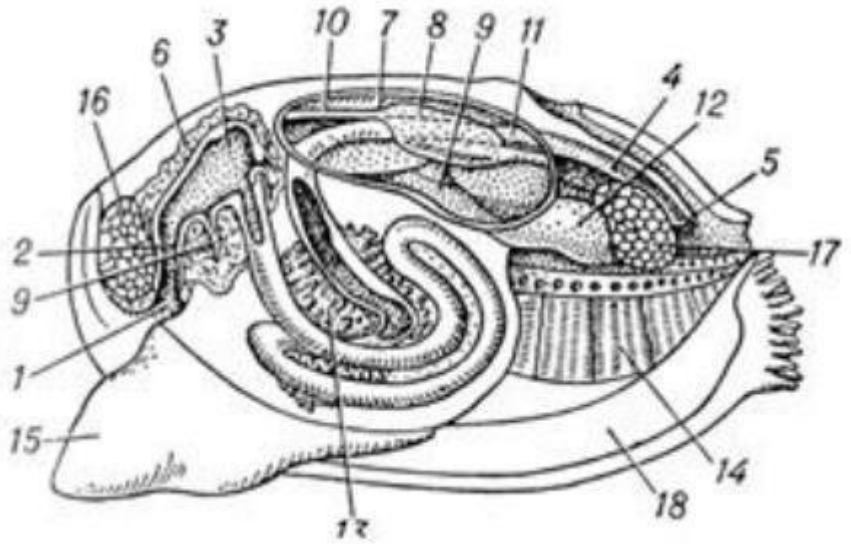
Vücutları, kabuğun iç yüzeyini kaplayan ve kabuğu salgılayan bir manto dokusu ile çevrilidir (Şekil 1.5). Manto, genellikle iki lobdan oluşur ve bazı türlerde sifonları oluşturmak üzere birleşir. Sifonlar, midyenin manto kenarlarının birleşerek oluşturduğu, boru şeklindeki uzantılar olup, bu yapılar midyenin kabuğunu açmadan dış ortamla su alışverişi yapmasını sağlamaktadır. Genellikle iki adet sifon bulunur: biri su giriş sifonu (İnhalant Sifon) olup, dışarıdan suyu manto boşluğuna çeker. Suyla birlikte oksijen, besin partikülleri (fitoplankton, zooplankton) ve diğer partiküller midyenin içine alınır. Genellikle daha kısa ve geniştir. Diğeri ise su çıkış sifonu (Ekshalant Sifon) olup, bu sifon, manto boşluğundan süzülmüş, oksijeni alınmış suyu ve atık maddeleri (dışkı, fazla mukus) dışarı atar. Genellikle daha uzun ve dardır (Yıldırım, 2023).

Solunum genellikle ktenidyum denilen büyük, kıvrımlı solungaçlar aracılığıyla gerçekleşir. Bu solungaçlar yalnızca solunum değil aynı zamanda beslenmede de önemli bir rol oynar. Büyük çoğunluğu filtrasyonla beslenir. Suyu sifonları aracılığıyla içeri çekerler, solungaçlardaki kirpikler yardımıyla sudaki fitoplankton ve zooplankton gibi mikroskobik organizmaları süzerek besinlerini alırlar. Süzülen su daha sonra dışarı atılır. Bu beslenme şekli, onları su kalitesi açısından önemli bir

gösterge yapar. Özellikle kuraklık dönemlerinde kavklar arkaya doğru hafif açılır ve solunum manto kenarlarınca da yapılabilmektedir. Gelgit dönemleri arasında solunum neredeyse tamamen durmaktadır (Yıldırım, 2023).

Dolaşım sistemleri açık dolaşım olup, kalp kanı (hemolimf) damarlar aracılığıyla vücut boşluklarına pompalar ve kan organları doğrudan yıkamaktadır. Beyinleri yoktur ancak sinir düğümleri (ganglionlar) ve sinir kordonlarından oluşan basit bir sinir sistemine sahiptirler. Çevresel uyaranlara tepki verebilirler.

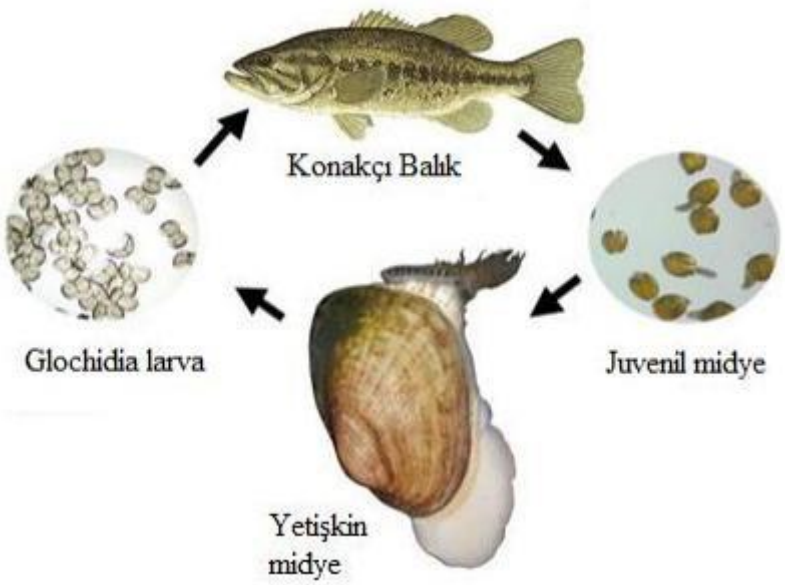
Sindirim sistemi yemek borusu, mide ve bağırsaktan oluşmaktadır (Şekil 1.6). Filtratif bivalvialar kristalin stil olarak tanımlanan mukoid bir yapıya sahiptirler. Bunlarda büyük yapılı olan solungaçlar, yiyecekleri sudan filtreleyerek, ağzı çevreleyen dudak palplerine yönlendirmektedir. Bu şekilde yiyecekler ayıklanıp ağza aktarılmakta ve sudan filtrelenen yiyecekler seçilebilmektedir (Yıldırım, 2023).



Şekil 1.6. Midyenin iç yapısı. 1. Ağız açıklığı, 2. , 3. , 4. Barsak, 5. Anüs, 6, Hepatopankreas, 7. Perikardial kese, 8. Kalp (karıncık), 9. Kulakçık, 10. Ön aort, 11, Arka aort, 12. Böbrek, 13. Gonad, 14. Solungaç, 15. Ayak, 16. Ön (adüktör) kapatıcı kas, 17. Arka kapatıcı kas, 18. Manto kıvrımları

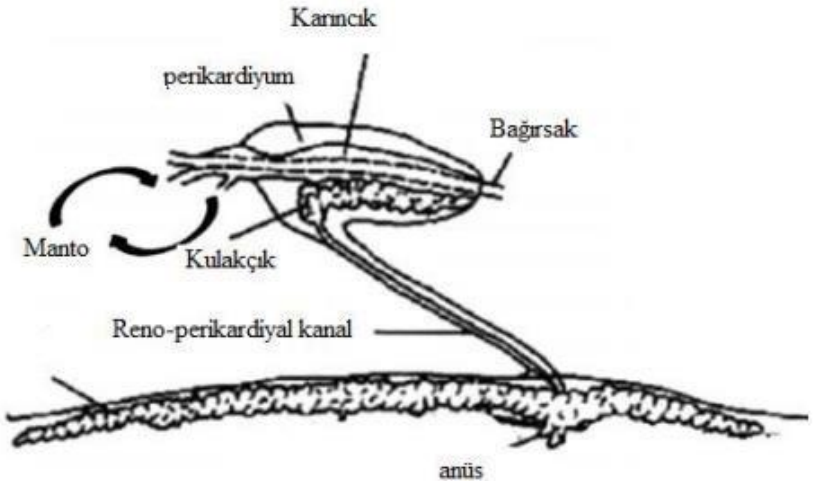
Çoğu bivalvia dioik olmasına rağmen bazıları monoiktir. Genellikle dış döllenme görülmektedir. Yumurtaları oldukça küçük olup, spermleri çift kamçılıdır. Senkronize yumurtlama, her iki gamet tipinin de döllenmesi için suya boşaltılmasıyla sonuçlanır. Hermafrodit türlerde genellikle başka birinden gelen sperm sifon yoluyla içeri alınır. Embriyolar solungaçlarda kuluçkaya alınarak, yumurtalardan doğrudan yavrular ortaya çıkarlar. Çoğu midyede döllenmiş yumurtadan öncelikle yüzebilen trokofor larvası çıkar ve daha sonra kabuklu veliger larvasına dönüşür. Tatlı su midyelerinde ise sperm doğrudan suya bırakılmakta ve su alış sifonu ile dişinin içine girmektedir. Döllenen yumurtalar, glochidium denilen ve tatlı su balıklarının yüzgeçleri veya solungaçlarına bağlanan parazitik bir larva aşamasına dönüşür. Glochidia türe özgü olup, gelişmeye

uygun balık konak bulursa yaşamaktadırlar. Larvalar ortam sıcaklığa bağlı olarak iki ila beş hafta içinde olgunlaşarak ve yaşamlarını sürdürmek için zemine geçerler (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Tatlı su midyesinin yaşam döngüsü (https://molluskconservation.org)

Midyelerin boşaltım sistemi, detoksifikasyon ve osmoregülasyona yardımcı olmaktadır. Özelleşmiş bir çift metanefridyumları olup, bunların her biri perikarda açılan uzun, halkalı, glandüler bir tüpten ve idrarı depolamak için bir mesaneden oluşmuştur. Ayrıca, kalbin kulakçıklarını hizalayan veya perikarda bağlanan ve ekstra filtreleme organları olarak görev yapan perikardiyal bezleri de vardır (Şekil 1.8). Metabolik atıklar, manto boşluğunun üst kısmının ön kısmına yakın bir nefridiyopor aracılığıyla mesanelerden boşaltılır ve dışarı atılır. Bu sistem, midyelerin hayatta kalmasını sağlayan temel bir süreçtir. Boşaltım sistemi, glomerulus adı verilen bir yapıyla başlar. Glomerulus, midyenin vücudunun baş kısmında bulunan bir yapıdır. Bu yapı, atık maddelerin vücuttan çıkarılmasından sorumludur. Artık ürünleri ve diğer maddeleri taşıyan hemolimfler ve vücut boşluğu içinde dolaşarak, iç organlarının etrafını çevreleyen bir dolaşım sıvısı bulunmaktadır. Hemolimf içinde biriken atık maddeler metanefridyumlarca emilip, vücuttan atılmaktadır (Yıldırım, 2023).



Şekil 1.8. Bivalviaların boşaltım sistemi

Kas sistemi esas olarak kavkları kapatma görevi için özelleşmiş adüktör kaslardır. Kapanma kasları iki kısma ayrılmaktadır. Bunlardan tetanik kısım, çok enerji kullanarak kavkları hızlı bir şekilde kapatabilmektedir. Tonik kısım ise az düzeyde bir enerji ile kavkları sıkı bir şekilde kapatmaktadır. Bu nedenle birçok türde kavkılar uzun süre kapalı kalabilmektedir. İki kavkı birbirine bağlayan bu kaslar kasılarak kavkların kapatılmasını sağlarlar. Kavklar yine periostrakumun bir uzantısı olan menteşe bağları ile dorsal olarak birleşiktirler. Kavkıların açılmasından ligament sorumlu olan antagonist kaslardır. Bu yapı, palyal çizgi olarak bilinen bir çizgi boyunca mantoyu kabuğun kenarına bağlamaktadır (Morton, 2012).

Bivalvia sınıfı, morfolojik özelliklerine ve yaşam biçimlerine göre farklı alt sınıflara ayrılır. Bunlardan bazıları:

Paleoheterodonta: Özellikle tatlı su midyelerini (Unionidae) içerir.
Pteriomorphia: Midyeler, istiridyeler, taraklar gibi deniz türlerini içerir.
Heterodonta: Kum midyeleri, istiridyenin bazı türleri gibi geniş bir grubu kapsar.
Protobranchia: Genellikle derin denizlerde yaşayan ilkel bivalvialardır.

Bivalvialar, su ekosistemlerinde çok önemli roller oynarlar. Filtrasyonla beslenmeleri sayesinde, sudaki partikülleri, algleri ve kirleticileri süzerler, böylece su kalitesinin artmasına yardımcı olurlar. Bu özellikleri nedeniyle biyo-izleme çalışmalarında sıklıkla kullanılırlar. Hem kendileri birçok deniz canlısı (balıklar, kuşlar, deniz memelileri) için önemli bir besin kaynağıdır hem de süzdükleri organik maddelerle ekosistemin enerji akışına katkıda bulunurlar. Farklı yaşam alanlarına adapte olmuş çok sayıda türüyle deniz ve tatlı su biyoçeşitliliğine önemli katkı sağlarlar. Bazı türleri, kumlu veya çamurlu zeminlere gömülerek veya bissus iplikleriyle kayalara tutunarak sedimentin stabilize olmasına yardımcı olurlar.

Midyeler insanlar için de büyük bir ekonomik önemi vardır. Midye, istiridye, tarak gibi türler, dünyanın birçok yerinde popüler bir deniz ürünü olarak tüketilir (Şekil 1.9). Yüksek protein içeriği ve lezzetleriyle önemli bir besin kaynağıdırlar. İstiridyeler, doğal inci oluşumuyla (bir yabancı cismin kabuk ile manto arasına girmesi ve sedefle kaplanması sonucu) değerli incilerin kaynağıdır. İnci çiftçiliği de ekonomik açıdan önemli bir sektöre sahiptir. Bazı bölgelerde hayvan yemi veya tarımsal gübre üretmek amacıyla da kullanılabilmektedirler. Bazı bivalvia türleri, biyomedikal araştırmalarda, özellikle kirlilik belirteçleri ve toksikoloji çalışmalarında model organizma olarak tercih edilmektedirler.



Şekil 1.9. Gıda olarak tüketimi https://www.lezzet.com.tr/

Bivalvialar'ın, sucul ekosistem toksisitesinde kullanılmasındaki sebeplerden ilki suyu filtre ederek beslenmeleridir. Bu sayede sudaki kirleticileri, toksinleri ve mikroorganizmaları doğrudan vücutlarında biriktirirler. Bu özellik, su kalitesi ve kirletici düzeylerinin değerlendirilmesinde onları çok iyi biyoindikatör organizma yapmaktadır. Ayrıca kolay toplanabilmeleri de tercih sebeplerindendir. Bu hayvanlarda sedanter yaşam şekli de diğer bir sebeptir. Hareket kabiliyetleri sınırlı olduğundan, bulundukları yerin çevresel koşullarını ve kirletici yükünü iyi yansıtırlar. Böylece belirli bir bölgedeki kirlilik durumunu net şekilde gösterebilmektedirler. Ayrıca geniş coğrafik dağılım göstermeleri de diğer bir kıstastır. Farklı tatlı ve tuzlu su ekosistemlerinde yaygın olarak bulunmaları da onların çeşitli ekosistemlerde toksisite değerlendirmesi için kullanılmasındaki nedenlerdendir. Bir de bu canlılar uzun yaşam süreleri boyunca çevresel toksinleri vücutlarında biriktirebilmekte, böylece kronik kirliliğin etkilerini izlemek mümkün olabilmektedir. Kimyasal kirleticilere karşı hassas tepki vermelerinden dolayı hücresel ve moleküler düzeydeki stres göstergeleri (biyobelirteçler) kolayca ölçülebilmektedir. Bu nedenlerle bivalvialar, sucul ortamların

toksisite izlenmesinde hem doğrudan toksik etkilerin belirlenmesi hem de uzun vadeli çevresel değişimlerin takibi için ideal organizmalardır. Pek çok ülke "midye izleme" programlarıyla, kıyı bölgelerindeki kirleticilerin biyoyararlanımı ve toksisitesini iyi bir şekilde takip etmektedir. ABD'deki kıyı sularındaki kimyasal kirliliğin izlenmesi için "Mussel Watch" gibi "sentinel organizma" (örneğin midyeler ve diğer çift kabuklular) yaklaşımlarının değerine işaret edilmektedir. İspanya'nın Akdeniz kıyısında 1980'li yılların başından bu yana midyeler kullanılarak çevresel kirleticiler izlenmektedir (Risebrough ve ark., 1983). Bivalvia'lar, biyomonitoring programlarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu durum, biyolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır; çünkü bu canlılar sesil yaşam sürerler, filter-feeding yaparak önemli miktarda kirletici madde biriktirebilirler (Viarengo ve Nott, 1993; Leslie ve ark., 2005; Phillips, 1986; Viarengo ve Canesi, 1991; Rand ve ark., 1995). Kahverengi midye (*Perna perna*), Brezilya' nın güneyindeki Santa Catarina eyaletinde yoğun olarak yetiştirilen bir bivalvia türüdür ve balıkçılıkta çok önemli bir rol oynamaktadır. İnsan kaynaklı deşarjlar, bivalvialarda izin verilen sınırların üzerinde çinko seviyeleri tespit edilmesine yol açabilmektedir (Lopes, 2002). Ancak, bivalvialaların suyu filtreleme yetenekleri, onları çevresel kirliliğe karşı hassas hale getirmektedir. Ağır metaller, patojenler ve alg toksinleri gibi kirleticileri dokularında biriktirebilirler, bu da insan tüketimi için risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle, yetiştirildikleri veya toplandıkları suların düzenli olarak izlenmesi ve güvenli kabul edilmesi insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Midyeler, beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için büyük miktarda sediment parçacığı tükettiği için, sedimentler kirleticilerin birikiminde önemli bir kaynaktır. Metal ve metaloidler, midyelerde yaygın ve kalıcı olmaları ve besin zinciri boyunca biyobirikim/biyobüyütme (biyomagnifikasyon) potansiyelleri bakımından endişe vericidir. Midyelerin bazı önemli elementlere (örneğin Mn, Cu, Ni, Zn) ihtiyaç duymasına rağmen, Cd, Pb ve Cr gibi ağır metaller düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiye sahiptir. Ayrıca, birden fazla metalin birlikte bulunması ve etkileşimleri midyelerde yeni toksisite problemlerine neden olmaktadır (Xu ve ark., 2022).

1.5. Hepatopankreas

Omurgalılardaki karaciğer (hepar) ve pankreasın (pancreas) işlevlerini birleştirdiği için hepatopankreas olarak adlandırılmıştır. Midye hepatopankreası, iç organ kitlesinin tabanında yer alarak mideyi tamamen kuşatmaktadır. Mikroskobik olarak incelendiğinde 'sindirim tübülleri' denilen hepatopankreasın ana yapısal birimleri görülür. Bu tübüller, genellikle lobüller halinde gruplanmış ve bağ dokusu ile çevrilidirler. Sindirim tübülleri, salgılarını toplayan küçük kanallara açılır ve bu kanallar birleşerek daha büyük kanallar meydana getirmektedir. Sonunda da mideye veya kristal stili içeren keseye açılmaktadır. Tübüller ve kanallar arasında destekleyici bir bağ dokusu ağı da yer almaktadır. Her bir tübül, bir bazal zarla çevrili olup, iki ana hücre tipini içerir. Bunlar sindirim hücreleri ve bazofilik hücrelerdir. Sindirim hücreleri, sindirim enzimlerini üretir ve salgılar.

Aynı zamanda besinlerin emilimini ve depolanmasını (özellikle lipidler ve karbonhidratlar) gerçekleştirirler. Genellikle vakuollü ve asidofilik (asit boyalarıyla boyanan) bir yapıya sahiptirler. Yiyecek partiküllerini endositoz yoluyla alarak intrasellüler sindirim de yapabilirler. Bazofilik hücreler, genellikle daha küçük ve piramidal şekillidir. Protein sentezi ve salgılanmasında iş görmektedir.

Midye hepatopankreası, memelilerdeki karaciğer ve pankreasın birleşik işlevlerini üstlendiği için oldukça çeşitlidir ve önemli fizyolojik süreçlerde rol oynar. Yiyeceklerin kimyasal sindirimini sağlayan çeşitli enzimler (amilazlar, lipazlar, proteazlar gibi) hepatopankreas hücreleri tarafından üretilir ve sindirim kanalına salgılanır. Bu enzimler, midyenin filtrelediği besin partiküllerini (fitoplankton, detritus) parçalamaya yardımcı olur. Sindirilmiş besin maddeleri, hepatopankreasın sindirim hücreleri tarafından emilir ve vücudun kullanımına sunulur. Hepatopankreas, glikojen ve lipidler gibi enerji rezervlerinin ana depolama yeridir. Bu depolar, midyenin yiyecek bulamadığı, fizyolojik stres altında olduğu dönemlerde veya üreme dönemlerinde enerji sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Midyelerin suyu filtre ederek beslenmeleri nedeniyle toksinler, ağır metaller ve diğer kirleticiler hepatopankreasta birikebilmektedir. Hepatopankreas, bu maddeleri detoksifiye etme ve vücuttan atmaya çalışan enzim sistemlerine sahiptir. Bu nedenle, midye hepatopankreası, çevresel kirliliğin biyo-izlenmesinde önemli bir organ olarak kabul edilmektedir (Demir ve Akkuş, 2018). Metabolik fonksiyonlarda da işlevlere sahip olan bu organ lipit metabolizması ve diğer temel metabolik süreçlerde de büyük öneme sahiptir. Aynı zamanda, bağışıklık yanıtında rol oynayan bazı bileşiklerin üretiminde de rol oynayabilmektedir. Hepatopankreasın yapısı ve işlevleri midye türüne, yaşam ortamına ve beslenme alışkanlıklarına göre küçük farklılıklar gösterebilmektedir. Ancak genel olarak, midyenin hayatta kalması ve sağlıklı bir şekilde büyümesi için kritik öneme sahip kompleks bir organdır (Yıldırım, 2023).

1.6. Antioksidan Sistem

1.6.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Genel Özellikleri

Dış atomik orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikal olarak tanımlanır. Radikal ve serbest radikal terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber, radikal terimi; serbest radikalin su molekülleri tarafından tutulmuş bağlı formunu ifade etmektedir (Dijital Kaynak 4).

Ortaklanmamış elektron, genel olarak kimyasal sembollerinin üst kısmına yazılan bir nokta veya çizgiyle ile gösterilir. Örneğin, süperoksit radikali; $O_2^{\cdot -}$. En basit serbest radikal sadece bir eşleşmemiş elektron içermesi nedeniyle hidrojen atomudur. Hücre metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller hücre membranı, sitozol ve nükleusu etkileyerek hücre yaşlanmasına neden olmaktadır. Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta ancak radikal parçalayan antioksidan sistemler ile oluşan serbest radikaller ortadan kaldırılabildiğinden herhangi bir sitotoksisite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir

dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır. Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları; mitokondrial elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır (Phaniendra ve ark., 2015).

Serbest radikaller üç şekilde oluşabilmektedir. Bunlardan biri; kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi, diğeri ise bir molekülden bir elektron ayrılması ile ya da bir moleküle bir atomun katılması ile gerçekleşebilmektedir.

Serbest radikaller, aerobik canlılar için çoğunlukla oksijen kaynaklı oluşabilmekte ancak nitrojen kaynaklı da meydana gelebilmektedir. Oksijen kaynaklı olanlara reaktif oksijen türler (ROT) ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNT) olarak isimlendirilmektedir (Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1. Reaktif nitrojen türleri

Radikaller		**Nonradikaller**	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	HOBr
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid peroksil	$LOO^{\cdot}$		

Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türleri

Radikaller		**Nonradikaller**	
Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	$NO_2^{\cdot}$	Nitrosil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetroksid	N_2O_4
		Dinitrojen trioksid	N_2O_3
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitrik asit	ONOOH
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Alkil peroksinitrit	ROONO

Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan kararsız bir yapıdır. Serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Chandimali ve ark., 2025).

