T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Ahmet Ata ALTURFAN

GİYSİ VE AYAKKABILARDAN TERE GEÇEBİLEN POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBONLARIN (PAH), FİTALATLARIN VE AĞIR METALLERİN BELİRLENMESİ VE BU MADDELERİN ZEBRABALIĞI EMBRİYOLARINDA TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KİMYA MÜHENDİSİ LEVENT TUTANÇ
İSTANBUL, 2022

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35237

Önsöz

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır.

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hülya YÜKSELOĞLU'na,

Deneyim ve bilgilerinden faydalanmamı sağlayan, hoşgörüsü ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet Ata ALTURFAN'a,

Değerli görüşlerini paylaşan, zebrabalığı maruziyet deneylerinin Marmara Üniversitesi Zebrabalığı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmasına olanak sağlayan ve çalışmaların her aşamasında yol gösterici olan sayın Prof. Dr. Ebru Işık ALTURFAN'a, tez çalışmam boyunca bana olan inancını kaybetmeyen ve destekleyen sayın Dr. Derya CANSIZ'a, Marmara Üniversitesi Zebrabalığı Araştırma Laboratuvarı'nda çalışan ve deneysel aşamada bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmam için olanak sağlayıp, fırsat veren sayın Hasan SÖZERİ'ye, eğitim ve çalışma hayatım boyunca katkısı olan beni destekleyen ve gelişmemi sağlayan tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bugüne gelmemi sağlayan beni koşulsuz sevip destekleyen sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