$O_2 + é \rightarrow O_2^{\bullet -}$

O_2 : 16 proton, 16 elektron, yüksüz, diradikal

$O_2^{\bullet -}$: 16 proton, 17 elektron, negatif yüklü, süperoksit (serbest radikal)

Hidrojen peroksit, biyolojik sistemlerde H_2O_2'in asıl kaynağı olan oksijenin dismutasyonuyla ya da oksijenin doğrudan indirgenmesiyle oluşur. H_2O_2'in yağda çözünebilir özelliğinden dolayı membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Eşleşmemiş elektron içermediğinden gerçek bir serbest radikal değildir (nonradikal) fakat reaktif oksijen türleri içine girmektedir. Hücrede miktarı arttıkça toksik etkisi de artar ve bu nedenle serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek, en reaktif ve son derece zarar verici olan hidroksil radikalini oluşturur.

$$O_2^- + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

$$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2 + OH^{\cdot} + OH$$

Hidroksil radikali (·OH), H_2O_2'in geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile oluşur. OH·'in biyolojik sistemlerde oluşumuna en güzel örnek Fe^{+2} iyonlarının katalizlediği Fenton reaksiyonudur. Katalize olmayan Haber-Weiss reaksiyonu ise süperoksitin direkt olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşmaktadır. OH·, son derecede reaktiftir çünkü yarılanma ömrü oldukça kısadır. Oluştuğu yerde büyük hasara neden olur. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilmekte ve radyasyon, oksijen ile hidrojen arasında kovalent bağa neden olmaktadır. DNA' nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. Hücre zarında lipid peroksidasyonunu başlatarak zarın yapısını bozar ve zarın geçirgenliğini artırarak hücrenin ölümüne yol açabilmektedir.

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+3} \dashrightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

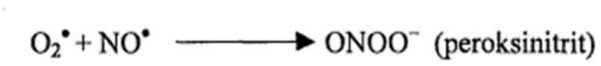
$$H_2O_2 + Fe^{+2} \dashrightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{+3} \quad \text{(Fenton Reaksiyonu)}$$

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \dashrightarrow \cdot OH + OH^- + O_2 \quad \text{(Haber – Weiss Reaksiyonu)}$$

Singlet Oksijen ($^1O2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için nonradikal reaktif oksijen molekülüdür. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olmaktadır. Poliansature yağ asitleri (PUFA) ile tepkimeye girerek yarı ömrü uzun olan peroksil (ROO.) radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Karbon-Karbon çift bağları $^1O2$' nin tepkimeye girdiği bağlardır. Bunlar DNA, NADPH, karotenler, histidin, metionin, bilirubin ve kolesterol gibi bileşiklerdir. Ayrıca ışığa maruz kalan lens veya kloroplast gibi birçok pigment sisteminde de singlet oksijen ($^1O2$) oluşmaktadır (Dmitrieva ve ark., 2020; Balasubramanian ve ark., 1990).

Peroksil ve Alkoksil radikalleri (ROO·, RO·), plazma membranı üzerindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda peroksil ve alkoksil radikalleri açığa çıkmaktadır. Bu radikaller bir H+ atomunu atarlar. Böylece organik hidroperoksidler ve alkol oluşmaktadır. Hidrojen atomunun atılması, bir başka lipid üzerinde karbonun oksijenle birleşmesi ve başka bir lipid peroksid oluşturmasıyla sonuçlanmaktadır. Yeni oluşan lipid peroksid stabilize olmak için bir H+ atomunu atar ve zincir reaksiyon süreklilik kazanır. Sonuçta plazma membranının peroksidatif hasarı oluşmaktadır.

Diğer serbest radikallerle reaksiyona girebilme eğiliminde olan nitrik oksit radikali (NO·), Nitrik oksit Sentetaz adlı bir enzim ile endoltelde bir amino asit olan L – arginin'in terminal guanidine grubunun oksitlenmesi ile oluşmaktadır (Rosen ve ark., 2002).



Serbest radikallerin oluşumu endojen veya eksojen kaynaklı meydana gelebilmektedir (Phaniendra ve ark., 2015). Endojen kaynaklı oluşum doğal olarak organizmada meydana gelen metabolizmal reaksiyonlar sonucudur. Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretirler. Yangı durumunda da sitokinler serbest bırakılır ve bunun sonucunda nötrofiller ve makrofajlar serbest radikalleri üretmeye başlar. Otooksidasyon reaksiyonları sırasında ksantin oksidaz (XO) ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz gibi enzimlerle endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından da oluşabilmektedir (Chaudhary ve ark, 2023). Ayrıca kortizol ve kateşolamin gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına yol açmakta ve aynı zamanda bu hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilmektedir. Zihinsel stres veya vücut yorgunluğundan kaynaklanan stres, toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilmektedir. Yine lipid peroksidasyonu sonucu da oluşabilmektedir. Düz kas hücreleri, plateletler ve araşidonik asit metabolizması tarafından da serbest radikaller üretilebilmektedir. Eksojen kaynaklı oluşumlar çoğunlukla ksenobiyotik kaynaklıdır. Eksojen kaynaklı oluşumlara

sebepler ise UV, X-rays, gamma ve mikrodalga ışınlarına maruziyet, pişirme sırasında organik maddelerin yakılması, orman yangınları, volkanik faaliyetler, asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, toluen gibi hava kirleticileri, temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar, kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler, alkol ve sigara, egzoz dumanı örnek verilebilir (Kawanishi ve ark., 2014).

Serbest radikallerin hücredeki birikimi, hücrenin birçok kısmını etkileyerek hücresel hasara neden olur ve hücre yaşlanarak apoptoza uğrar. Örneğin, hücrenin ekstrasellüler boşluğunda oksijen radikallerinden H_2O_2 hiyaluronik asidi parçalamaktadır. Hiyaluronik asidin parçalanması, kollajen proteinlerinin yıkımı, dokuların yapısal özelliklerini ve hücre zarı geçirgenliğini dolayısıyla da ekstrasellüler alanın normal yapısı bozulmaktadır. Buna en iyi örnek insanlarda göz vitreus humorundaki hiyaluronik asidin parçalanması katarakt oluşumuna, eklem sıvısının hiyaluronik asit yıkımı ise romatoid artrite neden olmaktadır. Hücre membranında birçok molekül serbest radikallerden etkilenir ancak bunların içinde en çok etkilenenler lipidlerdir. Hücre zarında kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Bunlardan poliansatüre yağ asitleri (PUFA) yıkılarak PUFA Peroksidasyonu ortaya çıkar ki bu olay kendi kendini devam ettiren zincir şeklinde ilerlemektedir. Bu peroksidasyon sonucunda hücre zarı geçirgenliği ve kırılganlığı artar ve dolayısıyla hücre zarı iyon geçişi bozulmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin hücrede esas üretildiği organel olması bakımından mitokondri en fazla maruz kalan kısmıdır. Mitokondrinin zar fazında cereyan eden son oksidasyon evresinde, elektron taşıma zincirinin son halkası olan sitokrom oksidaz, elektronları oksijene ileterek H_2O ve ATP oluşumunu sağlar. Bu sırada elektron taşıma zincirindeki NAD, FAD, Koenzim Q gibi bileşikler oksijen ile tepkimeye girerek tek değerli $O^{\cdot}$ salınımına neden olur. Bu olay mitokondride hasara neden olursa ATP kullanımı artar. Buna karşılık ATP sentetaz enzim aktivitesi azalarak yeterince ATP sentezlenemez. Yeterince enerji üretemeyen hücre yaşlanmaya yönelmektedir. Bu olayların temelinde mtDNA hasarı yatar ki mtDNA mutasyonları nDNA mutasyonlarından 10-20 kat daha fazladır. Sitozol de radikallerden etkilenen hücre kısımlarındandır. Serbest radikaller; hücrenin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkiler. Sitoplazmada bulunan proteinlerden özellikle oksihemoglobin gibi hemoproteinler serbest radikallere karşı daha duyarlıdır. Bu proteinlerin serbest radikallerce bozulması hücre harabiyeti ve yaşlanmasına neden olmaktadır. Ayrıca karbonhidratların da bozulmasına neden olur ki monasakkaritlerin oksidasyonu sonucu H_2O_2 ve oksoaldehitler meydana gelmektedir. Hücrenin etkilendiği bir diğer kısım da nükleustur. Serbest radikal göstergelerinden malondialdehit (MDA), DNA'yı etkileyerek genom dengesizliğine neden olur. Böylece nükleik asit yapımında baz değişimleri ve DNA zincirinde kırılmalar, hücrede sitotoksisite, mutajenik ve karsinojenik etkilere neden olur (Marnett, 1999).

1.6.2. Antioksidanlar

Hücreler serbest radikalleri detoksifiye eden antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Aerobik organizmalar bu savunma sistemleri tarafından oksidatif değişikliklere karşı korunur. ROS oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" ya da "antioksidanlar" adı verilir. Vücudun kendi metabolizması tarafından doğal olarak üretilen antioksidanlara endojen antioksidanlar denir. Organizmanın kendisinin doğal olarak üretmediği dışarıdan diyetle alınan antioksidanlara eksojen antioksidanlar denir. Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır.

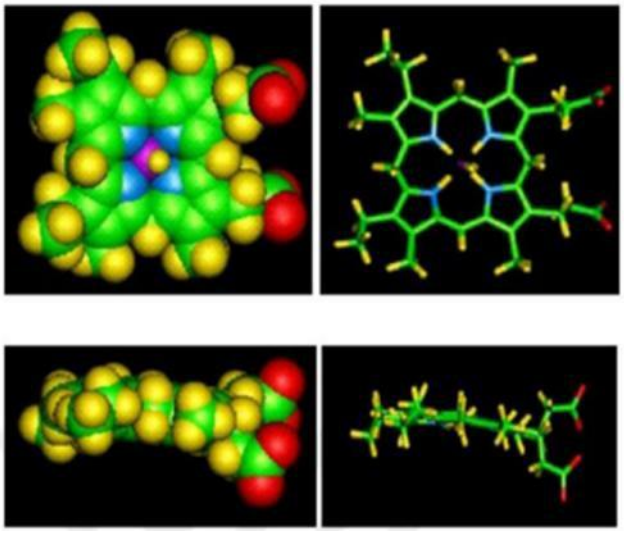
Enzimatik Antioksidanlar

Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi, canlı hücrelerde bulunan ve oksijenli solunum sonucunda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) adlı zararlı bileşiği zararsız hale getiren bir enzimdir. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene indirger. Enzim kodu EC. 1.11.1.6 'dır.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Bu enzimin başlıca görevi, hücreyi oksidatif stresten korumaktır. Oksidoredüktazlar sınıfından olup, özellikle peroksidazlar içinde yer almaktadır. Geometrik olarak homotetramer yapıda ve 4 protein alt birimden oluşmaktadır. Her bir alt birimi kovalent bağlı olmayan Fe (III) (bir hem grubu) ve protoporfirin IX hem prostetik grubunu oluşturur (Şekil 1 . 10). Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. H_2O_2'in, H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalize etmektedir. Karaciğer, böbrek ve kemik iliği dokularında esas olarak peroksizomlarda bol miktarda bulunmaktadır (Nelson ve Cox, 2021).



Şekil 1.10. Katalaz enziminde hem grubu görünümü

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Normal koşullarda hücredeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan esas olarak GPx sorumludur. Böylece hidrojen peroksitten reaktif radikal hidroksil oluşumu engellenmektedir. GPx, 4 protein alt birimden oluşur ve her bir alt birim **bir selenium** (Se) atomu içermektedir. Enzim kodu 1.11.1.9'dur. GPx, elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2'i ve organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize etmektedir. Lipit peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özelliğe sahip bir enzimdir. GPx'in aktif bölgesinde Se atomu içeren selenyuma bağımlı GPx (Se-GPx) ve selenyuma bağımlı olmayan GPx olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı GPx (Se-GPx), hem H_2O_2 'i hem de lipid hidroperoksitlerini metabolize ettiği halde hücrenin sitozol (%70) ve mitokondri (%30) fraksiyonlarında lokalizedir. Selenyuma bağımlı olmayan GPx ise sadece lipit hidroperoksitlerini metabolize etmektedir. Glutatyon peroksidaz memeli dokularında geniş bir şekilde dağılış gösterir. Karaciğer, en zengin kaynaklarından biridir. Katalaz ve glutatyon peroksidazın fonksiyonları birbirine çok benzer fakat hücre içi dağılımları farklılık göstermektedir. Katalaz başlıca peroksizomlarda en yüksek aktiviteyi gösterirken, GPx en yüksek aktiviteyi sitozol ve mitokondrial matrikste göstermektedir. Eritrositlerde her iki enzim de sitozolde bulunur ve H_2O_2'in yıkımında eşit derecede öneme sahiptirler (Flohé, 2020). .

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Glutatyon Redüktaz (GR)

Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren enzim kodu EC.1.8.1.7 olan flavoprotein bir enzimdir. NADPH'nin bir elektronunu okside glutatyonun disülfid bağlarına aktararak yeniden

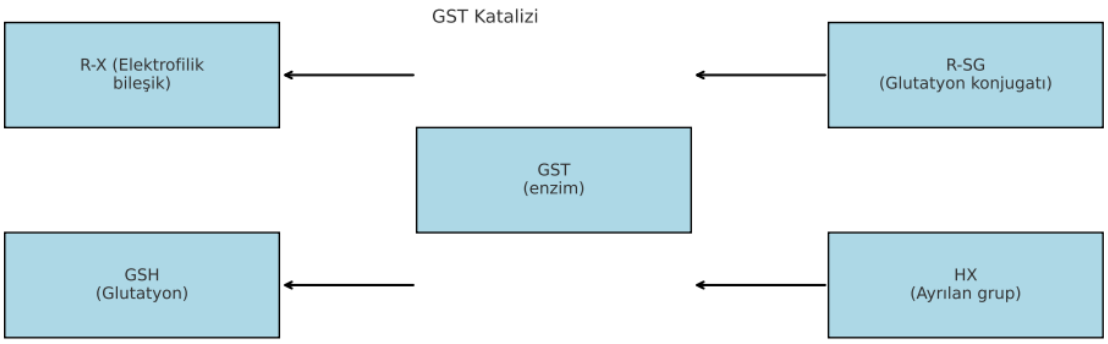
GSH'ye dönüştürür. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir ve en önemli kaynağı heksoz monofosfat (pentoz fosfat) yoludur. GPx, glutatyonu okside ederek H_2O_2'yi H_2O'ya indirger. Glutatyonun okside formunun (GSSG) tekrar redükte glutatyona (GSH) indirgenmesi ise glutatyon redüktaz (GR) tarafından sağlanmaktadır.

$$2GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon transferazlar olarak da bilinen glutatyon S- transferazın enzim kodu EC.2.5.1.18 olup, detoksifikasyon metabolizmasındaki son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizlemektedir. Hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunmaktadır. En çok bulunduğu doku karaciğerdir. İlk kez Boyland ve arkadaşları tarafından sıçan karaciğerinde saflaştırılarak tanımlanmış olan GST enzimi 20.000-25.000 dalton molekül ağırlığına ve her biri 200-240 aminoasitten oluşan alt birimlere sahiptir (Hayes ve ark., 2005). GST enzimi, hidrofobik substrat bağlanma bölgesine ve faz II ilaç metabolizmasında görev alan çok sayıda izoenzimlerden oluşmasından dolayı ksenobiyotik mekanizmasında çok önemli bir detoksifikasyon enzimidir. Bu substratların çoğu elektrofilik birer merkez taşımakta ve hidrofilik yapıdadır. GST aktivitesi esas olarak sitozolde bulunur. Memelilerdeki GST'ler, izoenzimlerden oluşan bir süpergen ailesi olarak görünür ve yedi temel gen sınıfında organize olmuşlardır: Bunlar; alfa, mu, pi, theta, sigma, zeta ve

kappa'dır. GST'ler, iki alt birimden oluşan dimerik proteinlerdir. Her alt birim bir glutatyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve onun yanında elektrofilik substratların bağlanmasına uygun hidrofobik bir bölge (H bölgesi) içermektedir (Şekil 1.11), (Cnubben ve ark., 2001). G Bölgesi enzimin üzerinde GSH'ın bağlanabildiği cep bölgesidir. Cebin açık olan kısmına dönük şekilde gltatyonun tiyol grubu (SH) yerleşmiştir. Tiyol grubu diğer substratlara bağlanan grup olması ve GSH ile konjugasyonun sağlanabilmesi için önemlidir.



Şekil 1.11. GST reaksiyonu

1.6.3. Organik Biyomoleküller ve Enerji Metabolizması

Hayvanlarda enerji metabolizması, temel olarak organik biyomoleküller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu biyomoleküller, enerji üretimi, depolama ve düzenleme gibi işlevlerde yer almaktadır.

Proteinler

Proteinler, canlıların yapıtaşlarıdır ve hücrede çok çeşitli işlevleri olan büyük biyomoleküllerdir. Amino asit adı verilen küçük birimlerin peptit bağlarıyla (–CO–NH–) birbirine bağlanmasıyla oluşan makromoleküllerdir. DNA'daki genler, hangi proteinin sentezleneceğini belirler. Her amino asit, amino grubu ($–NH_2$), karboksil grubu (–COOH), bir hidrojen atomu ve amino asidin kimliğini belirleyen radikal gruptan (R grubu yan zincir) oluşmaktadır. Doğada 20 standart amino asit vardır. Biyolojik proteinler bu 20 amino asidin farklı dizilimleriyle oluşur. Proteinler dört farklı yapısal seviyede incelenir. Primer yapı, amino asitlerin sıralı dizilimidir. Genetik bilgiye göre belirlenir. Sekonder yapı, polipeptit zincirinin lokal kıvrımları olup, α-sarmal (α-helix) ve β-tabaka (β-sheet)'dan oluşur. Hidrojen bağlarıyla stabilize olur. Tersiyer yapı, polipeptit zincirinin 3 boyutlu uzayda katlanmış hali olup, disülfid köprüleri, iyonik bağlar, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler belirler. Kuaterner yapı ise birden fazla polipeptit zinciri varsa meydana gelir. En iyi bilinen örneği hemoglobin olup, dört alt birimden meydana gelmiştir.

Proteinler biyolojik sistemlerde birçok farklı fonksiyona sahiptir. Kollajen, keratin gibi dokularda yapıtaşı olarak görev almaktadır. Kimyasal reaksiyonları katalize eden enzimler en önemli biyokatalizörlerdir. Molekülleri taşımada örneğin; hemoglobin, albümin gibi iş görmektedir. Bağışıklık sisteminde de önemli role sahiptir. Örneğin; Antikorlar (IgG). Hormonların yapısında yer alarak hücresel iletişimde iş gördüğü gibi ayrıca hücre yüzeyinde reseptörlerde sinyal algılamada da görev yaparlar. Kas kasılmasında da görevli olup, aktin ve miyozin örnek verilebilir.

Lipitler

Lipitler, suda çözünmeyen ancak organik çözücülerde (eter, kloroform, benzen gibi) çözünebilen biyolojik moleküllerdir. Yağlar, mumlar, fosfolipidler, steroidler ve terpenler bu gruba girer. Lipidler, hücrelerin yapısında ve enerji depolanmasında hayati öneme sahiptir. Hidrofobik (su sevmez) veya amfipatik (hem hidrofilik hem hidrofobik kısımlar içerir) moleküllerdir. Genellikle karbon (C), hidrojen (H) ve az miktarda oksijen (O) içerirler. Bazı lipitlerde fosfor (P), azot (N) ve sülfür (S) gibi elementler de bulunabilir. Lipitler, kimyasal yapıları ve işlevlerine göre başlıca iki gruba ayrılır: Basit lipitler ve bileşik lipitler. Basit yağlar (trigliseridler) ve mumlardan oluşur. Yağlar (trigliseridler), bir gliserol molekülüne 3 yağ asidi bağlanmasıyla oluşur.

Mumlar ise uzun zincirli yağ asitleri ile uzun zincirli alkollerin esterleşmesiyle oluşur. Bileşik lipitler fosfolipitler, glikolipitler ve lipoproteinlerden olarak sınıflandırılır. Fosfolipitler gliserol, iki yağ asidi ve bir fosfat grubundan (+ bazik grup) oluşur. Hücre zarlarının temel

bileşenidir. Amfipatik yapısı sayesinde çift tabaka oluşturmaktadır. Glikolipitler lipit ve karbonhidrat birleşimidir. Lipoproteinler ise lipitler ve proteinlerin birleşimi olup, yağların kanla taşınmasını sağlamaktadır. Steroidler karbon halkalarından oluşan lipitlerdir (örneğin kolesterol, hormonlar). 4 halka yapısına sahiptir. Kolesterol hücre zarında yapısal rol oynar, aynı zamanda hormonların prekürsörüdür. Kolesterol, lipoproteinler aracılığıyla taşınır. LDL, kolesterolü dokulara taşırken HDL ise fazla kolesterolü karaciğere geri toplamaktadır. Bu nedenle HDL halk arasında 'iyi kolesterol' olarak bilinirken, LDL 'kötü kolesterol olarak bilinmektedir. LDL partikülleri, hücre zarındaki LDL reseptörlerine bağlanır. Bu kompleks endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Hücre içine giren LDL, lizozomlarda parçalanır, kolesterol serbestleşir. Serbest kolesterol hücre zarına katılır ve hormon sentezinde kullanılmaktadır. Gerektiğinde esterleşip depolanmaktadır. Kolesterolden gonadal hormonlara sentez aşamasında kolesterol hücre içinde mitokondriye alınır. Mitokondride pregnenolon adı verilen ara maddeye dönüşmektedir. Pregnenolon'dan çeşitli enzimatik reaksiyonlarla farklı steroid hormonlar sentezlenmektedir (Testesteron, östrojen, progesteron gibi). Aynı zamanda kortizol ve aldosteron gibi adrenal hormonlar da kolesterolden yapılır.

Yağ asitleri karbon zinciri uzunluklarına ve doymuşluklarına göre çeşitlenmektedir. Doymuş yağ asitlerinde karbon atomları arasında çift bağ bulunmaz, genellikle oda sıcaklığında katı halde bulunmaktadır. Doymamış yağ asitleri ise bir veya daha fazla çift bağ içerir, genellikle oda sıcaklığında sıvı halde bulunmaktadır.

Trigliseridler yüksek enerji içermektedir (1 gram yağ ≈ 9 kcal enerji verir). Vücutta enerji deposu olarak kullanılmaktadır. Lipitlerin yapısal olarak fonksiyonuna fosfolipitler ve kolesterolün hücre zarının yapısında bulunması, zarın esnekliği ve geçirgenliğini sağlaması örnek verilebilir. Steroid hormonlar (kortizol, östrojen, testosteron) ve eikosanoidler gibi bazı lipitler hücre içi ve dışı sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Ayrıca yağ dokusu vücut sıcaklığını korumada ve organları mekanik darbelerden korumada görevlidir. Aynı zamanda A, D, E, K vitaminleri gibi yağda çözünen vitaminlerin emiliminde iş görürler.

Yağların sindirimi ince bağırsakta lipaz enzimleri tarafından gliserol ve yağ asitlerine ayrılarak gerçekleşir. Emilim ve taşınımı ise bağırsak hücrelerinde yeniden trigliseride dönüştürülür, lipoproteinler aracılığıyla kan dolaşımına katılmaktadır. Yağ dokusunda trigliseridler olarak depolanmaktadır. Yıkımları ise enerji ihtiyacı olduğunda yağ asitleri mitokondride beta-oksidasyon yoluyla parçalanmaktadır. Böylece uzun zincirli yağ asitleri mitokondride yıkılarak enerji (ATP) elde edilir. Karaciğer lipitlerin hem yapımı hem de yıkımında görevli bir organdır. Lipogenez (yağ asidi sentezi), karaciğerin, glukoz fazlasını yağ asitlerine çevirerek trigliserit meydana getirmesidir. Bu trigliseritler, VLDL olarak kana salınarak dokulara taşınmaktadır. Karaciğer ayrıca hem kolesterol üretir hem de dışarıdan alınan kolesterolü işlemektedir. Kolesterol safra asitlerine dönüştürülür, hücre zarlarının yapısında kullanılır ve steroid hormon ve D vitamini sentezinde kullanılmaktadır. Kolesterol ve fosfolipitler safra içinde micel yapılar oluşturur. Safra asitleri, yağların sindirimi ve

emilimi için gereklidir (özellikle ince bağırsakta trigliseritlerin emilimi için).

Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) atomlarından oluşan organik bileşiklerdir. Genel formülleri $C_nH_{2n}O_n$ olup, bu formül özellikle monosakkaritler için geçerlidir. Monosakkaritler (basit şekerler) en küçük yapıtaşlarıdır, hidrolizle daha küçük birime ayrılmazlar. Genellikle 3–7 karbonludur: Triozlar (C_3) örneğin; Gliseraldehit, tetrozlar (C_4), pentozlar (C_5) örneğin riboz ve deoksiriboz, heksozlar (C_6) örneğin glukoz, fruktoz, galaktoz…gibi çeşitlere sahiptir. Yapılarına göre sınıflandırdığımızda aldoz ve ketozlar olarak iki sınıftır. Aldoz, aldehit grubu içerir ve glukoz örnek verilebilir. Ketoz keton grubu içerir ve früktoz örnek verilebilir.

Disakkaritler, iki monosakkaritin glikozidik bağ ile birleşmesiyle oluşur. Maltoz, iki glukozun bir araya gelmesiyle, laktoz glukoz ve galaktozun bir araya gelmesiyle, sükroz ise glukoz ve früktozun bir araya gelmesiyle oluşmaktadır.

Enerji metabolizmasında ana enerji kaynağı olup, glikoliz, sitrik asit döngüsü (Krebs), ve oksidatif fosforilasyon süreçlerinden geçerek ATP üretir. Glikojen glukozun hayvansal depo formudur (karaciğer ve kaslarda). Gerekli durumlarda glukoz-6-fosfata dönüştürülerek enerji üretimine katılır. Laktat anaerobik glikolizin son ürünüdür. Özellikle yoğun egzersiz sırasında oluşur ve karaciğerde glukoneogenezle yeniden glukoza çevrilebilir (Cori döngüsü).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viarengo ve ark. (1996) tatlı su midyesi *Mytilus galloprovincialis*'te Cu^{2+}'nin solungaç hücreleri plazma membranlarındaki Ca^{2+} homeostaz mekanizmaları üzerindeki in vivo etkilerini incelemiştir. Midyeler, subletal Cu^{2+} konsantrasyonuna (0.6 µM) 1, 4 ve 7 gün boyunca maruz bırakılmış ve Ca^{2+}-ATPaz ile Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktiviteleri, plazma membran açısından zengin alt hücresel fraksiyonlarda ölçülmüştür. Midyelerin solungaç hücrelerinde Ca^{2+} ve Na^{+}/K^{+}-ATPaz aktivitelerini inhibe ederek iyon homeostazını bozduğunu ancak detoksifikasyon mekanizmaları ile enzim aktivitilerinin kısmen geri kazanılabildiğini vurgulamıştır.

Riisgård'ın (2001) bir derlemesinde, süspansiyonla beslenen çift kabuklu yumuşakçalarda filtrasyon hızının ölçülmesini ele alınmış, farklı yöntemlerin kullanımı çeşitli sorunlara yol açmış, yöntemsel hatalar ve deney koşullarındaki farklılıklar filtrasyon hızına ilişkin çelişkili sonuçların başlıca nedenleri olarak belirlenmiştir.

Nel ve ark. (2006) yaptıkları araştırmada nanopartiküllerin canlılar ve çevre üzerinde toksik etkiler oluşturacağını belirtmiş ve bu nedenle nanopartiküllerin güvenli üretimi ve kullanımı için uygun ilke ve test yöntemlerinin geliştirilmesinin acil bir gereklilik olduğunu ifade etmişlerdir.

Ngo, (2008) bir çalışmasında tatlı su midyesi *Anodonta anatine* 'nın düşük düzeyde kadmiyum (Cd) maruziyetinde bile metali hızla biriktirdiğini belirtmiştir. 35 günlük maruziyet ve 120 günlük temizlenme süreci sonunda en yüksek Cd birikiminin böbrekte, en belirgin biyokimyasal etkilerin ise sindirim bezinde görüldüğü anlaşılmıştır. Kadminyumun, kalsiyum dengesini bozduğu, enerji rezervlerini azalttığı ve karbonik anhidraz aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. Bu bulgular, çevresel Cd seviyelerinin bile midyelerde uzun süreli fizyolojik stres ve popülasyon azalmasına yol açabileceğini göstermiştir.

AshaRani ve ark. (2009) nişasta kaplı gümüş nanopartikülleri kullanarak yaptıkları çalışmada insan akciğer fibroblast (IMR-90) ve glioblastoma (U251) hücrelerinde doz bağımlı mitokondri hasarı, ATP azalması, ROS artışı ve DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir.

Camargo ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada, alüminyum ve düşük pH'ın *Prochilodus lineatus* türü balıklarda etkilerini incelemiştir. Genç balıklar 6, 24 ve 96 saat boyunca, asidik suda çözünmüş 196 µg/L Al (Al grubu), yalnızca asidik su (pH grubu) veya nötr pH'lı suya (kontrol grubu) maruz bırakılmıştır. Akut Al maruziyeti, solungaçlardaki Na^{+}/K^{+}–ATPaz aktivitesini ve klor hücrelerinin sayısını azaltarak iyon dengesizliğine yol açmış ve metalin varlığından kaynaklanan stres tepkileri ile birlikte balıklarda ciddi fizyolojik etkiler oluşturduğu öne sürülmüştür.

Köprücü ve ark. (2010) bir çalışmasında, siproletin (cypermethrin)'in tatlı su midyesi *Unio elongatulus eucirrus* üzerindeki antioksidan durumu, oksidatif stres belirteçleri, davranış ve ölüm oranları üzerindeki etkilerini araştırmış ve cypermethrin'in, balıklar kadar hassas olmasa da, midyeler dahil sucul omurgasızlar üzerinde toksik etki gösterdiğini; midyelerin antioksidan sistem üzerinde bozulma, lipit peroksidasyonu ve filtrasyon davranışında azalma meydana getirdiğini

belirtmiştir. Ayrıca araştırmacılar bu pestisitin doğal su ekosistemlerini korumak amacıyla tarımda kullanımına dikkat edilmesi gerektiğinin altını çizmiştir.

Ahamed ve ark. (2010) yaptıkları in vitro çalışmalarda, Ag NP'lerinin deri, karaciğer, akciğer, beyin, damar ve üreme sistemi hücrelerinde toksik etkilere yol açtığını göstermiştir. Ayrıca in vivo hayvan deneylerinde, Ag NP'lerin kana geçerek beyin dâhil birçok organda biriktiğini ve toksisite oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Zhu ve ark. (2010) TiO_2 nanopartiküllerinin *Daphnia magna*'dan *Danio rerio*'ya trofik transfer gösterdiği ancak biyomagnifikasyonun gerçekleşmediğini belirlemişlerdir.

Muisa ve ark. (2011) arıtma tesisi kalıntılarındaki alüminyumun sucul ortamda birikerek *Oreochromis niloticus*'ta böbrek ve karaciğerde yüksek düzeyde biyobirikim oluşturduğunu saptamışlardır.

Santini ve ark. (2011) tatlı su midyesi *Anodonta anatina*'da çevresel açıdan anlamlı konsantrasyonlarda Cu (II)'nin plazma membran Ca^{2+}-ATPaz (PMCA) ve karbonik anhidraz (CA) aktiviteleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Böbrekte Cu (II) birikimi ve PMCA'nın hassasiyetinin, midyelerin elektrolit/osmo-regülasyon ve Ca^{2+} geri alımını bozabileceğini, bu da midyelerin popülasyon düşüşünde Ca^{2+} homeostazının bozulmasının rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Blakeslee ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, yetişkin ve larva dönemindeki *Elliptio complanata* türü midyelerin yaşamı, fizyolojisi ve üremesi üzerindeki etkileri düşük düzeyde tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılarak araştırılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda bile tatlı su midyelerinin üreme, fizyoloji ve hayatta kalma sürecinde ciddi olumsuz etkiler yaratabileceğini göstermişlerdir.

Atli ve Canli, (2013) çalışmasında, gümüş (Ag^{+}), kadmiyum (Cd^{2+}) ve krom (Cr^{6+}) metallerinin tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un solungaç, böbrek ve kas dokularındaki ATPaz aktivitesi üzerindeki etkilerini akut ve kronik etkilerini incelemiş ve Ag^{+}, Cd^{2+} ve Cr^{6+} metallerinin solungaç, böbrek ve kas dokularında ATPaz aktivitelerini bozarak iyon taşınımı ve metabolik işlevleri olumsuz etkilediği belirtilmiştir.

Hanna ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada, çinko oksit nanopartiküllerinin deniz midyesi *Mytilus galloprovincialis* üzerindeki etkileri 12 hafta boyunca incelenmiş ve farklı boyuttaki midyeler, 0.1–2 mg/L ZnO'ya maruz bırakılmıştır. Solunum hızı ZnO derişimine bağlı olarak artmış ve çinko birikimi midyelerin dokularında artmış, küçük midyelerin düşük dozda daha fazla Zn biriktirdiği görülmüştür.

Das ve ark. (2013) çalışmalarında kaplanmış gümüş nanopartikülleri ile kaplanmış ve kaplanmamış titanyum dioksit nanopartiküllerinin *Daphnia magna* yavru bireylerinde üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Nanopartiküllere maruziyet, sucul ekosistemlerde alt trofik düzeylerdeki omurgasızlar üzerinde ciddi ekolojik etkilere neden olabileceğini ifade etmişleridir.

Ercan ve Tarkan, (2014) *Unio crassus* türü midyelerin hayatta kalma ve büyümesi üzerinde tuzluluğun etkilerini incelemiştir. Orta düzey tuzlulukta midyeler en yüksek büyümeyi gösterirken, yüksek tuzluluk konsantrasyonunda büyümenin azaldığını ve tüm bireylerin öldüğünü ifade etmişlerdir.

Baker ve ark. (2014) çalışmalarında metal ve metal oksit nanopartiküllerinin deniz ekosistemlerinde özellikle bentik organizmalarda oksidatif stres ve iyon çözünmesine bağlı kronik etkiler oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Tian ve ark. (2014) TiO_2 nanopartikülleri ile ilgili bir çalışmalarında deniz midyesi *Scapharca subcrenata*'da hidrofobik organik kimyasalların alımı üzerine araştırma yapmıştır. Bu nedenle fenantren kullanılmış ve midyelerde fenantren varlığında ve TiO_2 nanopartikülleri ile birlikte maruz bırakılarak biyobirikim karşılaştırması yapılmıştır. Nanopartiküllerin alınımını kolaylaştırdığını ve birikimin arttığını belirtmişlerdir.

Xia ve ark. (2017) TiO_2 nanopartiküllerinin etkilerini deniz tarağında (*Chlamys farreri)* incelemişlerdir.Deniz tarağında oksidatif stres ve nörotoksisiteye neden olduğunu ve solungaç dokularında da dejenerasyon meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Schiavo ve ark. (2016) ZnO nanopartiküllerinin *Dunaliella tertiolecta* hücrelerinde DNA hasarına, ROS üretiminde artışa ve büyüme inhibisyonuna neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Wang ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada, beş tatlı su midye türü 10 kimyasala karşı 96 saatlik akut toksisite testlerine tabi tutmuştur. Midyeler, alachlor, amonyak, klorür, potasyum, sülfat, bakır, nikel ve çinko için en duyarlı türler arasındayken, organik bileşiklere karşı daha az duyarlı bulunmuştur.

Murali ve ark. (2017) yaptıkları başka bir çalışmada ise Al_2O_3 nanopartikülleri *Oreochromis mossambicus*'un karaciğerinde nekrotik hepatositler, vakuolizasyon ve kan hücresi agregasyonu gibi histolojik anomalilere neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Murali ve ark.'nın (2018) yılında yaptıkları bir çalışmada Al_2O_3 nanopartiküllerine maruz bırakılan tatlı su balığında (*Oreochromis mossambicus*) beyin, solungaç, bağırsak, böbrek ve kas dokularında ciddi histolojik bozulmalar gözlemlemişlerdir.

Khazri ve ark. (2018) cypermethrin maruziyeti, *Unio gibbus*'ta enantiyoselektif birikim, oksidatif stres ve asetilkolinesteraz aktivitesinde azalma gibi biyokimyasal değişimlereve nörotoksik etkilere yol açtığını belirtmişlerdir.

Katsumiti ve ark. (2018) yaygın olarak endüstriyel ürünlerde kullanılan bakır oksit nanopartiküllerinin midye hücrelerinde (hemositler ve solungaç hücreleri) sitotoksisitesini ve toksisite mekanizmalarını, iyonik Cu ve bulk CuO ile karşılaştırarak belirlemiş ve midye primer hücrelerinin duyarlılığını insan TT1 akciğer hücreleri ile karşılaştırmıştır. CuO nanopartikül toksisitesinin hem insan hem de midye hücrelerinde reaktif oksijen türleri ile aracılı olduğunu ve midye hücrelerinin nanopartiküle maruziyetine karşı çeşitli savunma mekanizmalarını aktive ettiğini belirtmişlerdir.

Oliviero ve ark. (2017) farklı boyutlardaki ZnO nanopartiküllerinin *Paracentrotus lividus* embriyolarında mitotik aktiviteyi azalttığını ve kromozomal aberasyonlara yol açtığını vurgulamışlardır.

Yoloğlu (2019) yaptığı bir çalışmada, yaygın kullanılan sistemik neonikotinoid insektisit imidacloprid'in tatlı su midyesi *Unio mancus* üzerindeki sinir sitemi ve antioksidan sistem üzerindeki etkileri incelenmiştir. Midyelerde en düşük konsantrasyonun bile sinir sistemini baskıladığını ve oksidatif strese neden olduğu ifade edilmiştir.

da Silva Fonseca ve ark. (2019) sert mercan *Mussismilia harttii* akut Cu maruziyeti (96 saat), zooxanthellae'in maksimum fotokimyasal verimliliği (Fv/Fm) ve mercan fizyolojisinde önemli rol oynayan enzimler olan karbonik anhidraz (CA) ve Ca-ATPaz aktivitelerini incelemişlerdir. CA enziminin Cu'ya karşı hassasiyeti, bu enzimin mercan resiflerinde çevresel izleme için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Duroudier ve ark. (2019) PVP/PEI kaplı Ag nanopartiküllerine maruz kalan *Mytilus galloprovincialis* bireylerinde DNA kırıkları, mikronükleus oluşumu ve dokusal bozulmalar gözlemlemişlerdir.

Auclair ve ark. (2020) sucul organizmalarda nanopartikül karışımlarının toksik etkileri incelemek amacıyla tatlı su midyesi *Dreissena bugensis*'i, tek tek veya karışım hâlinde 50 µg/L konsantrasyonlarda gümüş (nAg), serium oksit (nCeO), bakır oksit (nCuO) ve çinko oksit (nZnO) nanopartiküllerine maruz bırakmıştır. 96 saatlik maruziyet sonrasında midyelerin nanopartiküllerini biriktirdiğini, nanopartiküllerin davranışı ve etkilerinin diğer nanopartiküllerin varlığından etkilendiğini ve çalışmada hem antagonist hem de potansiyasyon etkileşimleri belirlenmiştir.

Vijayakumar ve ark. (2020) yaptıkları bir çalışmada yumurta albümini ile kaplı ZnO nanopartikülleri kullanarak ROS üretiminin arttığını p53, caspase-3 ve caspase-9 gibi apoptotik genleri aktive ettiğini ve MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını bildirmişlerdir.

Meyer ve ark. (2020) nikel nanopartiküllerinin sucul organizmalardaki toksisitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, mevcut verilerin çoğunun düşük veya orta kalitede olduğu ve nikel nanopartikülünün toksisitesinin, boyut küçüldükçe artmadığı, elementel nikel ve nikel oksitin benzer toksisiteyi gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca nikel nanopartikülünün genellikle çözünmüş nikel kadar toksik olmadığı ve toksisitenin büyük oranda oksidatif stres yoluyla gerçekleştiğini açıklamışlardır.

Ray ve ark. (2020) Hindistan'daki su ekosistemleri, ekolojik öneme sahip yenilebilir inci midyesi *Lamellidens marginalis* türünde bakır oksit nanopartikülünün toksikolojik etkilerini çalışmıştır. Çalışmada solungaç filtrasyon ve solunum hızında, hemosit sayısı ve fagositoz aktivitesinde azalma gözlenmiş, ayrıca nitrik oksit ve fenoloksidaz aktivitesinin azaldığı, buna karşılık süperoksit anyon üretiminin arttığı bulunmuştur. Süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerindeki azalma, oksidatif stresin göstergesi olarak görülmüştür. Bulgular, CuO-NP maruziyetinin akut immün-fizyolojik stres ve oksidatif hasara yol açtığını, bakır sülfatla benzer

iyonik toksisite oluşturduğunu göstermektedir.

Canlı, 2021(a) bir çalışmasında *Oreochromis niloticus* türü tatlı su balıklarında farklı tuzluluklarda (0 ve 10 ppt) Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartiküllerine akut (2 gün, 10 mg/L) ve kronik (20 gün, 1 mg/L) olarak maruz bırakmıştır. CAT ve SOD aktiviteleri akut maruziyette değişmezken, kronik maruziyette her iki tuzlulukta da azaldığı, GPX ve GR'ın da benzer şekilde yalnızca kronik maruziyette azaldığını, GST aktivitesinin ise tersi bir yanıt gösterdiğini bildirmiştir. Bulgular, kronik maruziyetlerin akut maruziyetlere göre daha etkili olduğunu ve tuzluluğun antioksidan enzimler veya NP toksisitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Canlı, 2021(b) diğer bir çalışmasında tatlı su midyesi (*Unio tigridis*) bireylerinde bakırın ($CuSO_4$; 0, 30, 90 µg/L) farklı sürelerdeki (0, 7, 14, 21 gün) etkileri incelemiştir. Yüksek bakır derişimlerinde solungaç ve kas dokularında ATPaz aktivitelerinin değiştiğini, Mg-ATPaz aktivitesi hem artış hem azalış gösterdiğini, Na-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin ise özellikle yüksek derişimde azaldığını göstermiştir. Bu çalışma çevresel düzeydeki bakır kirliliğinin midyelerin iyon dengesi ve ozmoregülasyonunu etkileyebileceğini ve fizyolojik stres oluşturabileceğini ortaya koymuştur.

Zhang ve ark. (2021) Çin'e endemik bir tatlı su midyesi olan *Solenaia oleivora*'da artan tuzluluğa karşı fizyolojik ve transkriptomik tepkilerini incelemiştir. Yüksek tuzluluğun solungaç filamentlerinde büzülme, şekil bozukluğu ve hücresel apoptoza neden olduğunun altını çizmişlerdir. Ayrıca antioksidan ve bağışıklık sistemini baskıladığında yaşam süresini kısalttığını ifade etmişlerdir.

Canlı ve Canlı, 2021(a) tatlı su midyesi *Unio tigridis*'in solungaç dokusundaki Na-ATPaz ve Ca-ATPaz enzimlerinin optimum çalışma koşullarını (iyon derişimi, pH, sıcaklık, enzim miktarı, inkübasyon süresi vb.) belirlemiş ve bu enzimler üzerine alüminyum ve bakırın iyonik (Al^{3+}, Cu^{2+}) ve nanopartikül (Al_2O_3, CuO) formlarının etkilerini incelenmiştir. Sonuçlara göre, iyonik Al ve Cu enzim aktivitelerinin azaldığını, nanopartikül formlarında belirgin bir etki görülmediği ayrıca, 10 mM'e kadar ouabain-duyarlı ATPaz aktivitesinin saptanmadığı belirtilmiştir. Bu çalışma iyonik ve nanopartikül formlarının farklı etki mekanizmalarına sahip olduğunu ve in vivo çalışmaların bu etkilerin daha iyi anlaşılması için gerekli olduğunu göstermiştir.

Canlı ve Canlı, 2021(b) başka bir çalışmasında ise tatlı su midyesi *Unio tigridis*'in metal oksit nanopartiküllerine (NP; Al_2O_3, CuO, TiO_2) karşı antioksidan enzim tepkilerini ölçmüştür. Midyeler, 14 gün boyunca farklı NP derişimlerine (0, 1, 3, 9 mg/L) maruz bırakılmış, CAT ve SOD aktivitelerinin azaldığı glutatyon metabolizması enzimlerinin (GPx, GST) arttığı görülmüştür. Bu çalışma, *U. tigridis*'in nanopartiküllere karşı ilk antioksidan yanıt mekanizmasını ve nanopartikül toksisitesinin ekosistem düzeyinde daha kapsamlı araştırılması ile kullanımlarına yönelik düzenlemelerin gerekliliğini vurgulamaktadır.

Canlı, (2022) bir çalışmasında, *Unio tigridis* midyelerini farklı bakır ($CuSO_4$) derişimlerine (0, 30, 90 µg/L) ve sürelerine (0, 7, 14, 21 gün) maruz bırakarak hepatopankreas ve solungaç

dokularında CAT, SOD, GPX, GR ve GST enzim aktivitelerini incelenmiştir. Uzun süreli maruziyette antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artışlar olduğunu, CAT ve SOD en fazla artış gösteren enzimler olduğunu ve toplam protein düzeyine değişim olmadığını belirtmiştir. Bu çalışma letal olmayan bakır derişimlerinin midyelerde oksidatif strese yol açtığını göstermiştir.

Canlı ve Canlı, (2022) çalışmalarında, *Unio tigridis* midyelerini 14 gün boyunca farklı derişimlerdeki (0, 1, 3, 9 mg/L) Al_2O_3, CuO ve TiO_2 nanopartiküllere maruz bırakmış ve solungaç ile kas dokularındaki Na-ATPaz, Ca-ATPaz ve Mg-ATPaz aktiviteleri incelemiştir. Dokularda ouabain-duyarlı ATPaz aktivitesi saptanmamış olup, solungaçta Na-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin azaldığı, Mg-ATPaz aktivitesinin arttığı, kas dokusunda ise tüm ATPaz aktiviteleri azaldığını gösterilmiştir. En belirgin etkiler solungaçta gözlendiği ve nanopartiküllerin etkisinin sırayla en fazla TiO_2, CuO ve Al_2O_3 şeklinde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmanın, *U. tigridis*'te nanopartiküllerin ATPaz aktivitelerine etkilerini ortaya koyan ilk in vivo araştırma olduğu, midye fizyolojisinin nanopartiküllere karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Canlı ve ark. (2022) tatlı su midyesi (*Unio tigridis*)'in dokularında metal oksit nanopartikülerinin (Al_2O_3, CuO, TiO_2) birikimini incelemiştir. Midyeler, 14 gün boyunca farklı NP derişimlerine (0, 1, 3 ve 9 mg/L) maruz bırakılmış ve dokulardaki metal düzeyleri ICP-MS ile, nanopartikül varlığı ise TEM ile belirlenmiştir. TEM görüntüleri, nanopartiküllerin sindirim bezi ve kas dokularında bulunduğunu ve lizozomlar veya endozomlar yoluyla alındığını göstermiş olup, en yüksek metal birikiminin solungaçta gözlendiği görülmüştür. Bu çalışma, *U. tigridis*'in metal oksit nanopartiküllerinini dokularında biriktirebildiğini ve bu türlerin metal kirliliğinin biyoindikatör organizmaları olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Pepe ve ark. (2022) tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'ta tuzluluk artışı ve metal oksit nanopartiküllerinin (Al_2O_3, TiO_2) birikimi ile ATPaz enzimleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Balıklar, 0 ve 10 ppt tuzlulukta, 1 ve 10 mg/L NP derişimlerinde 2 gün (akut) ve 20 gün (kronik) süreyle maruz bırakılmıştır. Nanopartiküllerin birikiminin en yüksek düzeyde solungaç dokusunda gözlendiği ve tuzluluk artışının akut maruziyette NP birikimini arttırdığı, kronik maruziyette azalttığı mıştır. Ayrıca, tuzluluk ve NP maruziyetinin, ATPaz aktivitelerinde %50–80'e varan azalmalara neden olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, tuzluluk artışı ve nanopartikül kirliliğinin beraberinde balıkların ozmoregülasyon sistemine ciddi zarar verebileceğini ve tatlı su ekosistemleri için potansiyel bir tehdit oluşturduğunu ifade etmiştir.

Canlı ve ark. (2023) tatlı su midyelerini (*Unio tigridis*) 14 gün boyunca farklı derişimlerdeki (0, 1, 3, 9 mg/L) Al_2O_3, CuO ve TiO_2 nanopartiküllerine maruz bırakmış ve sindirim bezi ile ayak kasındaki biyobelirteç tepkilerini incelemiştir. Sindirim bezinde toplam, indirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyon (GSH, rGSH, GSSG) ile malondialdehit (MDA) düzeylerinin arttığını, ayak kasında asetilkolinesteraz aktivitesi ve toplam enerji rezervlerinin özellikle yüksek derişimlerde azaldığını belirtmiştir. Bu çalışma, farklı metabolik sistemlere ait biyobelirteçlerin nanopartikül maruziyetine duyarlı olduğunu göstererek, bunların tatlı su ekosistemlerinin izlenmesinde kullanılabileceğini

vurgulamıştır.