İçindekiler

Önsöz ..... **II**

İçindekiler ..... **III**

Tablolar Listesi ..... **X**

Şekiller Listesi ..... **XI**

Kısaltmalar ..... **xiii**

Özet ..... **xvi**

Abstract ..... **xvii**

1. Giriş ve Amaç **1**

2. Genel Bilgiler **5**

2.1. Endokrin Sistem 5

2.1.1. Endokrin bozucu kimyasallar ve sınıflandırılmaları 6

2.1.2. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları 7

2.1.3. Endokrin bozucuların sağlık üzerine etkileri 8

2.1.4. Endokrin bozucu kimyasalların tekstil endüstrisinde kullanımı 10

2.2.Fitalat 12

2.2.1.Yapısı ve kullanım alanları 12

2.2.2. Biyolojik etkileri 12

2.3. Fitalat Çeşitleri 13

2.3.1. Bütil benzil fitalat (BBP) 13

2.3.1.1. Yapısı ve kullanım alanları 13

2.3.1.2. Biyolojik etkileri 13

2.3.2. Di-etil fitalat (DEP) 14

2.3.2.1. Yapısı ve kullanım alanları 14

2.3.2.2. Biyolojik etkileri 14

2.3.3. Di-izononil fitalat (DINP) 15

2.3.3.1. Yapısı ve kullanım alanları 15

2.3.3.2. Biyolojik etkileri 15

2.3.4. Dimetoksietil fitalat (DMEP) 16

2.3.4.1. Yapısı ve kullanım alanları 16

2.3.4.2. Biyolojik etkileri 16

2.4. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) 16

2.4.1.Yapısı ve kullanım alanları 16

2.4.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri 17

2.5. PAH Çeşitleri 18

2.5.1. Naftalin 18

2.5.1.1. Yapısı ve kullanım alanları 18

2.5.1.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri 18

2.5.2. Fenantren (Phenanthrene) 19

2.5.2.1. Yapısı ve kullanım alanları 19

2.5.2.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri 20

2.5.3. Floranten (FLU) 21

2.5.3.1. Yapısı ve kullanım alanları 21

2.5.3.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri 21

2.5.4.Piren 21

2.5.4.1. Yapısı ve kullanım alanları 21

2.5.3.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri 22

2.6.Ağır Metaller 22

2.6.1.Yapısı 22

2.7. Tekstil Sanayinde Sıklıkla Kullanılan Ağır Metaller: 23

2.7.1. Kurşun (Pb) 23

2.7.1.1. Emilimi ve atılımı 24

2.7.1.2. Toksik etki 25

2.7.2. Arsenik (As) 26

2.7.2.1. Emilimi ve Atılımı 26

2.7.2.2.Toksik etkisi 27

2.7.3. Kadmiyum (Cd) 28

2.7.3.1. Emilimi ve Atılımı 28

2.7.3.2. Toksik etkisi 28

2.8. Tekstil Ürünlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler: 29

2.8.1. Tekstil ürünlerinde kullanılan kimyasal maddeler 30

2.8.1.1. Hammadde 30

2.1.8.2. Boyama 30

2.8.1.3. Baskı 31

2.8.1.4. Apre uygulamaları 31

2.8.2. Güvensiz ürün 31

2.8.3. Kumaştan tere migrasyon 32

2.9. Deneysel Hayvan Modeli Olarak Zebrabalığı 33

2.10. Apoptoz İle İlişkili Genler 34

2.10.1. Tp53 (Tümör baskılayıcı gen) 34

2.10.2. Bax 34

2.10.3. Tnf-α (Tümör nekroz faktörü) 35

2.10.4. BDNF (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör) 36

3. Materyal ve Metot 37

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar 37

3.1.1 Kullanılan kimyasallar 37

3.1.2. Kullanılan cihazlar 40

3.2. Kumaş Örneklerine Yapılan İşlemler ve Uygulanan Yöntemler 41

3.2.1. Yapay ter çözeltisinin hazırlanması 41

3.2.2. Yapay ter çözeltisi ile ekstraksiyon 41

3.3. Ağır Metal Analizi 42

3.3.1. Kütlece (w/w) %2'lik Nitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanması 42

3.3.2. Internal standart çözeltisinin hazırlanması (200 ppb) 42

3.3.3. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 43

3.3.4. Ter çözeltilerinin ICP-MS cihazında analizi 44

3.4. Fitalat Analizi 49

3.4.1 Ana stok referans ve internal standart çözeltilerinin hazırlanması (1000 ppm) 50

3.4.2. Ara Stok Miks Çözeltisinin Hazırlanması (10 ppm) 50

3.4.3. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması 50

3.4.4. Ter numunelerinin fitalat analizi için ekstraksiyonu 53

3.4.5. GC-MS Cihazında Fitalat Analizi 54

3.5. PAH Analizi 58

3.5.1. Ana stok referans ve internal standart çözeltilerinin hazırlanması (1000 ppm) 59

3.5.2. Ara stok miks çözeltisinin hazırlanması (10 ppm) 59

3.5.3. Ara stok miks çözeltisinin hazırlanması (0,5 ppm) 59

3.5.4. Ara stok internal standart çözeltisinin hazırlanması (5 ppm) 59

3.5.5. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 60

3.5. 6. Ter numunenin PAH analizi için ekstraksiyonu 62

3.5.7. Numunenin GCMS cihazında analizi 63

3.6. Zebra Balığı Embriyolarında Maruziyet Deneyleri 66

3.6.1. Zebra balıkları bakım ve beslenme prosedürü 66

3.6.2. Zebrabalıklarından embriyo eldesi 67

3.6.3. Maruziyet uygulanması 68

3.7. Lokomotor aktivite testi 68

3.8. Homojenat hazırlama 70