Lassoued ve ark. (2023) yaptıkları bir çalışmada, artan su tuzluluğunun *Unio ravoisieri*'de oksidatif stresle ilişkisini araştırmıştır.Su tuzluluğunun *Unio ravoisieri* için ciddi bir stres kaynağı olduğunu ve CAT aktivitesinin tatlı su tuzlanmasının etkilerini değerlendirmede hassas bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Lai ve ark. (2023) tarafında yapılan başka bir çalışmada ise farklı sıcaklıklar (15, 25 ve 30 °C) ve tuzluluklar (12 ve 32 PSU) altında ZnO-NP'lerinin fizikokimyasal özellikleri ile deniz midyesi *Xenostrobus securis* üzerindeki subletal toksisiteleri ve bunların Zn^{2+} iyonlarının (çinko sülfat heptahidrat) toksisitesi karşılaştırılmıştır. En yüksek sıcaklık ve tuzlulukta (30 °C, 32 PSU) ZnO-NP'lerinin partikül aglomerasyonunun arttığını, ancak çinko iyonu salınımının azaldığını belirtmişlerdir. Aynı koşullarda ZnO-NP'leri midyelerin hayatta kalma ve filtreleme hızlarını önemli ölçüde azalttığı da belirtilmiştir. Midyelerdeki glutatyon S-transferaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri 30 °C'de baskılanmıştır. Bu durum, artan sıcaklık ve tuzlulukla birlikte midyelerdeki çinko birikiminin de arttığını, bunun ise partikül aglomerasyonundaki artış ve midyelerin bu koşullardaki filtreleme hızının yükselmesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Uğurlu ve Kumruoğlu, (2024) araştırmalarında Gölbaşı Gölü'nden toplanan dört tatlı su midyesi türünün (*Potomida semirugata, Unio terminalis, Anodonta pseudodopsis, Leguminaia wheatleyi*) kabuklarında SEM-EDS analizi ile periostrakum ve sedef tabakasının yüzey morfolojisini ve metal (Na, Sr, Mn, K, Ti, Fe, Mg, Co, Cu, Cr, Zn, Ni) düzeylerini belirlemiştir. Analizler, kabukların $CaCO_3$ yapısına sahip olduğunu ve kristal form farklılıkları bulunduğunu göstermiştir: *P. semirugata* ve *U. terminalis*'in düzenli çokgen kristal yapıya, *A. pseudodopsis*'in yuvarlak, *L. wheatleyi*'nin ise düzensiz kristal tabakalara sahip olduğu belirlenmiştir. Element analizinde ise en yüksek konsantrasyon sodyum (Na) olarak bulunmuş (82.30–155.37 μg/g). En çok elementler sırasıyla Na, Sr ve Mn olmuştur. Çalışmaları, Gölbaşı Gölü'nde dört farklı tatlı su midye türünde yapılan ilk metal dağılım araştırması olması bakımından önemlidir.

Wu ve ark. (2025) tarafından Baltık Denizi'nde *Mytilus edulis* türü midyelerde yapılan bir çalışmada ZnO nanopartiküllerinin kirliliği araştırılmıştır. Araştırmacılar hipoksi kaynaklı oksidatif stresin arttığını, redoks dengesini bozduğunu, iyileşme sürecini engellediğini, antioksidan savunmayı zayıflatarak ve bazı hücresel yanıt yollarını da (HIF-1α, p53, JNK, p38, HSP70, Lon proteaz, kaspaz-3) bozduğunu belirtmişlerdir.

Canlı ve Canlı, (2025) çalışmalarında *Unio tigridis* türü tatlı su midyelerini farklı derişimlerde kadmiyum (0, 30, 90, 270 μg Cd/L) etkisine 21 gün bıraktıktan sonra farklı metabolik sistemlere ait biyobelirteçlerin tepkilerini incelemişlerdir. Araştırıcılar midye antioksidan savunma sisteminin enzim aktivitelerini artışa geçirdiğini, ozmoregülasyon sistemine özgü olan Na-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerinin azaldığını, bunun aksine Mg-ATPaz aktivitesinin ise arttığını göstermişlerdir. Diğer yandan, bütün bu metabolik dalgalanmalarının sonucu olarak midyelerin

enerji stoklarında da anlamlı azalmalar olduğunu vurgulamışlardır.

3. MATERYAL VE METOT



Şekil 3.1. Tatlı su midyesi *Unio delicatus* Lea, 1863. Gölbaşı, Hatay

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Nanopartiküller

Nikel oksit nanopartikülü: NiO (18 nm)
(Nanografi, Ankara)

Çinko oksit nanopartikülü: ZnO (18 nm)
(Nanografi)

Antioksidan Parametrelerinin Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

Potasyum fosfat (KPO4)

Hidrojen peroksit (H2O2)

Potasyum klorür (KCI)

EDTA (Etilendiamintetraasetikasit, Merck)

Fosforik asit (H3PO4)

Potasyum hidroksit (KOH)

Hipoksantin (C5H4N4O)

Ksantin oksidaz (XOD)

Cytochrome C (Cyt C)

Glutatyon (GSH)

Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)

CHP (Cumene hydroperoxite)

CH3OH (Metanol)

GSSG (Okside glutatyon)

CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzen)

Etanol (C2H6O)

Sülfosalisilik asit ($C_7H_6O_6S$ * 2 H_2O)

DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid))

Glutatyon redüktaz (GR)

Sodyum fosfat (NaPO4)

2-Vinilpiridin ($CH_2CHC_5H_4N$)

Sodyum hidroksit (NaOH)

Protein Analizinde Kullanılan Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3, Merck)

Sodyum hidroksit (NaOH, Merck)

Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$,

Merck) Bakır (II) sulfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$, Merck)

Folin Ciocalteu Fenol Ayıracı (Sigma)

Bovin Albumin (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

UV Spektrofotometresi: Biyokimyasal parametrelerin düzeylerinin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılacaktır.

pH metre: Tampon pH'larının ayarlanmasında ve çözelti pH'larının ölçülmesinde kullanılacaktır.

Isıtıcı ve magnetik karıştırıcı: Çözeltilerin hazırlanması ve ısıtılması için kullanılacaktır.

Otomatik mikro pipet: Enzim ve substrat çözeltilerinin istenen hacimde alınabilmesi için kullanılacaktır.

Analitik terazi: Tartım yapmak amacı ile kullanılacaktır.

Çalkalayıcılı su banyosu: Enzim aktivitelerinin tayininde kullanılacaktır.

Ultra santrifüj: Homojenizasyon işleminden sonra enzim içeren süpernatantın elde edilmesi amacıyla kullanılacaktır.

Derin dondurucu: Homojenatların düşük sıcaklıklarda (-80 ^oC) saklanmasında kullanılacaktır.

Sonikatör: Hazırlanan NP çözeltilerini homojen yapmak için kullanılacaktır.

3.2 Yöntem

Deney hayvanı olarak *Unio delicatus* türü tatlı su midyesi kullanılmıştır (Şekil 2.1). Midyeler dalgıçlar tarafından uygun sulardan toplanmış, daha sonra midyeler çeşme suyu içeren stok akvaryumlara (40x40x120 cm; 120 L) dağıtılarak ve bu koşullara da adaptasyonları için birkaç hafta

bekletilmiştir. Adaptasyon sürecinde ve deneylerde kullanılan suyun özellikleri şöyledir; pH (8.3±0.08), toplam sertlik (304.2±21.2 mg $CaCO_3$/L) ve iletkenlik (580±10.8 µS/cm). Midyelere oksijen sağlamak amacıyla bir hava motoru kullanılmış ve oksijen düzeyi (6.0±1.0 mg/L) seviyelerinde tutulmuştur. Suyun bütün kontrolleri Thermo Scientific Orion 5-Star cihazı ile düzenli olarak yapılmıştır. Hem adaptasyon hem de asıl deneyler aşağıda belirtilen sıcaklık ve aydınlatma periyodu kurallarına uygun olarak yapılmıştır.

Adaptasyon sürecinin sonunda midyeler, 10 L su alabilen deney akvaryumlarına alınmış ve her akvaryumda 10 midye olacak şekilde rastgele dağıtılmıştır. Midyeler NiO (18 nm), ve ZnO (18 nm NP'lerinin 0 (kontrol), 0.5, 2.5 ve 12.5 mg/L derişimlerine 14 gün süre ile maruz bırakılmışlardır. Deneylerde her bir koşul için 10 midye tekrarı kullanılacağından hata payı minimuma indirilmiştir. Deneylerde kullanılan midyelerin ortalama boy ve ağırlıkları ile ilgili standart hataları sırasıyla 56.7±1.20 mm ve 28.8±1.60 gram şeklinde olmuştur. Kontrol ve deney grupları arasında boy ve ağırlık bakımından anlamalı fark görülmemiştir ($p>0.05$). Deneyler sırasında, cam yüzeylere tutunma, suyun buharlaşması ve NP'lerin dibe çökmesi gibi nedenlerle akvaryumlardaki NP'ler ve akvaryum suları her gün tamamen değiştirilmiştir. Midyelerin beslenmesi tek hücreli alglerle (*Cholorella vulgaris*) yapılmıştır. (250000 alg/ml). Deney süreleri sonunda akvaryumdan alınan midyelerin, boyları en yakın cm, ağırlıkları da en yakın gram cinsinden ölçüldükten sonra, dokuları dikkatli bir şekilde alınmıştır. Dokular kullanılacakları zamana kadar –85 ^oC'de (Esco UUS-480A) muhafaza edilmiştir. Dokular, 100 mM KCl ve 1 mM EDTA içeren 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile 1/10 oranında seyreltilerek 9500 rpm'de 1-2 dk buz üstünde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 10.000 g'de 30 dk (+4 ^oC) santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümünde kullanılmıştır.

3.2.1. Antioksidan Sistem Parametreleri Ölçümü

Katalaz (CAT) Aktivitesi Ölçümü

Katalaz enzim aktivitesi enzimin hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalama yeteneğini, H_2O_2'nin 37^oC'de 240 nm dalga boyundaki UV absorbsiyonunun zamanla azalması esasına göre ölçme prensibidir. H_2O_2 240 nm'de ışığı absorbe etmesi nedeniyle absorbans azalışı H_2O_2'nin ortamda azalmadığını göstermektedir. Bu metodun hesaplanmasında 240 nm'de H_2O_2 ekstinksiyon katsayısı elde edilir ve katalaz enzim aktivitesi hesaplanmaktadır (Beutler, 1984).

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

Çizelge 3.1'de CAT aktivitesinin ölçümünde kullanılan ayıraçlar, kör ve örnek tüplerindeki miktarlarını göstermektedir.

Çizelge 3.1. CAT aktivitesi ölçümü yöntemi

Çözeltiler ve Ayıraçlar	**Kör (µl)**	**Örnek (µl)**
Fosfat Tamponu + H_2O_2	----	980
Fosfat Tamponu	980	----
10 dakika 37°C'de inkübe edildi		
Örnek (µl)	20	20

Kör ve örnek tüplerinin absorbansı 240 nm dalga boyunda 0 ve 1. dakikalarda okunur ve birim olarak µmol H_2O_2/mg prot./dk şeklinde ifade edilmektedir.

CAT aktivitesinin hesaplanması;

CAT aktivitesi (U/ml) = OD x Vt / 0.039 / Vö

OD = Zamana göre absorbans değişimi

Vt = Toplam hacim

Vö = Örnek hacim

t = Zaman

0.039 = H2O2'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

$$\text{CAT spesifik aktivitesi} = \frac{\text{OD (Ör.-kör) x Vt}}{\text{0.039 x Vö x t x (mg prot./ml)}}$$

Glutatyon peroksidaz (GPx) Aktivitesi Ölçümü

Glutatyon peroksidaz t-bütil hidroperoksit bulunan ortamda glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu gerçekleştiren enzimdir. Okside glutatyonun tekrar GSH'a indirgenmesi için glutatyon Redüktaz (GR) ve NADPH'a ortamda ihtiyaç vardır. Çünkü GPx aktivitesinin ölçümü için NADPH'ın NADP+'ye oksidasyonu gereklidir. Reaksiyonda oluşan rengin absorbansının 340 nm dalga boyunda okunması ile aktivite ölçümü yapılır (Livingston ve ark., 1992).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O$$

Kullanılan Ayıraçlar;

1. 100 mM KPO4 Tamponu (pH 7.4)
2. 40 mM GSH
3. 16 U/ml GR

4. 0.48 mM NADPH
5. 3 mM CHP

Çizelge 3.2 ‘de belirtilen GPx aktivitesinin ölçümünde kullanılan çözeltiler, kör ve örnek miktarları sırayla eklenir. Kör tüplerine sadece örnek miktarı kadar saf su eklenir (Çizelge 3.2). Bu süre sonunda meydana gelen tepkime 1 cm ışık yoluna sahip kuvartz küvetlerde 37 ºC’de, 340 nm dalga boyunda okuma yapılır. Okumalar 0. ve 1. dakikalarda tekrarlanarak absorbans değerleri not edilir. Elde edilen GPx aktivitesi toplam proteine bölünerek normalize edilir ve µmol/mg prot./dk. olarak ifade edilir.

Çizelge 3.2. GPx aktivitesi ölçümü yöntemi

Çözeltiler	Örnek (µl)
Fosfat tamponu	547.5
GSH	37.5
GR	37.5
NADPH	37.5
Örnek	15
10 dakikada 37ºC'de inkübe edilir.	
CHP	75

GPx aktivitesinin hesaplanması;

GPx Aktivitesi (U/mL) = OD / t x Vt/6.22xVö

OD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

Vö = Örnek hacmi Vt = Toplam hacim

6.22 = 1 µmol NADPH’ın 1 cm’lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$$\text{GPx spesifik aktivitesi} = \frac{\text{OD (Ör.-kör)} \times \text{Vt}}{6.22 \times \text{Vö} \times t \times \text{mg prot/ml}}$$

Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Ölçümü

GSSG’nin GSH’ye indirgenmesini katalizleyen enzim glutatyon redüktazdır. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda NADPH olması gereklidir. NADPH’ın NADP+’ye yükseltgenmesi esnasında oluşan absorbans farkının 340 nm dalga boyunda ölçülmesiyle GR aktivitesi hesaplanmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1975).

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

GR aktivitesi ölçümü için 100 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.4) ve günlük hazırlanan 2.4 mM NADPH ve 10 mM GSSG kullanılır. Bu bileşiklerin fosfat tamponunda çözülmesi gerekmektedir. Çizelge 3.3'de belirtildiği gibi GR aktivitesinin ölçümü için kullanılan çözeltiler, kör ve örnek miktarları sırayla eklenir. Kör tüplerine sadece örnek miktarı kadar saf su eklenir.

Çizelge 3.3. GR aktivitesi ölçümü özet tablosu

Çözeltiler	Kör (µl)	Örnek (µl)
Örnek	-	15
KPO_4 tamponu	750	629
NADPH	-	31.25
GSSG	-	75

Bu karışımlar iyice çalkalandıktan sonra 340 nm dalga boyunda 37oC'de köre karşı okunur. Okumalar 0. ve 1. dakikalarda yapılarak iki absorbans değeri elde edilir. GR aktivitesi µmol/mg prot./dk. olarak ifade edilir.

GR aktivitesinin hesaplanması;

OD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

Vö = Örnek hacmi Vt = Toplam hacim

6.22 = 1 µmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$$\text{GR spesifik aktivitesi} = \frac{\text{OD (Ör.-kör)} \times Vt}{6.22 \times Vö \times t \times \text{mg prot/ml}}$$

Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi Ölçümü

Glutatyona bağlı tiyol (-SH) grubunun elektrofilik bileşiklerle tepkimeye girmesini, katatlizleyen enzim glutatyon S-transferaz enzimidir. GST aktivitesinin ölçümünün esası GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu esnasında oluşan absorbansın spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okunmasına dayanmaktadır (Habig ve ark., 1974). GST aktivitesi ölçümü için 100 mM Fosfat Tamponu (pH 7.4), 20 mM CDNB ve 20 mM redükte glutatyon kullanılır.

Aşağıda çizelge 3.4' de belirtildiği gibi GST aktivitesini ölçmek için gerekli çözeltiler, kör ve örnek miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.4. GST aktivitesi ölçümü özet tablosu

Çözeltiler	Kör (µl)	Örnek (µl)
Örnek	-	20
Fosfat Tamponu	900	880
CDNB	50	50
GSH	50	50

Deney tüplerine çizelge 3.4 'de gösterilen maddeler eklenir ve sonra iyice çalkalanarak 340 nm de 25 ^{o}C'de, 1 dakika süresince absorbanslar izlenerek ve not edilir. GST aktivitesi µmol/mg prot./dk. olarak ifade edilmektedir.

OD= Zamana göre absorbans değişimi

Vö = Örnek Hacmi

Vt = Toplam Hacim

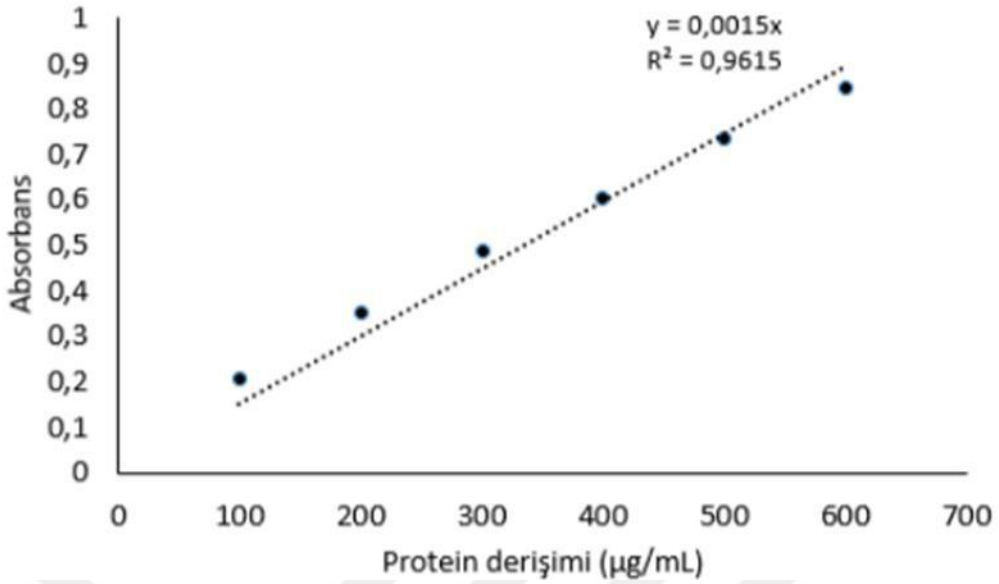
9.6 = 20 mM CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri GST aktivitenin hesaplanması;

$$\text{GST spesifik aktivitesi} = \frac{\text{OD (Ör.-kör)} \times \text{Vt}}{9.6 \times \text{Vö} \times \text{t} \times \text{mg prot/ml}}$$

3.2.2. Organik Madde Ölçümü Analizleri

Protein Analizi

Hepatopankreas dokusunda ölçülen antioksidan enzim aktivitelerinin bir anlam ifade edebilmesi için normalize edilmesi gerekmektedir. Dokuları tartım esnasında µg düzeyinde eşit miktarda almak mümkün olamayacağından doku miktarının eşit olması amacıyla toplam protein düzeyleri de ölçülmüştür. Enzim aktivitelerinin ölçüldüğü supernatantlarda toplam protein miktarı Lowry metodu (Lowry ve ark, 1951) kullanılarak ölçülmüştür. Bu metodun esası, proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks meydana getirmesi esasına dayanır. Oluşan mavi rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülerek kantitatif olarak protein miktarları belirlenmiştir. Bu metodun prensibinde proteinler alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini meydana getirmesi ve Folin-Ciocalteu çözeltisi ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksinin tirozin ve triptofan kökleriyle birleşmesi yer alır. Protein analizleri için gerekli olan ayraçlar aşağıda listelenmiştir (Atlı, 2009).



Şekil 3.2. Protein standart rekreasyon eğrisi.

Ayraçlar:

1. Ayraç A: % 2 Na2CO3 (0.1 N NaOH içinde). 2 g Na2CO3 tartılarak 0.1 N NaOH içinde çözülür.
2. Ayraç B1: % 1 CuSO4. 5H2O. 1 g CuSO4.5H2O tartılıp, 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.
3. Ayraç B2: % 2 Na-K-Tartarat. 2 g Na-K-Tartarat tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.
4. Ayraç C: 50 hacim ayıraç A + 1 hacim eşit oranda karıştırılan ayıraç B1 ve B2 kullanılır.
5. Folin-Ciocalteu Çözeltisi: 1'e 1.5 oranında saf su ile seyreltilmelidir.
6. Standart Bovin Albumin Çözeltisi: 1 mg/mL (1000 µg/mL) bovin albumin olacak şekilde stok bovin albumin çözeltisi hazırlandı. Elde edilen protein absorbanslarının kantitatif değerlerinin (miktarları) hesaplanabilmesi için bir seri olarak hazırlanılan protein standartlarından faydalanıldı. Uygun seyreltmelerle stok çözeltiden sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600 µg/mL standart çözeltiler elde edildi.

Protein analizleri için önce örneklerden ve standart çözeltilerden eşit miktarda (0.3 mL) alınarak örnek tüplerine konulup ve bunların üzerine 3 mL C ayıracı eklendi. Daha sonra tüpler çalkalanarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Bu süre sonunda tüplere 100 µL Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk daha bekletilen bu karışımlarda oluşan mavi rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda su körüne karşı okundu. Dokulardaki protein miktarını belirlemek için standart derişimleri ve bunların absorbans değerlerinden elde edilen regresyon eğrisi ve formülden yararlanıldı. Protein için elde edilen lineer regresyon eşitliği

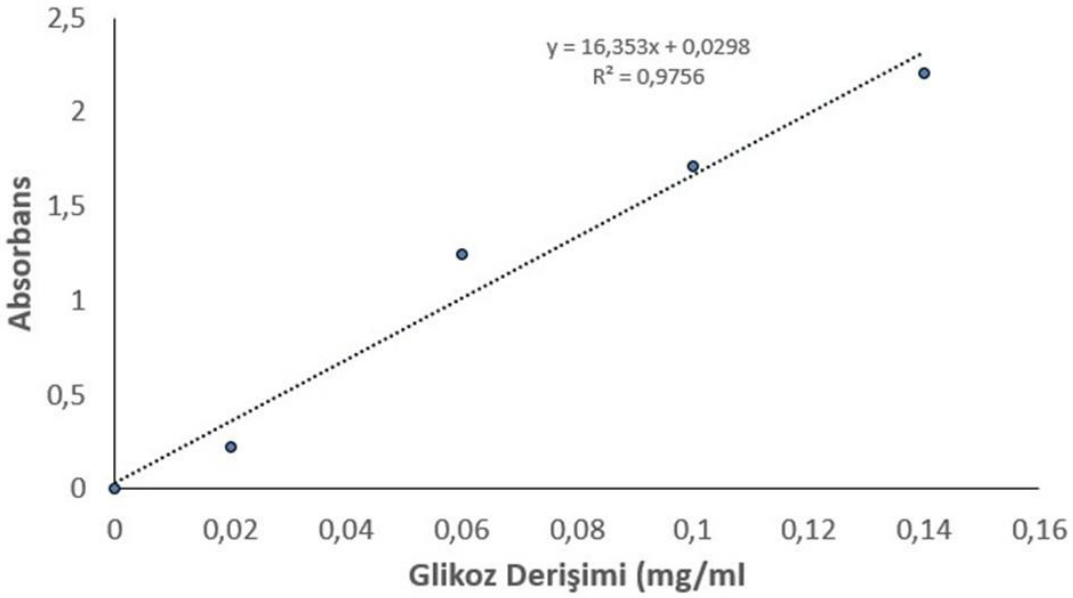
y=0,0015x (R^2= 0,96) olarak bulundu (Şekil 2.2).

Karbonhidrat ve Lipit Analizi

Dokulardaki karbonhidrat ve lipit miktarının analizi için -80 °C de saklanan dokular öncelikle oda sıcaklığında eritildi. Yaklaşık 200 mg doku hassas terazide tartılarak bir cam deney tüpüne kondu. Dokuların üzerine üzerine 2 ml %2 lik Na_2SO_4 eklenerek 10000 devir/dk da 1 dakika süreyle homojenize edildi. Daha sonra homojenatlara 4 ml kloroform/metanol (1/2) çözeltisi eklenerek homojenizasyona 1 dakika daha devam edildi. Daha sonra homojenatlar 9000 devir/dk da 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar dikkatli bir şekilde temiz eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra lipit ve glikoz analizleri yapıldı.

Karbonhidrat Miktarının Tayini

Karbohidrat miktarının analizinde Van Handel (1985b) tarafından geliştirilen Anthrone methodu kullanılmıştır. Karbonhidrat miktarının analizi için de öncelikle 0.10 g/ml glikoz bulunan stok standart çözeltisi hazırlanarak ve seri seyreltmeler yoluyla son derişimi 0.020, 0.060, 0.10, 0.14, 0.18, 0.22, 0.26 mg/ml glikoz olan standartlar hazırlanmıştır. Standartlar spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiş ve standartlara ait glikoz regresyonu denklemi elde edilmiştir (y=16.35x+0.0298 (R^2= 0,98). Bunun için daha önce hazırlanan doku süpernatantlarından 200 µl alınarak cam tüplere aktarıldı. Tüplerde bulunan kloroform/metanol karışımının buharlaşması için 90 °C su banyosunda bekletildi. Tüpler soğuduktan sonra içerisine 1 ml antron çözeltisi eklenmiş ve tekrar 90 °C de su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. İyice soğuyan örneklerde oluşan rengin absorbansı köre karşı 625 nm de okundu. Standartlardan elde edilen denklem yardımıyla örneklerdeki glikoz derişimi hesaplanmıştır (Şekil 2.3).



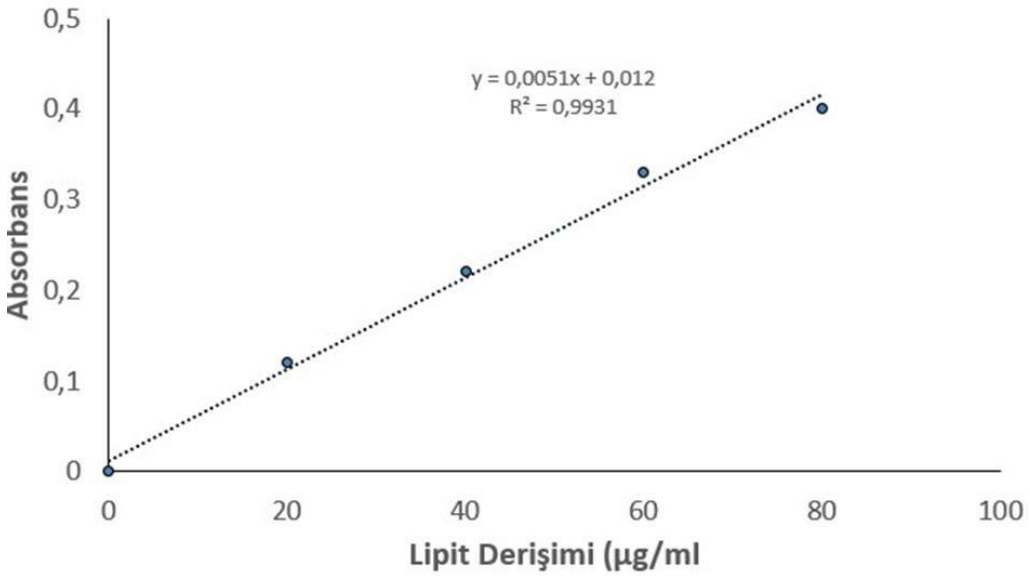
Şekil 3.3. Karbonhidrat standart rekreasyon eğrisi

Lipit Miktarının Tayini

Van Handel (1985a) 'in yöntemi kullanılarak yapılan analizde öncelikle lipit standartları hazırlanmıştır. Bunun için % 0.10 lik mısır yağı (corn oil, Merk) kullanıldı. Standart çözeltinin stok konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde ayarlanmış ve bu stoktan seri seyreltmeler ile 25, 30, 35, 40,

45, 50, 55, 60, 65, 70 µg/ml olacak şekilde lipit standartları hazırlanmıştır. Süpernatant örnekleri ve standartlar aynı muameleye tabii tutulmuştur. Bunun için 200 µl örnek veya standart cam tüplere ilave edildi. Bu cam tüpler, kloroform/metanol çözeltisinin buharlaşabilmesi için 90°C lik sıcak su banyosunda tamamının buharlaşması gerçekleşinceye kadar ısıtıldı. Daha sonra soğutulan tüplere 40

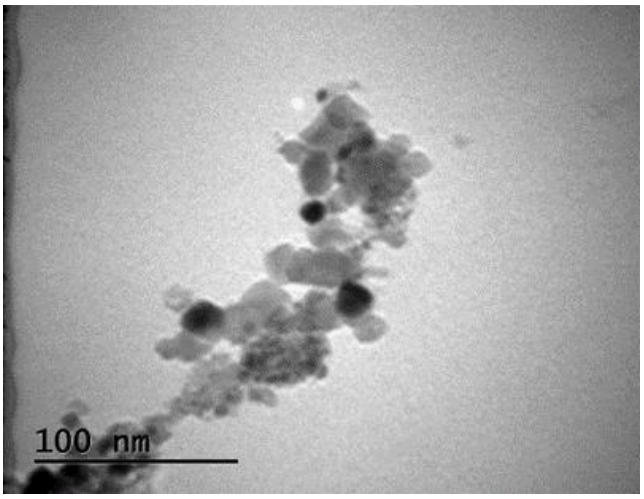
µl konsantre sülfürik asit çözeltisi eklendikten sonra bir vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. Akabinde tekrar 90°C lik su banyosuna konan örnekler 2 dk daha bekletildi. Örneklere soğuduktan sonra 960 µl vanilin-fosforik asit reaktifi konuldu karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika beklendi ve renk oluşumu gözlenmiştir. Daha sonra numunelerin absorbansları spektrofotometrede 525 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Standart verilerinden elde edilen formül y=0.0051x+0.012 (R^2= 0,99) yardımıyla örneklerdeki lipit miktarı hesaplandı (Şekil 2.4).



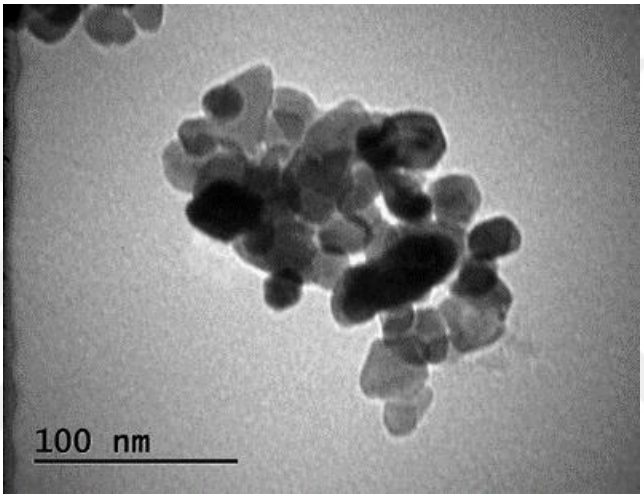
Şekil 3.4. Lipit tayini standart rekreasyon eğrisi

3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

NiO ve ZnO nanopartikülleri (NP) Nanografi Şirketi'nden (Ankara, Türkiye) satın alınmıştır. Nanografi'nin bilgi formuna göre, NiO ve ZnO NP'lerinin ortalama parçacık boyutu 18 nm olup saflıkları %99 civarındadır. NiO NP'lerin yüzey alanı (m^2/g) ve yoğunluğu (g/cm^3) sırasıyla >95 ve 6.8 olarak belirlenmiştir. ZnO NP'lerinin özgül yüzey alanı (m^2/g) ve yoğunluğunun (g/cm^3) ise sırasıyla 20-65 ve 5.5 olarak belirlenmiştir. NP'lerin Transmisyon Elektron Mikroskobu (Jeol JEM-1010 TEM) görüntüleri, GATAN 782 ES500W Erlangshen kamerasına bağlı 80 kW'lık bir güç kullanılarak alınmıştır (Şekil 2.5). Bu görüntülerde NP'lerin şekil ve boyutu halkında önemli bilgiler vermektedir. NP'lerin XRD (X-ışını kırınımı) analizleri PANalytical Empyrean difraktometre sistemi kullanılarak elde edilmiştir. XRD analizleri NiO NP'lerinin polikristal bir desene ve hekzagonal bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 2.6). XRD analizleri ZnO NP'lerinin de kristal özellik gösterdiğini ve küresele yakın bir yapıda olduğunu göstermiştir (Şekil 2.7). Nanopartiküllerin element bileşimini belirlemek için Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ile Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) analizleri yapılmıştır. Bunun için bir OctanePlus EDX dedektörüne bağlı bir FEI Quanta FEG650 SEM cihazı kullanılmıştır. Analizler NiO nanopartiküllerinin yaklaşık %78 nikel ve %28 oksijen (ağırlıkça) içerdiğini, ZnO NP'lerin ise %76 çinko ve %24 oksijen (ağırlıkça) içerdiğini göstermiştir. XRD ve FE-SEM EDX analizleri Çukurova Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında (ÇÜMER), TEM görüntüleri ise Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama Merkezinde (DÜBTAM) yapılmış olup, veriler Prof. Dr. Mustafa CANLI tarafından bu teze eklenmesi için verilmiştir.

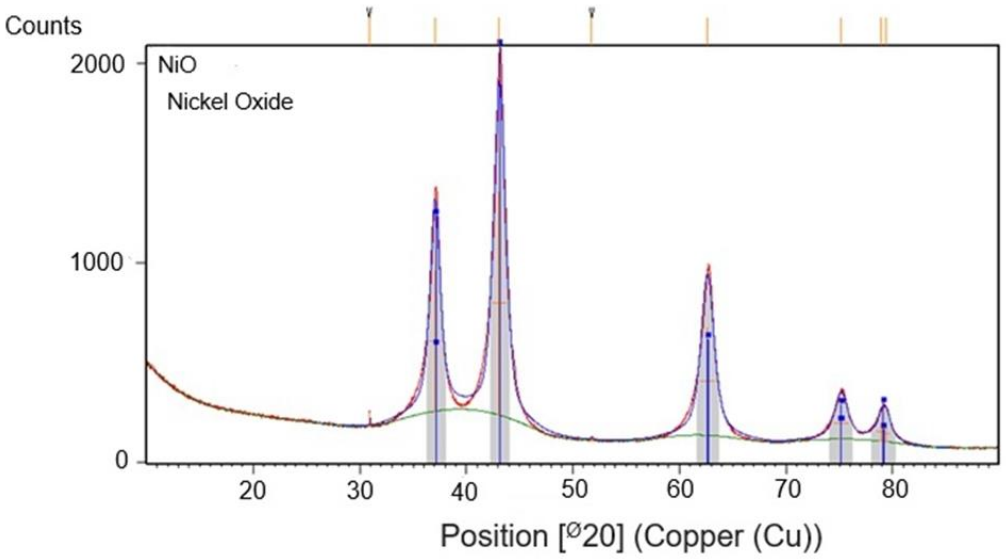


A

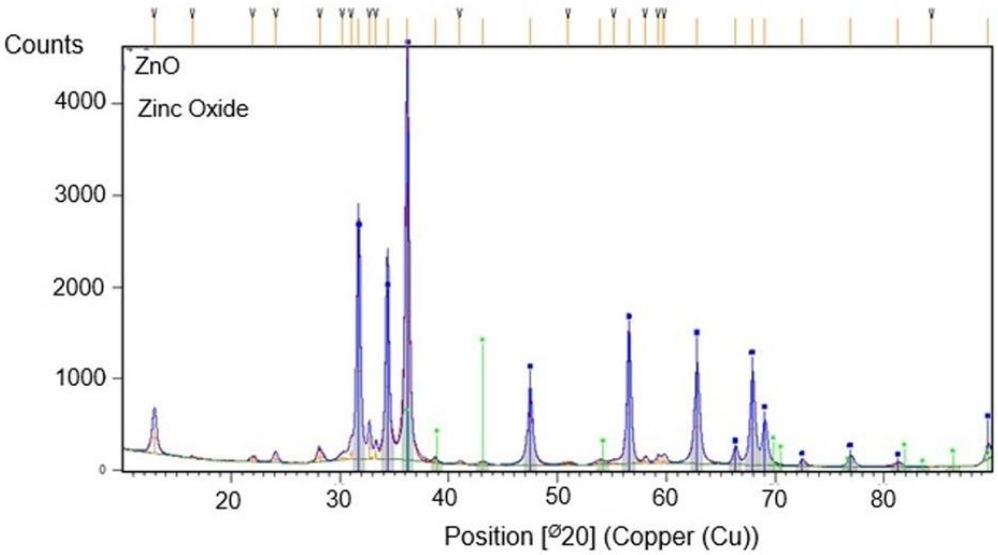


B

Şekil 3.5. NiO (A) ve ZnO (B) nanopartiküllerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsü.



Şekil 3.6. NiO nanopartikülünün XRD deseni.



Şekil 3.7. ZnO nanopartikülünün XRD deseni.

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada istatistiksel analizler, SPSS 20, Chicago, IL, USA paket programı ile yapılmıştır. Özellikle önce normal dağılım gösteren veriler incelendi ve bu verilerde One-way ANOVA testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis One-way ANOVA testi uygulandı. Kontrol ve NP verilen midyelerin verilerinde anlamlı bir istatiksel fark varsa ($P<0.05$), aralarındaki farklılığı belirtmek için post-hoc testi ve Duncan testi kullanıldı. Organik molekül analizinde standartların derişimi ve absorbansları arasındaki ilişki Regresyon Analizi ile gösterildi. Tüm verilerde aritmetik ortalama ve standart hatalar kullanılarak belirtildi. Microsoft Excel programı kullanılarak verilerin grafikleri şekil olarak gösterildi.

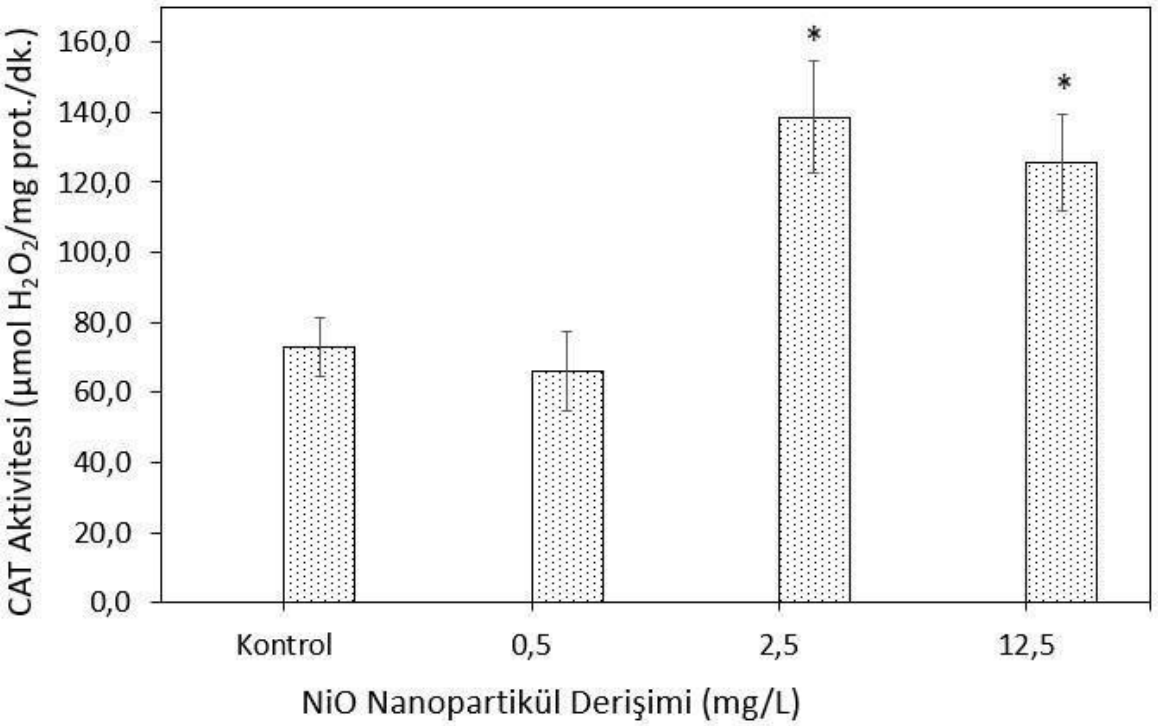
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

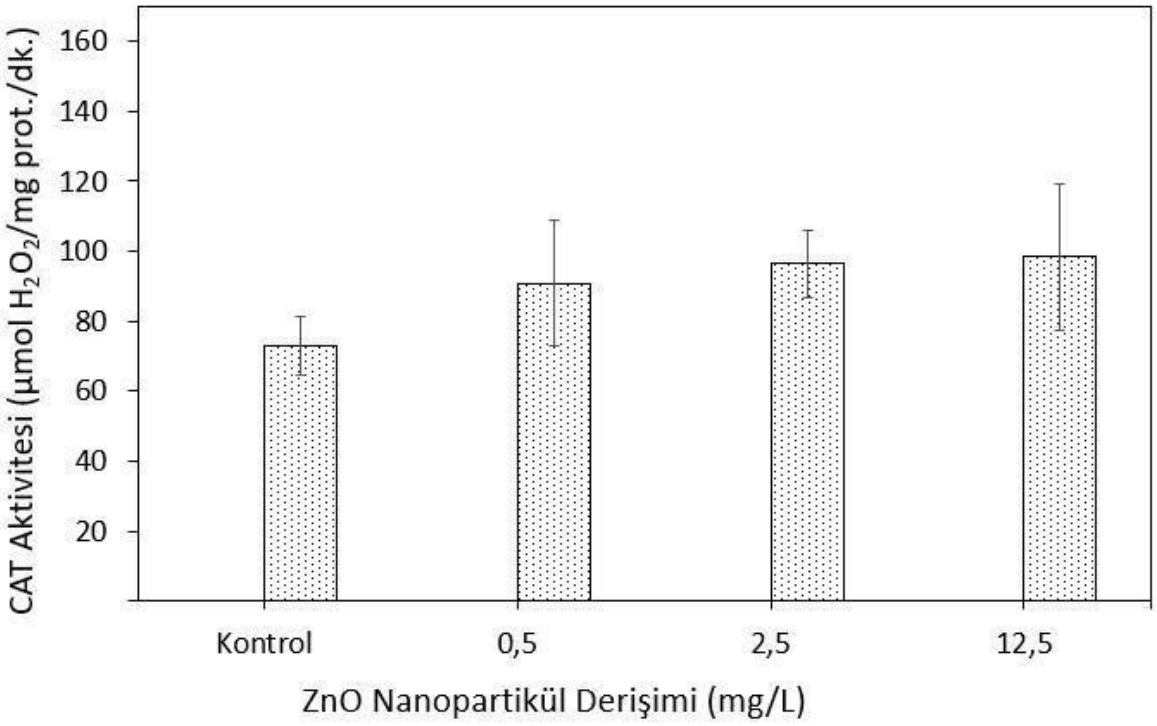
Bu çalışmada farklı derişimlerdeki NiO ve ZnO NP'lerin etkisinde 14 gün süreyle kalan tatlı su midyelerinin NP etkilerine verdiği tepkiler incelenmiştir. Hiçbir NP derişiminde ve kontrollerde midye ölümü gözlenmemiştir. Kontrol ve NP etkisinde kalan midyelerin boyut ve ağırlıklarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). NiO deneylerinde kullanılan midyelerin ortalama boyu (±se) 56.7±1.20 mm ve ortalama ağırlığı (±se) 28.8±1.60 g olarak ölçülmüştür. ZnO deneylerinde kullanılan midyelerin ortalama uzunluğu (±se) 6.01±1.51 mm ve ortalama ağırlığı 33.28±1.63 g olmuştur.

4.1.1. Katalaz (CAT) Aktivitesi

Kontrol midyelerin hepatopankreas dokusundaki ortalama (±se) katalaz aktivitesi 73.01±8.53 (µmol H_2O_2/mg protein) olarak ölçülmüştür. Farklı NiO NP derişimlerinin etkisinde 14 gün yaşayan midyelerin hepatopankreasında katalaz aktivitesinde anlamlı ($p<0.05$) artışlar olurken (Şekil 3.1), aynı derişimlerde ve sürede ZnO NP etkisinde kalan midyelerde katalaz aktivitesinde anlamlı ($p>0.05$) bir değişim olmamıştır (Şekil 3.2).



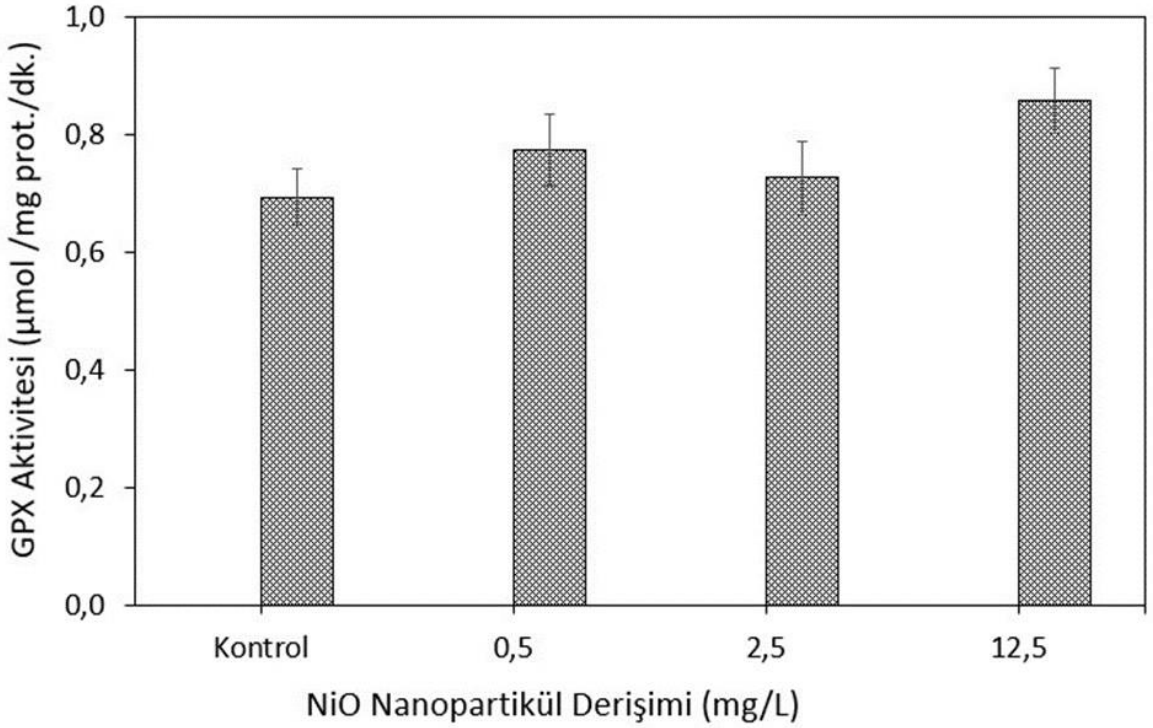
Şekil 4.1. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda CAT aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.