3.9. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi 70

3.9.1. Total protein tayini 70

3.9.2 Lipit peroksidasyon (LPO) tayini 72

3.9.3. Total Nitrik Oksit Tayini 74

3.9.4. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini 75

3.9.5. Asetikolin Esteraz Aktivitesi 77

3.10. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR) 78

3.11. İstatistiksel Analizler 79

4. Bulgular 80

4.1. Giysi ve Ayakkabı Bileşenlerine Uygulanan İşlemler Sonucu Tere Geçiş Yapan EBK Analiz Sonuçları 80

4.1.1 Tarama sonrasında pozitif numune sonuçları 80

4.1.2 Ter çözeltisine migre olan ağır metal sonuçları 80

4.1.3 Ter çözeltisine göç eden fitalat sonuçları 83

4.1.3 PAH analiz sonuçları 85

4.2. Zebra Balığı Embriyosundaki Analizlerin Sonuçları 87

4.2.1. Maruziyet sonrası gelişim takibi 87

4.2.1.1. Ağır Metal Maruziyeti 87

4.2.1.2. Fitalat Maruziyeti 88

4.2.2 Mortalite analizi sonuçları 89

4.2.3. Kuluçkadan çıkma analizi sonuçları 90

4.2.4. Davranış Analizleri 91

4.2.4.1. Zebra Balığı Embriyolarının Maruziyet Sonrası Ortalama Hızları... 91

4.2.4.2. Zebrabalığı Embriyolarının Maruziyet Sonrası Keşif Oranı..... 92

4.3. Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları 93

4.3.1. Lipit peroksidasyon analizi sonuçları..... 93

4.3.2.Nitrik oksit sonuçları..... 94

4.3.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları..... 95

4.3.4.Asetilkolin esteraz aktivitesi sonuçları..... 96

4.4. Gen İfadesi Sonuçları..... 97

4.4.1. Tp53 gen ifadesi analizi 97

4.4.2. Bax gen ifadesi analizi 98

4.4.3. Tnf α gen ifadesi analizi..... 99

4.4.4. Bdnf gen ifadesi analizi..... 100

5. Tartışma ve Sonuç..... 101

6. Kaynakça 111

7. Özgeçmiş 122

Tablolar Listesi

Tablo 3. 1: Kullanılan Kimyasalların listesi 37

Tablo 3. 2: Kullanılan cihazların listesi 40

Tablo 3. 3: Kalibrasyon Noktaları ve Hazırlanan Metaller 43

Tablo 3. 4: ICP-MS Cihaz Parametreleri 48

Tablo 3. 5: Fitalatlar 49

Tablo 3. 6: Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 50

Tablo 3. 7: GC-MS Cihaz Parametreleri 55

Tablo 3. 8: GCMS SIM Metot Parametreleri 55

Tablo 3. 9: PAH Etken Maddeleri 58

Tablo 3. 10: Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Miktarlar 60

Tablo 3. 11: GCMS Cihaz Parametreleri 63

Tablo 3. 12: GCMS SIM Parametreleri 64

Tablo 3. 13: Total Protein Tayin Yöntemi 72

Tablo 3. 14: Lipit Peroksidasyon Tayin Yöntemi 73

Tablo 3. 15: Nitrik oksit tayin yöntemi 75

Tablo 3. 16: Süperoksit Dismutaz Tayin Yöntemi 77

Tablo 3. 17: Asetikolin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemi 78

Tablo 4. 1: Ağır Metal Çalışma Sonuçları 82

Tablo 4. 2: Fitalat Çalışma Sonuçları 84

Tablo 4. 3: PAH Çalışması Sonuçları 86

Şekiller Listesi

Şekil 2. 1: Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları 8

Şekil 2. 2: EBK'lere gelişim dönemlerinde maruz kalmış olan deney hayvanları ve insan çalışmalarında ortaya çıkan bozukluklar 9

Şekil 2. 3: Fitalatlar gen ekspresyonu ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyerek toksisiteye sebep olurlar 11

Şekil 3. 1: Çalışmada Kullanılan Agilent ICP-MS Cihazı 44

Şekil 3. 2: Arsenik Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 45

Şekil 3. 3: Kadmiyum Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 46

Şekil 3. 4: Kurşun Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 47

Şekil 3. 5: DINP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 51

Şekil 3. 6: DMEP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 52

Şekil 3. 7: BBP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 53

Şekil 3. 8: Çalışmada Kullanılan Agilent Marka GCMS Cihazı 54

Şekil 3. 9: Fitalat Toplam İyon Kromatogramı (TIC) 57

Şekil 3. 10: Naftalin Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 60

Şekil 3. 11: Benzo(a)antrasen Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 61

Şekil 3. 12: Floranten Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi 62

Şekil 3. 13: PAH Toplam İyon Kromotografı (TIC) 65

Şekil 3. 14: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi 66

Şekil 3. 15: Zebra Balığı Çiftleştirme Tankı 67

Şekil 3. 16: ToxTrac programı ile 72 hpf' de embriyoların davranış analizleri için ayarların yapılması ve embriyoların izlenmesi 69

Şekil 4. 1: Ağır Metal Maruziyeti Sonucu Zebrabalığı Embriyolarının Morfolojisi . 87

Şekil 4. 2: Fitalat maruziyeti sonucu Zebrabalığı embriyolarının morfolojisi..... 88