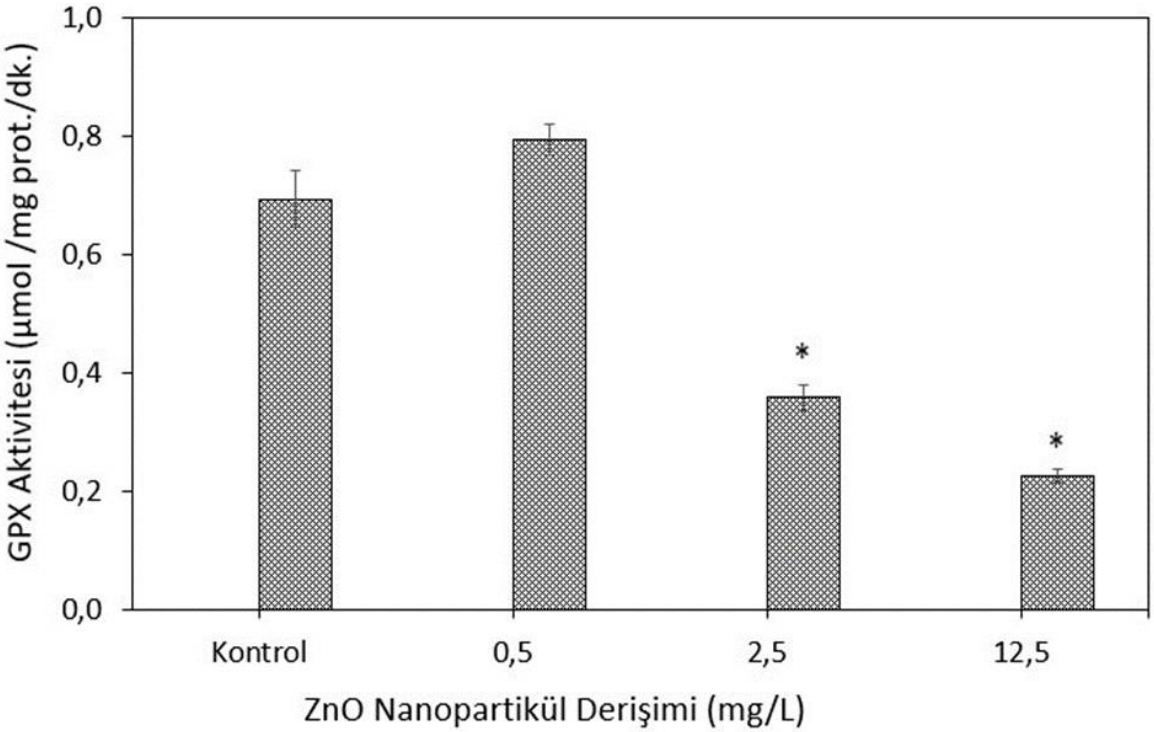
Şekil 4.2. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda CAT aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.

4.1.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesi

Kontrol midyelerin hepatopankreas dokusundaki ortalama (±se) GPX aktivitesi 0.69±0.049 (µmol/mg prot./dk.) olarak ölçülmüştür. GPX aktivitesinin verdiği tepki katalazın verdiği tepkinin tersi yönde olmuştur. Farklı NiO NP derişimlerinin etkisinde 14 gün yaşayan midyelerin hepatopankreasında GPX aktivitesinde anlamlı ($p>0.05$) değişim olmazken (Şekil 3.3), aynı derişimlerde ve sürede ZnO NP etkisinde kalan midyelerde GPX aktivitesinde anlamlı ($p<0.05$) azalmalar görülmüştür (Şekil 3.4).



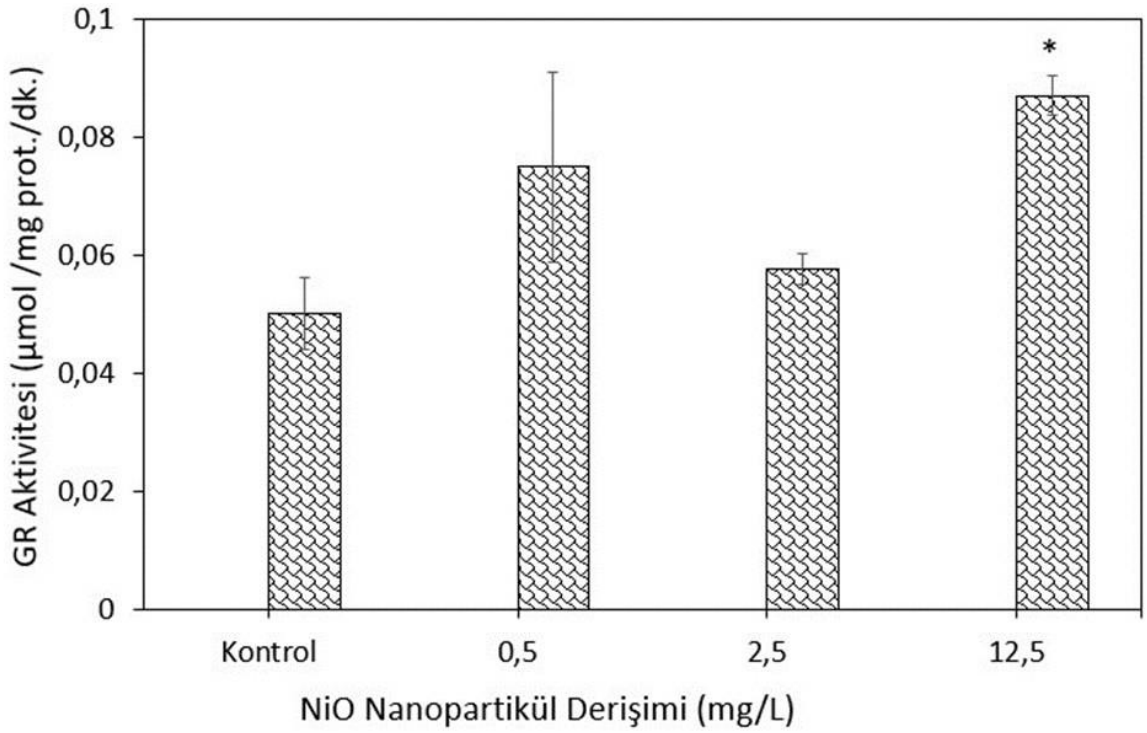
Şekil 4.3. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GPX aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir.



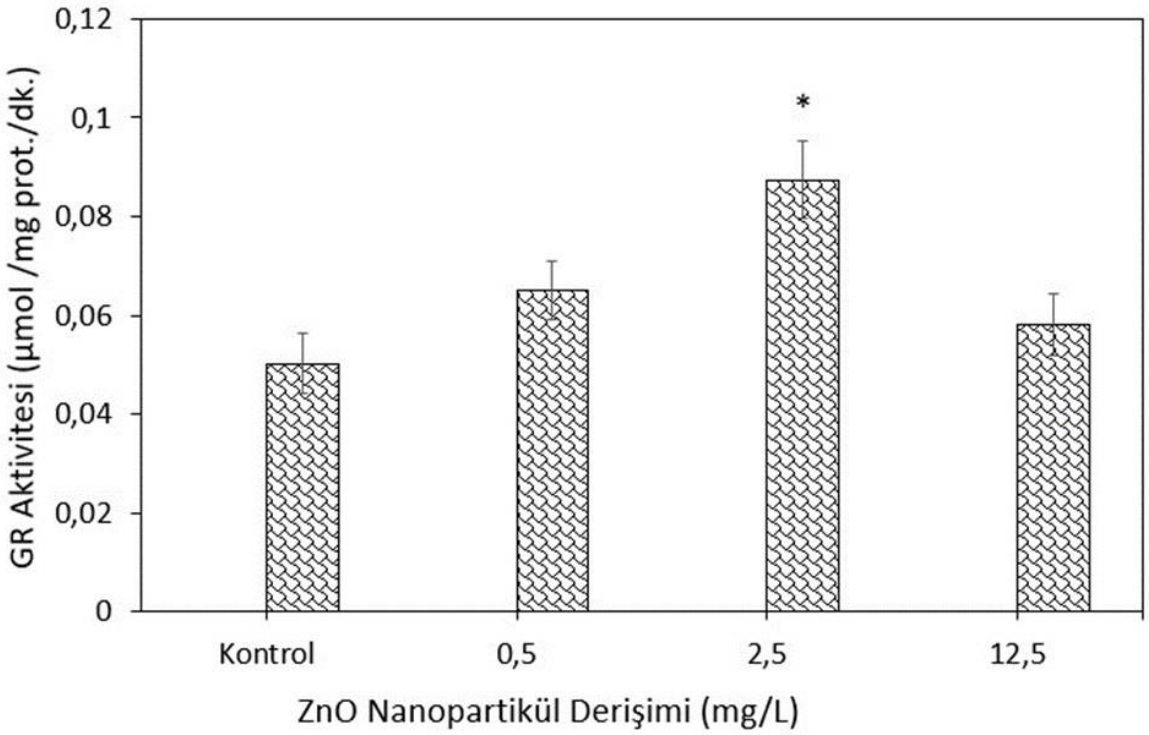
Şekil 4.4. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GPX aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.

4.1.3. Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Kontrol midyelerin hepatopankreas dokusundaki ortalama (±se) GR aktivitesi 0.051±0.006 (µmol/mg prot./dk.) olarak ölçülmüştür. GR aktivitesinin verdiği tepkiler GST aktivitesindeki tepkilerle benzerlik göstermiştir. Farklı NiO NP derişimlerinin etkisinde 14 gün yaşayan midyelerin hepatopankreasında GR aktivitesinde anlamlı ($p<0.05$) artışlar olurken (Şekil 3.5), aynı derişimlerde ve sürede ZnO NP etkisinde kalan midyelerde de GR aktivitesinde anlamlı ($p<0.05$) artışlar görülmüştür (Şekil 3.6).



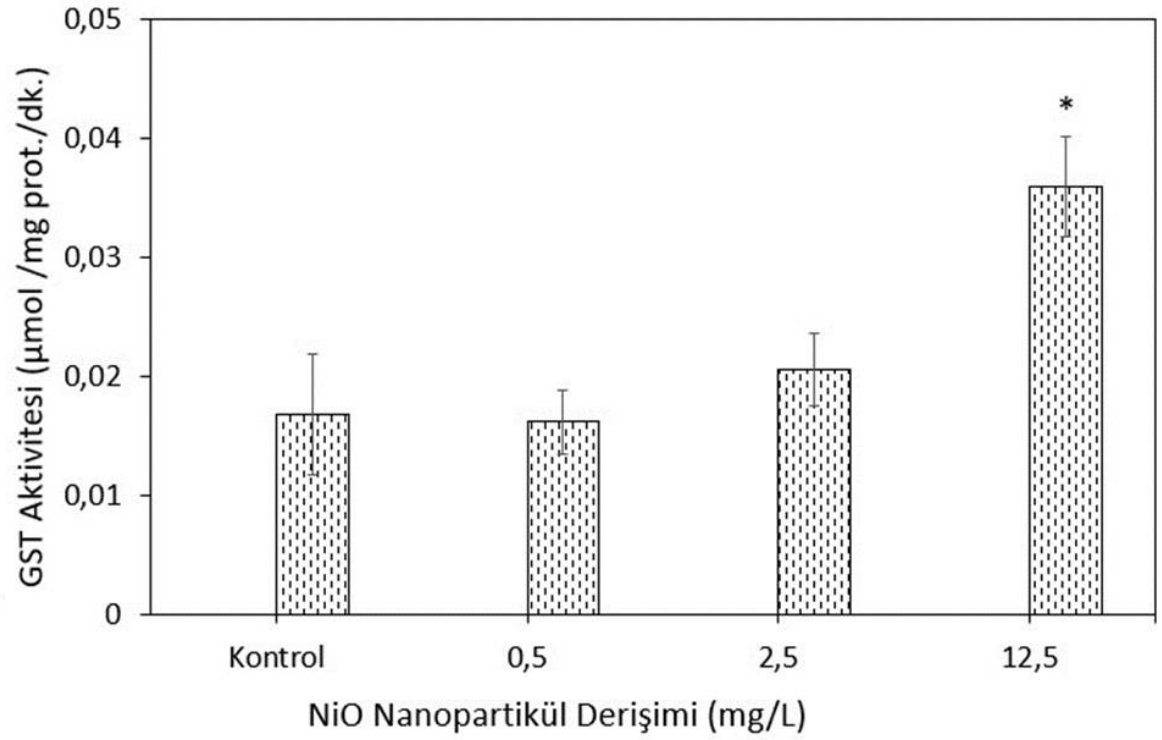
Şekil 4.5. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GR aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.



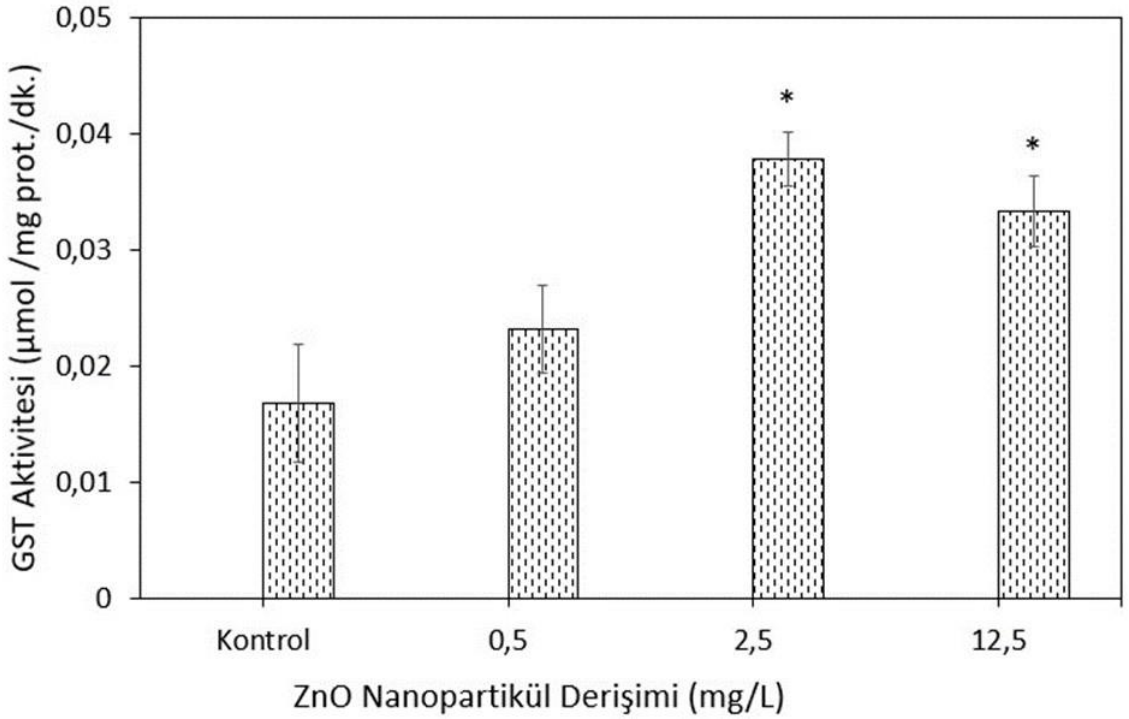
Şekil 4.6. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GR aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.

4.1.4. Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivitesi

Kontrol midyelerin hepatopankreas dokusundaki ortalama (±se) GST aktivitesi 0.017±0.051 (µmol/mg prot./dk.) olarak ölçülmüştür. GST aktivitesinin verdiği tepkiler hem katalazın hem de GPx' den farklı olmuştur. Farklı NiO NP derişimlerinin etkisinde 14 gün yaşayan midyelerin hepatopankreasında GST aktivitesinde hem NiO NP etkisi ile hem de ZnO NP etkisi ile anlamlı ($p<0.05$) artışlar olmuştur (Şekil 3.7 ve 3.8).



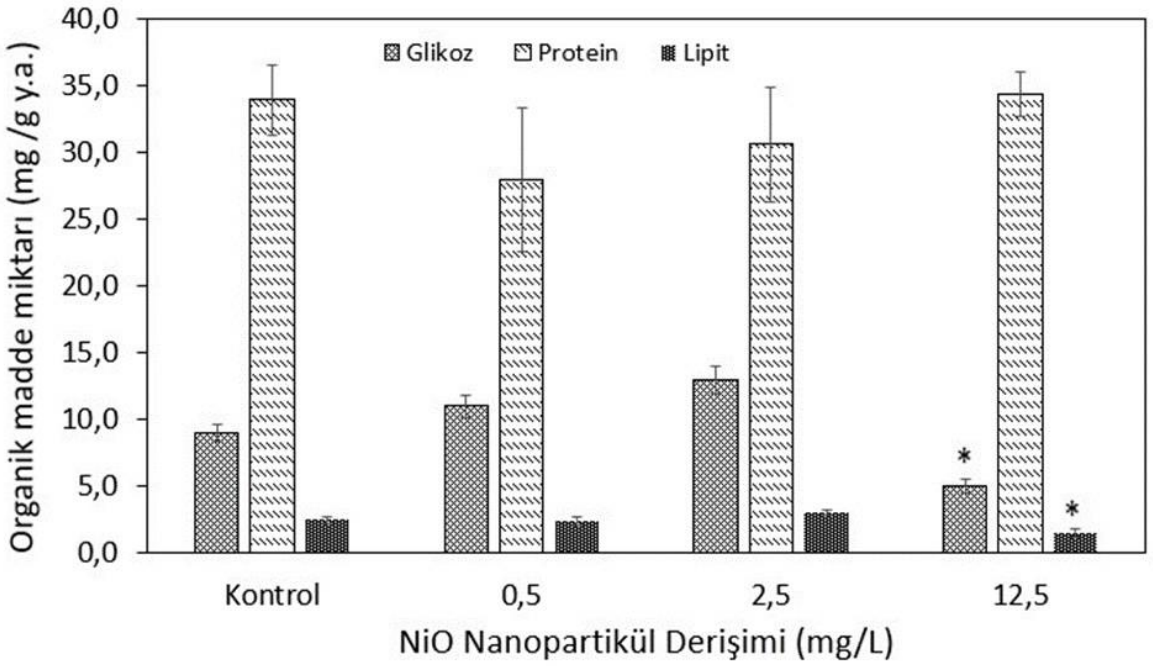
Şekil 4.7. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir.



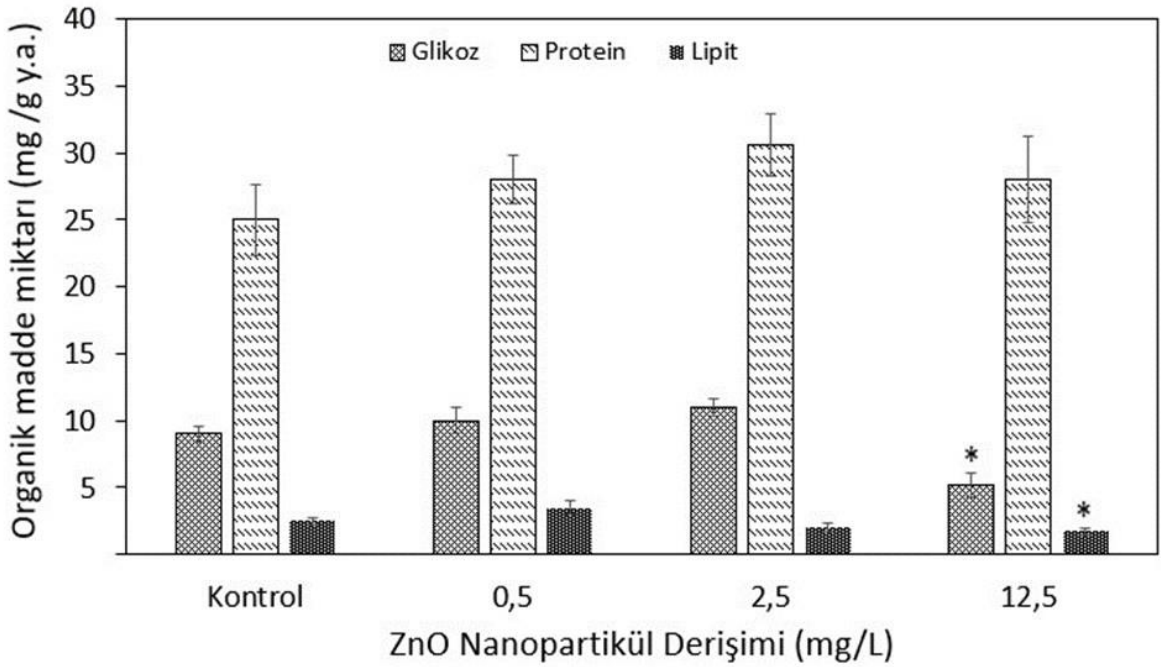
Şekil 4.8. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda GST aktivitesi.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.

4.1.5. Organik Madde Ölçümleri

Kontrol midyelerin hepatopankreas ve kas dokularında ortalama (±se) protein, glikoz ve lipit düzeyleri (mg/g y.a) ölçülmüştür. Buna göre hepatopankreas ve kas dokularında ortalama protein düzeyleri sırasıyla 25.01±2.61 ve 2.99±0.48, glikoz düzeyleri sırasıyla 9.00±0.62 ve 2.50±0.39, lipit düzeyleri sırasıyla 2.49±0.25 ve 1.58±0.15 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.9 ve 3.10). Buna göre toplam protein düzeylerinde hem NiO NP etkisinde hem de ZnO NP etkisinde anlamlı bir değişim olmazken ($p>0.05$), glikoz ve lipit düzeyleri en yüksek derişimde anlamlı ($p<0.05$) azalmalar göstermiştir (Şekil 3.9 ve 3.10).



Şekil 4.9. On dört gün süresince NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda glikoz, protein ve lipit düzeyleri.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.



Şekil 4.10. On dört gün süresince ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda glikoz, protein ve lipit düzeyleri.
Veriler ortalama (N=6) ve standart hataları göstermektedir. Yıldız kontrol ve NP etkisinde kalan midyeler arasındaki anlamlı ($p<0,05$) farkları göstermektedir.

4.2. Tartışma

On dört gün süresince ZnO ve NiO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerde herhangi mortalite durumu ortaya çıkmamıştır. Midyelerin canlılığı çıplak gözle net görülemediğinden, kapaklarının sıkıca kapalı olması ve disseksiyon sırasında dokularının durumuna bakılarak anlaşılmaktadır. Buna göre kontrol ve NP etkisinde kalan bütün midyelerin canlı oldukları net olarak görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan NP derişimleri sonucu herhangi bir mortalite gözükmemesi NP derişimlerinin subletal düzeylerde olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, midyelerin alg süzme oranlarında kontrol grupları ile NiO NP ve ZnO NP etkisinde kalan midyeler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Alg sayımı yapılan kontrol ve NP etkisinde kalan gruplardaki farkın yaklaşık %10-15 olması, NP'lerin midyelerin beslenme davranışı üzerine etki edecek kadar toksik etki göstermediği şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar farklı nanopartiküllere maruz kalındığında midyelerin alg süzme oranlarında anlamlı azalmalar olduğunu göstermiştir (Ray ve ark., 2020; Auclair ve ark., 2020). Örneğin, Ray ve arkadaşları (2020), 14 gün boyunca Cu-NP'lere maruz bırakılan tatlı su midyelerinin (*Lamellidens marginalis*) alg süzme davranışında anlamlı bir düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, diğer ksenobiyotik etkisinde kalan midyelerin besin tüketiminde azalmalar olduğu belirtilmiştir (Anandraj ve ark., 2002; Culbertson ve ark., 2008; Liu ve ark., 2014). Ancak bu çalışmalarda kullanılan deney protokolleri ve hayvan türlerinin farklı olması bu farkın görülmesine yol açmış olabilir. NiO NP ve ZnO NP'nin *U. delicatus* türü midyeler üzerine olan etkilerinin incelendiği bu deney koşulları hem NP derişimi açısından hem de

süre açısından arttırıldığında *U. delicatus* türü midyelerin beslenmesinde de olumsuz etkilerinin olması mümkün gözükmektedir. Aslında laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda da beslenme davranışı bakımından benzer sonuçlar görülmüştür. Al_2O_3, CuO ve TiO_2 NP'leri etkisinde (0, 1, 3, 9 mg/L) 14 gün kalan *Unio tigridis* türü tatlısu midyelerinde herhangi bir mortalite gözükmediği gibi alg süzme davranışlarında da kontrol grubu ile anlamlı fark görülmemiştir (Canli ve Canli, 2021).

4.2.1. İyonik ve Nanopartikül Metal Formlarının Antioksidan Sistem Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada NP etkisinde kalan midyelerde herhangi bir mortalitenin olmaması veya beslenme alışkanlığında anlamlı bir değişimin olmaması NP'lerin toksik etkilerinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Metal nanopartiküllerinin midyelerin antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkileri, son yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu konuda yapılan çalışmaların büyük bir bölümü deniz midyeleri, özellikle *Mytilus* türleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Gomes ve ark. (2011), *Mytilus galloprovincialis*'i 15 gün boyunca CuO NP etkisine maruz bırakarak oksidatif stresle ilişkili biyobelirteçlerdeki değişimleri değerlendirmişlerdir. Araştırmanın sonuçları midyelerin hem iyonik hem de nanopartikül formlarındaki bakırı solungaçlarında biriktirdiğini ve her iki formun da antioksidan savunma sistemini etkileyerek oksidatif stres oluşturduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Ruiz ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, CuO NP etkisine bırakılan *M. galloprovincialis*'in hepatopankreasında antioksidan enzim aktivitelerinde farklı düzeyde değişiklikler gözlenmiş ve genel olarak antioksidan aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Buna ek olarak, laboratuvarımızda yürütülen bir çalışmada (Canli ve Canli, 2021) Al_2O_3, CuO, TiO_2 NP'lerin etkisinde kalan tatlı su midyelerinde (*Unio tigridis*) CAT ve SOD aktivitelerini azalttığı, ancak glutatyon metabolizmasında görevli GPx ve GST enzim aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir.

Diğer taraftan iyonik metallerin de midyeler üzerine olan etkileri de farklı araştırmalarda gösterilmiştir. Örneğin Jorge ve ark. (2013) tatlı su midyesi *Lampsilis siliquoidea* üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, oldukça düşük bakır derişimlerinin (2 ve 12 µg/L) bile lipit peroksidasyonunu artırmıştır. Lipit peroksidasyonu en fazla hücre zarını etkilendiğinden organizmanın antioksidan savunma sistemi de daha yüksek metal derişimlerinde anlamlı tepkiler verebileceğini vurgulamışlardır. Zhou ve ark. (2021) tarafından yürütülen bir diğer araştırmada, derin deniz midyesi *Bathymodiolus platifrons* 7 gün boyunca 100 ve 500 µg/L derişimlerindeki bakır ve kadmiyuma maruz bırakılmış ve bu metallerin çeşitli biyobelirteçler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar her iki metalin de midye dokularında biriktiğini, ancak etkilerinin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Örneğin, SOD aktivitesi her iki metal tarafından anlamlı şekilde etkilenmezken, CAT aktivitesi bakır maruziyetiyle artmış, GSH düzeyleri ise kadmiyum etkisiyle yükselmiştir. Company ve ark. (2008) ise deniz midyesi *Bathymodiolus azoricus*'u 25 µg/L bakır derişimine 24 gün süreyle maruz bıraktıktan sonra 6 günlük eliminasyon sürecine tabi tutmuş ve solungaç ile manto dokularında belirli biyobelirteçlerdeki değişimleri incelemiştir. Bulgular 24

günlük birikim süresinde dokularda biriken bakırın eliminasyon döneminde azalmadığını, ayrıca CAT, GPx ve SOD aktivitelerinde zamana bağlı bir artış eğiliminin ortaya çıktığını göstermiştir. Metal maruziyetine ek olarak, suyun çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerinin de antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde etkili olabileceği ifade edilmiştir (Mlouka ve ark., 2019). Araştırıcılar bu çalışmada Akdeniz midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) ve mavi midyeleri (*Mytilus edulis*) farklı sıcaklık değerlerinde bakır etkisine maruz bıraktıktan sonra sıcaklığın artmasıyla birlikte bakırın etkisinin de arttığı ve sonuçta CAT, SOD ve GST aktivitelerinde anlamlı artışlar olduğunu belirtmişlerdir. Benzer biçimde, Xu ve ark. (2018) düşük bakır derişimlerinin (8 µg/L) bile *Mytilus coruscus*'un hemositlerinde CAT ve SOD aktivitelerini artırdığını rapor etmişlerdir. Kadmiyumun da midyelerin antioksidan savunma sistemi üzerinde etkili olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Sukhovskaya ve ark. (2019) kuğu midyesi (*Anodonta cygnea*) ile yaptıkları bir çalışmada, 10–100 µg/L aralığındaki kadmiyumun midye dokularında Cd birikimine yol açtığı, mortaliteye neden olmamakla birlikte oksidatif strese neden olduğu belirlenmişlerdir. Araştırmacılar, CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde ve GSH düzeylerinde görülen değişimlerin kadmiyumun kısa sürede (72 saat) bile antioksidan sistemi etkileyebildiğini vurgulamışlardır. Ayrıca, Goswami ve ark. (2014) deniz yeşil midyesini (*Perna viridis*) 21 süre ile bakır (60 µg/L) ve kadmiyumun (150 µg/L) tek tek ve birlikte etkilerine bıraktıktan sonra antioksidan sistemin tepkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın bulguları her iki metalin de SOD, GPx ve GST aktivitelerinde belirgin artışlara neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar farklı midye türlerinde farklı koşullarda yürütülen deneylerde metal iyonlarının oksidatif stres oluşturarak antioksidan sistemi uyardığını ortaya koymaktadır.

4.2.2. NiO ve ZnO nanopartiküllerinin etkileri

Bu çalışmada NiO ve ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda antioksidan sisteme ait enzim aktivitelerinde anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. ZnO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreasında GST ve GR aktivitelerinde artışlar olurken, GPX aktivitesinde ise azalma olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, CAT aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. NiO NP etkisinde kalan midyelerin hepatopankreas dokularında da antioksidan sistem enzimleri tepkileri anlamlı olmuştur. Örneğin CAT, GST ve GR aktivitelerinde anlamlı artışlar gözlenirken, GPX aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Fahmy ve Sayed (2017), tatlı su midyesi (*Coelatura aegyptiaca*) üzerinde yaptıkları çalışmada, yüksek konsantrasyonlardaki ZnO nanopartiküllerinin hemolenf, hepatopankreas ve solungaçlarındaki antioksidan sistem enzim aktivitelerinde dalgalanmalara neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Önceki çalışmalar da tatlı su midyesi (*Unio tigridis*)'nin Al_2O_3, CuO ve TiO_2 nanopartiküllerine maruz kalmasının oksidatif strese yol açarak antioksidan enzimlerin aktivitesini değiştirdiğini göstermiştir (Canli ve Canli, 2021). Benzer şekilde, Gnatyshyna ve ark. (2019) tatlı su midyesi (*Unio tumidus*)'nin hepatopankreasında TiO_2 nanopartikülü maruziyeti sonrasında rGSH seviyelerinde artış olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde, CuO NP etkisinde kalan tatlı su midyesinde (*Lamellidens*

marginalis) CAT ve SOD aktivitelerinde anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir (Ray ve ark., 2020). Bakır metabolik olarak gerekli bir metal olmasına rağmen, NP formundaki bakırın midyeler için oldukça toksik olduğu görünmektedir. Benzer şekilde, Ali ve Ali (2015) tatlı su salyangozu (*Lymnea luteola*) dokularında CuO NP maruziyeti sonrasında SOD, CAT, GPx ve GST aktivitelerinde azalma olduğunu bildirerek, NP'lerin metabolik olarak gerekli olup olmadıklarına bakılmaksızın toksik etkiler gösterebileceğini vurgulamışlardır. Gnatyshyna ve ark. (2019) tatlı su midyeleri (*Unio tumidus*) ile yaptıkları bir çalışmada TiO_2 NP'lerin hayvanların hepatopankreas dokusunda indirge glutatyon (rGSH) seviyelerinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmalar yumuşakçaların antioksidan sistemlerinin NP etkisine anlamlı tepkiler verdiğini gösterirken bu etkilenmede hayvan türü, doku çeşidi, NP boyutu ve NP'lerdeki metalin belirleyici olduğunu vurgulamaktadır.

Nanoteknolojinin çeşitli alanlarında metal oksit NP'lerin kullanımının artması, NP'lerin sucul sistemlerde dominant kirleticiler haline gelmesine ve dolayısıyla hayvanlarda daha fazla oksidatif strese yol açmasına neden olacağı açıktır. Mevcut literatür verileri tatlı su midyelerinin antioksidan enzimlerinin NP etkisine karşı hassas olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, özellikle hedef organizmalar olabilecek biyoindikatör sucul türlerde, NP'lerin etkilerinin kapsamlı biçimde araştırılması gerekmektedir (Gomes ve ark., 2011). Ancak midyelerin antioksidan sistem yanıtlarına ilişkin çalışmaların çoğu deniz midyeleri (özellikle *Mytilus* türleri) üzerinde yürütülmüştür. Gomes ve ark. (2011), *Mytilus galloprovincialis* türü midyeleri 15 gün boyunca CuO NP'lere maruz bırakmış ve oksidatif stres biyobelirteçlerini değerlendirmiştir. Araştırmacılar midyelerin hem iyonik hem de NP formundaki bakırı solungaçlarında biriktirdiğini ve bunun farklı etki mekanizmalarına işaret ettiğini bildirmiştir. Ayrıca, CuO NP'lerin solungaçlarda oksidatif stresi artırarak antioksidan savunma sistemini baskıladığı, buna karşın iyonik bakırın enzimatik aktivitelerde değişikliğe neden olmadığı veya aktiviteleri artırdığını saptanmışlardır. Benzer şekilde, Ruiz ve ark. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, aynı türün hepatopankreasında CuO NP maruziyeti sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinde farklı etkiler gözlenmiş olup, CAT ve SOD aktivitelerinde anlamlı artışlar olduğu, buna karşın solungaçlarda etkinin sınırlı kaldığı bildirilmiştir. Gomes ve ark. (2014), *M. galloprovincialis*'in solungaç ve hepatopankreasında AgO NP'lerin etkilerini incelemiş ve SOD, CAT ve GPX aktivitelerinin arttığını ve ayrıca dokuya bağlı antioksidan yanıtı olduğunu vurgulamışlardır. Gürkan ve Gürkan (2021) Al_2O_3 NP'lerin etkilerini *Mytilus galloprovincialis* türü midyelerde incelemişlerdir. Araştırıcılar solungaç ve hepatopankreas dokularında CAT aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte SOD ve GPx aktivitelerinde anlamlı değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir. Deniz midyelerinin hepatopankreas ve solungaçlarında gözlenen farklı antioksidan sistem yanıtları tatlı su midyelerinde de ortaya konmuştur. Gnatyshyna ve ark. (2019) tatlı su midyesi *Unio tumidus*'u TiO_2 NP etkisine maruz bıraktıktan sonra hepatopankreas dokusunda indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyinin iki katına çıktığını saptamışlardır. Benzer biçimde, Ray ve ark. (2020) tatlı su midyesi *Lamellidens marginalis*'i CuO NP (5 ppm e kadar) etkisine bıraktıktan sonra CAT ile SOD aktivitelerinde azalmalar olduğunu saptamışlardır. Ali ve Ali (2015) ise bir tür tatlı su

salyangozu olan *Lymnaea luteola* da CuO NP'lerin SOD, CAT, GPx ve GST aktivitelerini azalttığını gösterirken NP'lerin toksik etkilerine dikkat çekmişlerdir. Literatürdeki bu veriler, metal oksit NP'lerin zararsız bileşikler olmadığını türler arasında farklı düzeylerde toksisiteye yol açabildiklerini göstermektedir. Bulgular arasındaki farklılıkların, NP'lerin kimyasal ve fiziksel özellikleri ile maruziyet derişimi, süresi ve organizma fizyolojisindeki değişkenliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Oksidatif stresin reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olması bakımından tüm aerobik organizmalar için bir tehdit oluşturduğu iyi bilinmektedir. Normal şartlarda fizyolojik olarak sistem dengededir (oksidan/antioksidan) ve oluşan serbest radikaller aerobik hayvanların antioksidan savunma sistemleri tarafından nötralize edilebilmektedir. Ancak hayvanlar, antropojenik kirlilik nedeniyle ek olarak daha fazla miktarda oksidanlara maruz kalmaktadır. Bu nedenle çevre bilimciler, hayvanlarda oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla sıklıkla antioksidan sistemleri tepkilerinin belirlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bu bağlamda, tatlı su midyeleri sucul kirliliğin etkilerini değerlendirmek için etkili biyoindikatör organizmalar olarak geniş çapta kabul görmektedir. Böylece, midyeler sucul sistemlerin oksidatif stres kapasitelerini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmış olup hem laboratuvar deneylerinde hem de saha çalışmalarında değerli veriler sunmuştur (Labieniec ve Gabryelak, 2003; Al-Fanharawi ve ark., 2019; Falfushynska ve ark., 2018; Canli ve Canli, 2021; Canli ve ark., 2023).

Sonuç olarak, mevcut çalışma ve literatür verileri, metal oksit NP'lerin hem deniz hem de tatlı su midyelerinde antioksidan sistem biyobelirteçlerini etkilediğini, özellikle CAT ve SOD enzimlerinin en belirgin değişiklikleri gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bilindiği üzere, CAT ve SOD antioksidan sistemin ilk savunma hattını oluşturmakta olup bu enzimlerdeki değişiklikler tüm sistemi etkileyerek oksidatif stresin gelişmesine yol açabilmektedir. Glutatyon metabolizmasına ait biyobelirteçlerde de gözlenen değişiklikler, antioksidan sistemin tetiklendiğini göstermektedir. Sonuç olarak, metal oksit NP'lerin nanoteknolojik ürünlerde yaygın olarak kullanıldığı ve geleceğin potansiyel çevresel kirleticileri arasında yer alabileceği dikkate alınarak, bu maddelere yönelik çalışmaların artırılması gerekmektedir.

4.2.3. İyonik ve nanopartikül metal formlarının enerji metabolizmasındaki etkileri

Hayvanlar metabolik faaliyetler, hareket, üreme ve diğer biyolojik aktiviteler için gerekli olan enerjiyi ATP'den elde etmektedirler. ATP hayvanlardaki temel organik enerji molekülü olup organik moleküllerin yıkılması ile elde edilmektedir. Hayvanlar ATP elde etmek için öncelikle karbonhidratları (glikoz) ve daha sonra yağları yakmaktadır. ATP başlıca mitokondrilerde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon yoluyla sentezlenir. Bu süreçte, öncelikle glikoz ve yağ asitlerinin yıkımıyla açığa çıkan enerji, ADP'ye bir fosfat grubunun bağlanmasında kullanılarak ATP

sentezlenir. Glikoz ve lipit stokları gerekli enerjiyi üretecek kadar olmadığı durumlarda, ATP elde etmek için proteinler kullanılır ki bu istenmeyen bir durumdur ve organizma artık yapısal olarak da küçülmeye başlar ve daha ileri aşamalarda ölüm kaçınılmaz olur. Dolayısıyla, öncelikle glikoz ve lipit düzeylerinin incelenmesi ile organizmanın yaşadığı stres hakkında bilgi edinilebilir. Bu enerji rezervlerindeki azalma, hücresel işlevlerin bozulmasına, büyümenin yavaşlamasına, üreme kapasitesinin azalmasına ve nihayetinde organizmanın hayatta kalma olasılığının tehlikeye girmesine yol açabilir. Dolayısıyla, enerji stoklarında meydana gelen bir azalma ekotoksikoloji bakımından bir "erken uyarı" sistemi gibi kullanılabilir.

Bu çalışmada NiO ve ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerin hepatopankreas dokusundaki glikoz ve lipit düzeyleri en yüksek derişimde anlamlı olarak azalmasına rağmen protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu durum, midyelerin NP etkisi altında strese girdiklerini ve metabolik olarak stresi yenmeye çalışırken enerji tüketimlerinin arttığını göstermektedir. Hayvanların enerji (ATP) tüketimindeki artışı telafi etmek için ise glikoz ve yağı yıkımını arttırdığı anlaşılmaktadır. Hepatopankreas dokularında glikoz ve lipit düzeyindeki azalmalar sonucu toplam enerji rezervlerinin de NP maruziyeti sonrası anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. Ancak proteinler bu hesaplamaya dahil edildiğinde toplam enerji rezervlerinin anlamlı bir şekilde azalmadığı görülmüştür (Gozeoglu ve ark. 2025). Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada da Al_2O_3, CuO ve TiO_2 NP'lerin etkisine 14 gün süre ile bırakılan tatlısu midyelerinin (*Unio tigridis*) hepatopankreas ve kas dokularındaki toplam enerji rezervlerinin en yüksek derişimde (9 ppm) anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Canli ve ark. 2023). Wu ve ark. (2020) deniz midyeleri (*Mytilus edulis*) üzerinde yaptıkları çalışmada, midyeleri 21 gün boyunca iki farklı sıcaklıkta 100 mg/L'ye kadar ZnO nanopartiküllerine maruz bırakmışlar ve yumuşak dokulardaki enerji dağılımını incelemişlerdir. Araştırıcılar protein ve lipit düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlemlemezken, karbonhidrat düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu tespit etmiş olup, mevcut çalışmanın verileri ile uyumludur. Ayrıca, araştırıcılar NP maruziyeti sonrasında elektron taşıma sistemi aktivitesinde bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Falfushynska ve ark. (2018) tatlı su midyelerinde (*Unio tumidus*) ZnO NP maruziyeti sonrası glikoz düzeylerinde azalma olduğunu belirtirken midyelerin enerji gereksiniminin arttığını da vurgulamışlardır. Bu bulgular hem nanopartikül hem de iyonik metal maruziyetlerinin organik molekül düzeylerini değiştirerek yumuşakçalarda enerji seviyelerini düşürebileceği görüşüyle uyumludur. Örneğin, Fokina ve ark. (2019) Cd ve Cu maruziyeti sonrasında deniz midyelerinin (*Mytilus edulis*) solungaç ve hepatopankreaslarında kolesterol ve lipit düzeylerinde anlamlı değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Nugroho ve Frank (2012) tatlı su midyelerinde (*Anodonta anatina*) hem besin yoluyla hem de suda çözünmüş halde Cu maruziyeti sonrası lipit düzeylerinde azalma gözlemlemişlerdir. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada (Canli ve Canli, 2025) Cd maruziyetinin tatlısu midyelerinin (*Unio tigridis*) kas ve hepatopankreasındaki toplam enerji rezervlerinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar hem iyonik hem de

nanopartikül formundaki metallerin midyelerde enerji rezervlerinde azalmaya neden olabileceğini ve enerjiye bağlı metabolik süreçleri bozabileceğini ortaya koymaktadır.

İyonik veya NP formundaki metallerin etkisinde kalmak sucul hayvanlar için enerji bakımından maliyetli olabilmektedir. Hayvan metabolizması metal içeren maddelere maruz kalma sonucu oluşan stres ile başa çıkmak, etkilenme sürecinde kaybedilen moleküllerin yerine yenisini yapmak veya zar gibi yapılarının onarımını yapmak için büyük miktarda enerji harcamaktadır (Bossuyt ve ark., 2004; Canli, 2005). Literatürde yumuşakçaların farklı dokularında enerji stoklarının iyonik veya nanopartikül formundaki metallere maruziyet sonrası azaldığı gösterilmiştir (Fokina ve ark., 2019; Wu ve ark., 2022; Canli ve ark., 2023; Canli ve Canli, 2025). Bu bağlamda, sucul hayvanların enerji rezervleri hayvanların yaşadıkları metabolik stresi vurgulamak veya değerlendirmek için güvenilir biyobelirteç olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Bossuyt ve Janssen, 2004; Canli, 2005; Muyssen ve ark., 2010). Bu çalışmamın sonucuna göre midyeler NiO ve ZnO NP'lerin etkisi ile özellikle en yüksek derişimde ciddi bir strese maruz kaldığı ve oluşan bu metabolik stresi ile başa çıkmak için enerji tüketimini arttırdığı anlaşılmaktadır. Diğer taraftan organik madde düzeyinin ekotoksikolojik çalışmalarda antioksidan sistem tepkisi veya başka sistemlere özgün biyobelirteç moleküllerin tepkileri ile birlikte değerlendirilmesinin daha anlamlı olacağı da bu çalışma ile vurgulanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Sonuç olarak, NiO ve ZnO nanopartiküllerinin farklı derişimlerinin etkisine 14 gün süreli ile bırakıldıktan sonra midyelerin davranışında belirgin bir fark olmamakla birlikte, hiçbir midye ölümü de görülmemiştir. Benzer şekilde, beslenme alışkanlıklarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Yani kontrol midyelerle NP etkisinde kalan midyelerin alg tüketiminde anlamlı fark görülmemiştir. Buna rağmen, midye antioksidan sistemi üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı tepkiler vermiştir. Bu durum, midyelerde ölüm olmasa da metabolik olarak stres altında olduklarını göstermektedir. Diğer yandan, midyelerin hepatopankreas ve kas dokusunda protein düzeyinde anlamlı değişimler olmasa da lipit ve karbonhidrat düzeylerinde anlamlı azalmalar olmuştur. Bu durum, antioksidan sistemdeki değişimlerle paraleldir ve hayvanların stres altında olduklarını ve strese tepki olarak enerji tüketimlerinde artmalar olduğunu kanıtlamaktadır. Daha detaylı bilgi vermek gerekirse sonuçlar şunu göstermektedir. Her iki NP'in midyelerin antioksidan sistem parametreleri üzerinde oldukça etkili olduklarını göstermiştir. NiO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerin hepatopankreas dokusunda antioksidan sistem enzimlerinin aktivitelerinde meydana gelen anlamlı değişimlerle midyelerin ilk enerji kaynakları olan glikoz ve lipit düzeylerini yaklaşık %50 oranında azalması NiO NP toksisitesi konusunda uyarıcı kabul edilmiştir. ZnO nanopartiküllerine maruz kalan midyelerin antioksidan sistemlerimim aktivitelerinde de anlamlı biçimde değişimlerin olması ve buna paralel olarak ilk enerji kaynakları olan glikoz ve lipit düzeylerinde meydana gelen azalmalar da ZnO NP toksisitesine dikkat çekme bakımından önemli görülmüştür.

5.2. Öneriler

1. Bu çalışma NP etkisinde kalan midyelerin antioksidan sistemlerinin tepkileri ve organik madde miktarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bilindiği gibi sudan metal veya metal oksit nanopartiküllerinin alınmasını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar arasında sıcaklık, sertlik, tuzluluk, pH, organik madde miktarı v.b. sayılabilir. Dolayısıyla, doğal ortama daha uygun deney senaryoları yapmak için NP etkisi suyun farklı fiziksel ve kimyasal koşulları altında test edilebilir.
2. Diğer yandan, Mollusca'ya ait başka türlerle de bu tür çalışmalar yapılarak karşılaştırmalar yapılabilir. Bununla beraber besin ile NP alımı da çok önemli olup, araştırılması gereken konular arasında gözükmektedir.
3. Midyelerin ozmoregülasyon enzimleri olan ATPaz grubu enzimler de önemli araştırma konularındandır. Diğer yandan, NP'lerin genetik materyal üzerine olan etkileri de özellikle uzun süreli deneylerle test edilebilir ve mutasyon yapabilme özelikleri incelenebilir.

KAYNAKLAR

Ahamed M., Alsalhi, M. S., ve Siddiqui, M. K., 2010. Silver nanoparticle applications and human health. Clin. Chim. Acta, 411, 1841–1848.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ve Walter, P., 2022. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 1616s.

Al-Fanharawi, A.A., Rabee, A.M., ve Al-Mamoori, A.M., 2019. Multi-biomarker responses after exposure to organophosphates chlorpyrifos in the freshwater mussels *Unio tigridis* and snails *Viviparous benglensis*. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 25(5), 1137-1156.

Ali, D., ve Ali, H., 2015. Susceptibility of the freshwater pulmonate snail *Lymnea luteolaL*. to copper oxide nanoparticle. Toxicological and Environmental chemistry 97(5), 576-587.

Anandraj, A., Marshall, D. J., Gregory, M. A., ve McClurg, T. P., 2002. Metal accumulation, filtration and O_2 uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+}. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 132(3), 355-363.

AshaRani P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P., ve Valiyaveettil S., 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano, 3, 279–290.

Atlı, G., 2009. Bakır, çinko, kadmiyum, krom ve gümüşün *Oreochromis niloticus*'un solungaç ve böbrek dokusundaki Na^{+}/K^{+}-ATPaz,Ca^{+2}-ATPaz ve Mg^{+2}-ATPaz ile kas dokusundaki Ca^{+2}-ATPaz enzim aktivitesi üzerine etkileri, Ç.Ü. Doktora Tezi, Adana, 206 sayfa.

Atli, G., ve Canli, M., 2013. Metals (Ag+, Cd2+, Cr6+) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. Environmental Toxicology, 28(12), 707-717.

Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., ve Gagné, F., 2020. Toxicological effects of inorganic nanoparticle mixtures in freshwater mussels. Environments, 7(12), 109.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., ve Wiesner, M. R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. Nature nanotechnology, 4(10), 634-641.

Baker, T. J., Tyler, C. R., ve Galloway, T. S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. Environmental Pollution, 186, 257–271.

Balasubramanian, D., Du, X., ve Zigler Jr, J. S., 1990. The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. Photochemistry and photobiology, 52(4), 761-768.