Şekil 4. 3: Grupların 24 hpf, 48 hpf ve 72 hpf mortalite oranları 89

Şekil 4. 4: Grupların 48 hpf ve 72 hpf kuluçkadan çıkma oranları..... 90

Şekil 4. 5: Grupların ortalama hız (mm/sn) karşılaştırması 91

Şekil 4. 6: Grupların keşif oranları (%) karşılaştırması 92

Şekil 4. 7: Grupların lipit peroksidasyon (LPO) değerleri karşılaştırması..... 93

Şekil 4. 8: Grupların nitrik oksit (NO) değerleri karşılaştırması 94

Şekil 4. 9: Grupların süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesi karşılaştırması 95

Şekil 4. 10: Grupların asetil kolin esteraz (AChE) aktivitesi karşılaştırması 96

Şekil 4. 11: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen tp53 kat değişiklikleri grafiği..... 97

Şekil 4. 12: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen bax kat değişiklikleri grafiği..... 98

Şekil 4. 13: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen tnf α kat değişiklikleri grafiği 99

Şekil 4. 14: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen bdnf kat değişiklikleri grafiği 100

Kısaltmalar

AChE: Asetilkolin esteraz

As: Arsenik

Bax: Bcl2 ile ilişkili X proteini

BBP: Bütil Benzil Fitalat

CAT: Katalaz

Cd: Kadmiyum

CDNB: 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin

Co: Kobalt

Cr: Krom

Cu: Bakır

DBP: Dibütil fitalat

DCM: Diklorometan

DEHP: Di-2-etilheksil fitalat

DEP: Di-Etil Fitalat

DIDP: Diizodesil fitalat

DINP: Diizononil fitalat

DMEP: Dimetoksietil fitalat

DMT: duodenal metal taşıyıcısı

DNOP: Di-n-oktil fitalat

DTNB: 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)