Banday, U. Z., Swaleh, S. B., ve Usmani, N., 2019. Insights into the heavy metal-induced immunotoxic and genotoxic alterations as health indicators of *Clarias gariepinus* inhabiting a rivulet. Ecotoxicology and Environmental Safety, 183, 109584.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., ve Gatto, G.J., 2021. Biochemistry. W. H. Freeman, 1272s.

Beutler, E., 1984. Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods Grune and Starton, New York, 160s.

Blakeslee, C. J., Galbraith, H. S., Robertson, L. S., ve St. John White, B., 2013. The effects of salinity exposure on multiple life stages of a common freshwater mussel, *Elliptio complanata*. Environmental Toxicology and Chemistry, 32(12), 2849-2854.

Bossuyt, B.T.A., ve Janssen, C.R., 2004. Influence of multigeneration acclimation to copper on tolerance, energy reserves and homeostasis of Daphnia magna. Environmental Contamination and Toxicology 23, 2029-37.

Boxall A., Chaudhry Q., Sinclair C., Jones A., Aitken R., Jefferson B., ve Watts C., 2007. Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. Central Science Laboratory, York, UK.

Camargo, M. M., Fernandes, M. N., ve Martinez, C. B., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. Aquatic Toxicology, 94(1), 40-46.

Cancer I.A.f.R.o., ve WHO, 1990. Chromium, Nickel and Welding. World Health Organization.

Canli, M., 2005. Dietary and water-borne Zn exposures affect energy reserves and subsequent Zn tolerance of *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 141(1), 110-116.

Canli, E.G., 2021(a). Individual and combined effects of salinity and nanoparticles (Al_2O_3, TiO_2) on the activity of antioxidant enzymes in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 21(8), 415-424.

Canlı, E. G. 2021(b). Alterations on the activities of ion ATPases in the gill and muscle of freshwater mussel (*Unio tigridis*) exposed to copper. Commagene Journal of Biology, 5(2), 150-155.

Canli, E. G., ve Canli, M., 2021(a). Characterization of ATPases in the gill of freshwater mussel (*Unio tigridis*) and effects of ionic and nanoparticle forms of aluminium and copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 247, 109059.

Canli E.G., ve Canli M., 2021(b). Antioxidant system biomarkers of freshwater mussel (*Unio tigridis*) respond to nanoparticle (Al_2O_3, CuO, TiO_2) exposures. Biomarkers, 26: 434-442.

Canlı, E. G., 2022. Farklı sürelerde bakır etkisinde kalan tatlı su midyelerinde (*Unio tigridis*) antioksidan enzim tepkilerinin incelenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 25(1), 31-41.

Canli, E. G., Celenk, A., ve Canli, M., 2022. Accumulation and distribution of nanoparticles (Al_2O_3, CuO, and TiO_2) in tissues of freshwater mussel (*Unio tigridis*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 108(4), 702-707.

Canli, E.G., Baykose, A., Uslu, L.H., ve Canli, M., 2023. Changes in energy reserves and responses of some biomarkers in freshwater mussels exposed to metal-oxide nanoparticles.

Environmental Toxicology and Pharmacology, 98, 104077.

Canli, E. G., ve Canli, M., 2022. Effects of in vivo exposures to nanoparticles (Al_2O_3, CuO, TiO_2) on the activities of ATPases in the gill and muscle of freshwater mussel (*Unio tigridis*). Turkish Journal of Zoology, 46(4), 377-384.

Canli, E.G., ve Canli, M., 2025. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic biomarkers of sublethal cadmium toxicity in the freshwater mussel (*Unio tigridis*). Ecotoxicology, 34, 401-411.

Carlberg, I.,ve Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. Journal of Biological Chemistry, 25: 5475–5480.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., ... ve Linse, S., 2007. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(7), 2050-2055.

Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., ve Lee, S. J., 2025. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: A review. Cell death discovery, 11(1), 19.

Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., ve Sharifi-Rad, J., 2023. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. Frontiers in chemistry, 11, 1158198.

Chen, H., Teng, Y., Lu, S., Wang, Y., ve Wang, J., 2015. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. Science of the total environment, 512, 143-153.

Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Médioni A., Camus L., Colaço A., ve Bebianno M.J., 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. Sci. Tot. Environ. 389(2-3): 407-417.

Corsi, I., Cherr, GR., Lenihan, HS., Labille, J., Hassellov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puntes, V., Della Torre, C., Pinsino, A., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., ve Matranga, V., 2014. Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. ACS Nano 8(10):9694–9709.

Cnubben., N.H.P., Rıetjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., ve van Bladeren, J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10, 141- 152.

Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J., ve Owen, R., 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. Ecotoxicology, 17, 421-437.

Culbertson, J. B., Valiela, I., Olsen, Y. S., ve Reddy, C. M., 2008. Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. Environmental Pollution, 154(2), 312-319.

Da Silva Fonseca, J., de Barros Marangoni, L. F., Marques, J. A., ve Bianchini, A., 2019. Carbonic anhydrase activity as a potential biomarker for acute exposure to copper in corals. Chemosphere, 227, 598-605.

Das, P., Xenopoulos, M. A., ve Metcalfe, C. D., 2013. Toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticle suspensions to the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 91(1), 76-82.

De Marchi, L., Coppola, F., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Monserrat, J.M., del la Torre, C., ve Freitas, R., 2019. Engineered nanomaterials: from their properties and applications, to their toxicity towards marine bivalves in a changing environment. Environ. Res. 178, 108683.

Demir, N., ve Akkuş, G., 2018. Çanakkale Boğazı (Kepez) midye (*Mytilus galloprovincialis L*., 1819) örneklerinde ağır metal ve antioksidan enzim düzeylerinin mevsimsel değişimi. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences, 5(4), 659-665.

Dijital kaynak 1. TMMOB Jeoloji Mühendisleri Odası, jmo.org.tr. Dijital kaynak 2. İnovatifkimyadergisi.com.

Dijital kaynak 3. https://wol.jw.org/tr/wol/d/r22/lp-tk/102016211

Dijital kaynak 4. https://en.wikipedia.org/wiki/Radical_%28chemistry%29?utm_source=chatgpt.com

Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V., ve Voitsekhovskaja, O. V., 2020. Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. International Journal of Molecular Sciences, 21(9), 3237.

Duroudier, N., Katsumiti, A., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Bilbao, E., ve Cajaraville, M. P., 2021. Cell and tissue level responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* dietarily exposed to PVP/PEI coated Ag nanoparticles at two seasons. Science of the Total 6Environment, 688, 157–170.

Ercan, E., ve Tarkan, A.S., 2014. Effect of salinity on the growth and survival of the freshwater mussel, *Unio crassus*, in an environmentally disturbed river. Pakistan J. Zool., vol. 46(5), pp. 1399-1406.

Fahmy., S. R., ve Sayed, D. A., 2017. Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. Toxicology and Industrial Health, 33(7), 564-575.

Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Ivanina, A.V., Sokolova, I.M., ve Stoliar, O.B., 2018. Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. Chemosphere, 193, 1127-1142.

Farrington, J.W., Goldberg, E. D., Risebrough, R.W., Martin, J.H., ve Bowen, V.T. 1983. US" Mussel Watch" 1976-1978: an overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. Environmental science and technology, 17(8), 490-496.

Ferreira da Silva, B., Pérez, S., Gardinalli, P., Singhal, R.K., Mozeto, A.A., ve Barceló, D., 2011. Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. Trend Anal Chem 30(3):528–540.

Flohé, L., 2020. Glutathione peroxidase. Free Radical Biology and Medicine, 152, 14–25. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.030

Fokina, N.N., Vasil'eva, O.B., Ruokolainen, T.R., ve Nemova, N.N., 2019. Changes in lipid composition and lipid peroxidation products content in the freshwater mussel *Anodonta cygnea L*. under cadmium effect. Limnology and Freshwater Biology, 286-296.

Franco, J.L., Trivella, D.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R., Bainy, A.C., ve Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. Chemico-Biological Interactions, 160(3), 232-240.

Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Horyn, O., Khoma, V., Martinyuk, V., Mishchuk, O., ve Stoliar, O., 2019. Biochemical responses of freshwater mussel *Unio tumidus* to titanium oxide nanoparticles, Bisphenol A, and their combination. Ecotoxicology 28(8), 923-937.

Gomes T., Pinheiro J.P, Cancio I., Pereira C.G, Cardoso C., ve Bebianno M.J., 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Sci. Techno. 45(21): 9356-9362.

Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., ve Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine environmental research, 101, 208-214.

Goswami P., Hariharan G., Godhantaraman N., ve Munuswamy N., 2014. An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*). J. Environ. Sci. Health Part A, 49(13): 1564-1577.

Goyer, R.A., ve Clarkson, T.W. 1996. Toxic effects of metals. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 5, 691-736..

Gozeoglu, S., Canli, E. G., ve Canli, M., 2025. Effects of ZnO Nanoparticles on the Antioxidant, Osmoregulation and Energy Metabolism of Freshwater Mussels (*Unio delicatus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 115(6), 67.

Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., ve Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environ. Toxicol. Chem., 27, 1972–1978.

Gurkan, S. ve Gurkan, M., 2021. Toxicity of gamma aluminium oxide nanoparticles in the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*): Histopathological alterations and antioxidant responses in the gill and digestive gland. Biomarkers, 1-29.

Handy, R.D., ve Shaw J.S., 2007. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. Health, Risk and Society 9: 125-144.

Hanna, S.K., Miller, R.J., Muller, E.B., Nisbet, R.M., ve Lenihan, H.S., 2013. Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the individual performance of *Mytilus galloprovincialis.* PloS

One 8(4).

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., ve Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 51-88.

Jorge M.B, Loro V.L, Bianchini A, Wood C.M, ve Gillis P.L., 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. Aquat Toxicol. 126: 137-147.

Katsumiti, A., Thorley, A.J., Arostegui, I., Reip, P., Valsami-Jones, E., Tetley, T.D., ve Cajaraville, M.P., 2018. Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. Toxicology in Vitro, 48, 146-158.

Kawanishi, M., Matsuda, T., ve Yagi, T., 2014. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. Frontiers in Environmental Science, 2, 36.

Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Beyrem, H., ve Mahmoudi, E., 2016. Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. Environmental Pollution, 242, 1112–1120.

Köprücü, K., Yonar, S.M., ve Şeker, E., 2010. Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. Fisheries science, 76(6), 1007-1013.

Kumar, S., Basumatary, I.B., Sudhani, H.P., Bajpai, V.K., Chen, L., Shukla, S., ve Mukherjee, A., 2021. Plant extract mediated silver nanoparticles and their applications as antimicrobials and in sustainable food packaging: A state-of-the-art review. Trends in Food Science and Technology, 112, 651-666.

Labieniec, M., Gabryelak, T., ve Falcioni, G., 2003. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 539(1-2): 19-28.

Lai, R.W.S., Zhou, G.J., Yung, M.M.N., Djurišić, A.B., ve Leung, K.M.Y., 2023. Interactive effects of temperature and salinity on toxicity of zinc oxide nanoparticles towards the marine mussel *Xenostrobus securis*. Science of The Total Environment, 889, 164254.

Lassoued, A., Khalloufi, N., Saidani, W., Khazri, A., Ghanem-Boughanmi, N., Bouayed, J., ve Ben-Attia, M., 2023. Effects of increased salinity on oxidative stress status in the freshwater mussel *Unio ravoisieri*. Chemistry and Ecology, 39(3), 256-267.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., ve Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense, Toxicol. Appl. Pharmacol. 204 (3) 216–237.

Leung, H.M., Leung, A.O.W., Wang, H.S., Ma, K.K., Liang, Y., Ho, K.C., ... ve Yung, K.K.L., 2014. Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl river delta (PRD), China. Marine pollution bulletin,

78(1-2), 235-245.

Li, Y., Liu, Z., Zhao, B., ve Xiao, Y., 2023. Study on the effect of modified porous materials on heavy metal remediation in agricultural fields. Academic Journal of Management and Social Sciences, 2(1), 6-8.

Liu, G.X., Shu, M.A., Chai, X.L., Shao, Y.Q., Wu, H.X., Sun, C.S., ve Yang, S.B., 2014. Effect of chronic sublethal exposure of major heavy metals on filtration rate, sex ratio, and gonad development of a bivalve species. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 92(1), 71-74.

Lopes R.A.S.F., 2002. Analise temporal da resposta de biomarcadores bioquımicos e do n´ıvel de metais tracos na ostra nativa Crassostrea rhizophorae cultivadas no complexo estuarino de Laguna/SC, Department of Aquaculture, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, SC, p. 48.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farra, N.J., ve Randall, R.J., 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

Livingstone D.R., Lips F., Martinez P.G., ve Pipe R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar Biol 112:265–276

Marnett, L. J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 424(1-2), 83-95.

Mark, R., Wiesner, P.E. ve Bottero, J., 2007. Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials. Inc. McGraw-Hill, 231-331.

Meyer, J.S., Lyons-Darden, T., Garman, E.R., Middleton, E.T., ve Schlekat, C.E., 2020.

Toxicity of nanoparticulate nickel to aquatic organisms: review and recommendations for improvement of toxicity tests. Environmental Toxicology and Chemistry, 39(10), 1861-1883.

Mlouka R., Cachot J., Boukadida K., Clérandeau C., Gourves P.Y., ve Banni M., 2019. Compared responses to copper and increased temperatures of hybrid and pure offspring of two mussel species. Sci. Tot. Environ. 685: 795-805.

Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment. Environmental International, 32, 967-976.

Morton, B., 2012. Bivalve: The mantle and musculature. Encyclopædia Britannica.

Mueller, N.C. ve Nowack, B., 2008. Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. Environmental Science and Technology, 42, 4447-4453.

Muisa, N., Hoko, Z., ve Chifamba, P., 2011. Impacts of alum residues from Morton Jaffray Water Works on water quality and fish, Harare, Zimbabwe. Physics and Chemistry of the Earth, 36(14–15), 853–864.

Murali, M., Suganthi, P., Athif, P., Bukhari, A.S., Mohamed, H.S., Basu, H., ve Singhal, R.K., 2017. Histological alterations in the hepatic tissues of Al2O3 nanoparticles exposed freshwater fish

Oreochromis mossambicus. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 44, 125-131.

Murali, M., Athif, P., Suganthi, P., Bukhari, A.S., Mohamed, H.S., Basu, H., ve Singhal, R.K., 2018. Toxicological effect of Al_2O_3 nanoparticles on histoarchitecture of the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 59, 74-81.

Muyssen, B.T., Messiaen, M., ve Janssen, C.R., 2010. Combined cadmium and temperature acclimation in Daphnia magna: physiological and sub-cellular effects. Ecotoxicology and Environmental Safety 73(5), 735-742.

Najahi-Missaoui, W., Arnold, R.D., ve Cummings, B.S., 2020. Safe nanoparticles: are we there yet?. International journal of molecular sciences, 22(1), 385.

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., ve Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311, 622–627.

Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2021. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, 1328s.

Neo, M.L., Eckman, W., Vicentuan, K., Teo, S.L.M., ve Todd, P.A., 2015. The ecological significance of giant clams in coral reef ecosystems. Biol. Conserv. 181, 111–123.

Nugroho, A.P., ve Frank, H., 2012. Effects of copper on lipid peroxidation, glutathione, metallothionein, and antioxidative enzymes in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. Toxicol. Environ. Chem. 94(5), 918-929.

Ngo, T.T. H., 2008. Effects of cadmium on calcium homeostasis and physiological conditions of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (Doctoral dissertation).

Oberdörster, G., Oberdörster, E. ve Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect., 113, 823–839.

Oliviero, M., Schiavo, S., Rametta, G., Miglietta, M.L., ve Manzo, S., 2017. Different sizes of ZnO diversely affected the cytogenesis of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Science of the Total Environment, 646, 745–754.

Pepe, N., Canli, E.G., ve Canli, M., 2022. Salinity and/or nanoparticles (Al_2O_3, TiO_2) affect metal accumulation and ATPase activity in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 94, 103931.

Perez, S., Farre, M. ve Barcelo, D., 2009. Analysis, behaviour and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28, 820-832.

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

Phillips, D.J.H., 1986. Use of bioindicators in monitoring conservative contaminants: program design imperative, Mar. Pollut. Bull. 10–17.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., ve Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. J Nanopart Res 14:1109.

Rai, P.K., Lee, S.S., Zhang, M., Tsang, Y.F., ve Kim, K.H., 2019. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. Environment international, 125, 365-385.

Rand, G.M., Wells, P.G., ve McCarty, L.S., 1995. Introduction to aquatic toxicology, in: G.M. Rand (Ed.), Fundamentals of Aquatic Toxicology (Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment), Taylor & Francis, Washington, USA, , pp. 1–66.

Ray, A., Gautam, A., Das, S., Pal, K., Das, S., Karmakar, P., ve Ray, S., 2020. Effects of copper oxide nanoparticle on gill filtration rate, respiration rate, hemocyte associated immune parameters and oxidative status of an Indian freshwater mussel. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 237, 108855.

Riisgård, H.U., 2001. On measurement of filtration rates in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation. Marine Ecology Progress Series, 211, 275-291.

Risebrough, R.W., De Lappe, B.W., Walker II, W., Simoneit, B.R., Grimalt, J., Albaiges, J., ve Fernandez, M.M., 1983. Application of the mussel watch concept in studies of the distribution of hydrocarbons in the coastal zone of the Ebro Delta. Marine Pollution Bulletin, 14(5), 181-187.

Rodwell, V.W., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Weil, P.A., ve Murray, R.K., 2021. Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Education, 752s.

Rosen, G., M., Tsai, P., ve Pou, S., 2002. Mechanism of free-radical generation by nitric oxide synthase. Chemical reviews, 102(4), 1191-1200.

Ruiz P., Katsumiti A., Nieto J.A, Bori J., Jimeno-Romero A., Reip P., ve Cajaraville M.P., 2015. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research, 111, 107-120.

Santini, O., Chahbane, N., Vasseur, P., ve Frank, H., 2011. Effects of low-level copper exposure on Ca^{2+}-ATPase and carbonic anhydrase in the freshwater bivalve *Anodonta anatina*. Toxicological and Environmental Chemistry, 93(9), 1826-1837.

Scandalios, J.G., 2002. The Rise of ROS. Trends in Biochemical Sciences, 27(9), 483–486.

Schiavo, S., Oliviero, M., Miglietta, M., Rametta, G., ve Manzo, S., 2016. Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO_2 and TiO_2 effects at population growth inhibition levels. Science of the Total Environment, 575, 836–846.

Schneider, S.L., ve Lim, H.W., 2019. A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. Photodermatol. Photo. 35, 442–446.

Sukhovskaya I.V., Borvinskaya E.V., Kochneva A.A., Slukovsky Z.I., Kurpe S.R., Xu K., Tang Z., Liu S., Xia H., Liu L., Wang Z., ve Qi P., 2018. Effects of low concentrations copper on

antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. Fish Shellfish immunology, 82: 77-83.

Tian, S., Zhang, Y., Song, C., Zhu, X., ve Xing, B., 2014. Titanium dioxide nanoparticles as carrier facilitate bioaccumulation of phenanthrene in marine bivalve, ark shell (*Scapharca subcrenata*). Environmental Pollution, 192, 59-64.

Uğurlu, E., ve Kumruoğlu, L.C., 2024. Various Elements Levels in Four Freshwater Mussels Shells Obtained from Gölbaşı Lake, Turkey. Pollution, 10(1), 73-89.

Van Handel, E., 1985(a). Rapid determination of total lipids in mosquitoes. Journal of American Mosq Control Assoc, 1(3), 302-304.

Van Handel, E., 1985(b). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. Journal of American Mosq. Control Assoc, 1(3), 299-301.

Viarengo, A., ve Canesi, L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution, Aquaculture 94 (2–3) 225–243.

Viarengo, A., ve Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy-metal cation homeostasis in marine-invertebrates, Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 104 (3) 355–372.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Burlando, B., Canesi, L., ve Orunesu, M., 1996. In vivo effects of copper on the calcium homeostasis mechanisms of mussel gill cell plasma membranes. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 113(3), 421-425.

Vijayakumar, T.S., Mahboob, S., Bupesh, G., Vasanth, S., Al-Ghanim, K.A., Al-Misned, F., ve Govindarajan, M., 2020. Facile synthesis and biophysical characterization of egg albumen-wrapped zinc oxide nanoparticles: a potential drug delivery vehicles for anticancer therapy. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 60, 102015.

Yan, X., Liu, M., Zhong, J., Guo, J., ve Wu, W., 2018. How human activities affect heavy metal contamination of soil and sediment in a long-term reclaimed area of the Liaohe River Delta, North China. Sustainability, 10(2), 338.

Yıldırım M.Z., 2023. Türkiye Yumuşakçaları. İKSAD Publishing House, 202s.

Yoloğlu, E., 2019. Alterations in some biochemical responses of freshwater mussels in acute imidacloprid exposure. Adıyaman University Journal of Science, 9(2), 213-229.

Wang, N., Ivey, C.D., Ingersoll, C.G., Brumbaugh, W.G., Alvarez, D., Hammer, E.J., ve Barnhart, M.C., 2017. Acute sensitivity of a broad range of freshwater mussels to chemicals with different modes of toxic action. Environmental toxicology and chemistry, 36(3), 786-796.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., ve Biswas, P., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. Environmental Science and Technology, 40, 4336-4345.

Williams, J.D., ve Butler, R.S. 2004. Phylum Mollusca, Class Bivalvia. 2nd Chapter: Phylum Mollusca, Class Bivalvia Publisher: University Presses of Florida

Williams, R.J., Harrison, S., Keller, V., Kuenen, J., Lofts, S., Praetorius, A., Svendsen, C., Vermeulen, L.C., ve van Wijnen, J., 2019. Models for assessing engineered nanomaterial fate and behaviour in the aquatic environment. Curr. Opin. Env. Sust. 36, 105–115.

Winston, G.W., 1991. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. Comp. Biochem. Physiol. C-Pharma. Toxicol. Endocrin 100, 173-176.

Wu, F., Sokolov, E.P., Khomich, A., Fettkenhauer, C., Schnell, G., Seitz, H., ve Sokolova, I.M., 2022. Interactive effects of ZnO nanoparticles and temperature on molecular and cellular stress responses of the blue mussel *Mytilus edulis*. Science of the Total Environment 818, 151785.

Wu, F., Deng, Y., Sokolov, E.P., Falfushynska, H., Glänzer, A., Xie, L., ve Sokolova, I.M., 2025. Nanopollutants (nZnO) amplify hypoxia-induced cellular stress in a keystone marine bivalve, *Mytilus edulis*. Environmental Research, 274, 121346.

Xia, B., Zhu, L., Han, Q., Sun, X., Chen, B., ve Qu, K., 2017. Effects of TiO_2 nanoparticles at predicted environmental relevant concentration on the marine

scallop *Chlamys farreri*: An integrated biomarker approach. Environmental Toxicology and Pharmacology, 50, 128-135.

Xu, K., Tang, Z., Liu, S., Xia, H., Liu, L., Wang, Z., ve Qi, P., 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. Fish & shellfish immunology, 82, 77-83.

Xu, X., Pan, B., Shu, F., Chen, X., Xu, N., ve Ni, J., 2022. Bioaccumulation of 35 metal (loid) s in organs of a freshwater mussel (*Hyriopsis cumingii*) and environmental implications in Poyang Lake, China. Chemosphere, 307, 136150.

Zhang, T., Yao, J., Xu, D., Ma, X., Jin, W., Lv, G., ve Zhou, Y., 2021. Gill physiological and transcriptomic response of the threatened freshwater mussel *Solenaia oleivora* to salinity shift. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 40, 100913.

Zhou L., Li M., Zhong Z., Chen H., Wang X., Wang M., ve Li C., 2021. Biochemical and metabolic responses of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* to cadmium and copper exposure. Aquat. Toxicol. 236: 105845.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., ve Chen, Y., 2010. Trophic transfer of TiO_2 nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. Chemosphere, 79(9), 928–933.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : GÖZEOĞLU Sihem

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans		
Lisans	Gazi Üniversitesi	2012
Ortaöğretim	Abdulkadir Paksoy Lisesi	2007

Çalışma Tecrübesi

Yıl	İşyeri	Unvan
2015-2021	Sağkaya Çok Programlı Anadolu Lisesi	Öğretmen
2021-Halen	Şehit Mustafa Göksal Anadolu Lisesi	Öğretmen