EBK: Endokrin bozucu kimyasallar

FLU: Floranten

GC-MS: Gaz kromotografisi kütle spektroskopisi

GPx: Glutatyon peroksidaz

GSH: İndirgenmiş glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

H2O2: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik asit

Hg: Civa

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

ICP-MS: Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi

K_2HPO_4: Dipotasyum fosfat

KH_2PO_4: Mono potasyum fosfat

LPO: Lipit peroksidasyon

MDA: Malondialdehit

$Na_2HPO_4.2H_2O$: Sodyum fosfat dibazik hidrat

Na_2HPO_4: Disodyum Fosfat

NaCl: sodyum klorür

Na-EDTA: Disodyum etilendiamin tetraasetik asit

NaH_2PO_4: Monosodyum fosfat

NaOH: Sodyum hidroksit

NEDD: N-(1-Naftil)-etilendiamin- dihidroklorür

Ni: Nikel

NO: Nitrik oksit

PAE: Fitalik asit esterleri

PAH: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar

Pb: Kurşun

PU: Suni deri

PVC: polivinil klorür

ROS: Reaktif oksijen türlerinin

Sb: Antimon

SOD: Süperoksit dismutaz

SULF: Sülfanilamid

TBA: Tiyobarbitürik asit

TBÇ: Tekstil boyama çamuru

TCA: Triklorasetik asit

TIC: Toplam İyon Kromotografı

USEPA: Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı

WHO: Dünya sağlık örgütü

Zn: Çinko

$ZnSO_4.7\ H_2O$: Çinko sülfat heptahidrat

$ZnSO_4$: Çinko sülfat

Özet

Endüstride kullanılan toksik kimyasalların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri her geçen gün artmakta ve endokrin sistemi bozarak kalıcı etkilere neden olabilmektedir. Bu kimyasalların başında fitalatlar, ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) gibi bileşikler yer almaktadır. Günlük hayatımızda kullandığımız tekstil ürünleri, ayakkabı ve aksesuarların çoğunun üretiminde bu zararlı bileşiklerin kullanımı endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Bunun üzerine, çalışmamızda insanların farklı sıcaklık ve sürelerde tekstil ürünlerini kullanmaları durumunu simüle etmek amacıyla, farklı tekstil ürünlerini farklı sıcaklık ve sürelerde yapay tere maruz bıraktık. Daha sonra, tekstil ürünlerinden tere geçen endokrin bozucu kimyasalları (EBK) belirledik ve insanlardaki fetal döneme karşılık gelen zebrabalığı embriyolarını bu kimyasallara maruz bırakarak embriyolardaki toksik etkilerini inceledik. Yapay terde fitalatların ve PAH'ların analizi GC-MS sistemiyle; yapay terde ağır metal analizi ICP-MS sistemi ile; embriyolarda *tp53, bax, tnf alfa, bdnf* gen ifade düzeyleri RT-PCR yöntemi ile, oksidan-antioksidan parametrelerinin analizleri ise spektrofotometrik yöntemlerle yapıldı. Çalışmamızın sonuçlarına göre 14 gün 37^{O}C'de bekletilen örneklerden tere belirgin olarak geçen fitalatlardan DEP, BBP, DMEP ve DINP ile ağır metallerden Cd, As ve Pb maruziyetlerinin zebrabalığı embriyolarında gelişimsel parametreler, biyokimyasal hasar parametreleri ile apoptoz ve inflamasyon ile ilişkili genlerin ifadelerinde farklılığa neden olduğu gözlendi. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin konu ile alakalı yeni yönetmelik ve yasaların çıkmasına, tekstil firmalarına yapılan denetimlerin daha sıklaştırılmasına ve bu kimyasalların tekstil ürünlerinde kullanımlarının sınırlandırılmasıyla ilgili yeni adli yaptırımların gündeme gelmesine katkı yapacağı inancını taşımaktayız.

Anahtar kelimeler: Endokrin bozucu kimyasallar, Tekstil ürünleri, Embriyo, Yapay ter

Abstract

The adverse effects of toxic chemicals used in industry on human health are increasing day by day and cause permanent effects by damaging the endocrine system. The prominent ones of these chemicals are phthalates, heavy metals, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). The utilization of such harmful compounds in the production of most textile products, shoes, and accessories that we use in our daily lives is at an alarming level. Therefore, to stimulate the conditions that people wear varying textile products for different periods and temperatures, we exposed different textiles to artificial sweat at different temperatures and periods. Subsequently, we determined the endocrine disrupting chemicals (EDC) that migrated from textile to artificial sweat solution and investigated the toxic effects on zebrafish embryos which are similar to the fetal period in humans by exposing them to these chemical compounds. Phthalates and PAHs was analyzed by the GC-MS system and heavy metal analysis was performed by the ICP-MS system in artificial sweat. Moreover, tp53, bax, tnf-α, and bdnf gene expression levels in embryos were investigated by RT-PCR method, and oxidant-antioxidant parameters was performed by spectrophotometric methods. According to the results of the study, exposures of DEP, BBP, DMEP and DINP and heavy metals such as Cd, As and Pb prominently migrated to artificial sweat from fabric samples kept at 37°C for 14 days, causing differences in developmental parameters, biochemical markers, and expressions of genes related to apoptosis and inflammation in zebrafish embryos. Consequently, the outcomes of this study will contribute to the enactment of new related legislation and laws, to more frequently arranged inspections of textile firms, and to the emergence of new legal sanctions limiting the use of these toxic chemical in use of textile products.

Key Words: Endocrine disrupting chemicals, Textile products, Artificial sweat, Embryo

1. Giriş ve Amaç

Moda toplumca belli bir süreyle saç, giyim ve dekorasyon gibi şeylere karşı gösterilen aşırı düşkünlük olarak tanımlanır. Modanın ortaya çıkardığı ve gündemde tuttuğu "giyinmek olgusu" insanın dördüncü bedensel fonksiyonudur. Giyinme; beslenme, nefes alma ve uykunun ardından insanoğlunun temel gereksinimlerindendir.

Tekstil terimi Latince dokuma anlamındaki "texer" kelimesinden gelir. Tekstil, iplik olarak bilinen doğal liflerden oluşan esnek bir malzemeyi tanımlar. Örme, dokuma, düğümleme, preslenme ve terbiye aşamaları sonucu tekstil ürünleri oluşturulur. Tekstilin tarihi neredeyse insan uygarlığı kadar eskidir. Zaman içinde tekstil malzemeleri sürekli gelişmiş ve zenginleşmiştir.

MÖ 6. ve 7. yüzyıllarda, ilk lif kullanımına dair kaydedilen en eski işaret, İsviçre'deki kazılarda keşfedilen keten ve yün kumaşlardır. Hindistan'da ipek kültürü MS 400'de yerleşmişken, pamuğun eğirilmesi MÖ 3000'e kadar uzanmaktadır. Çin'de ise ipekçilik ve eğirme yöntemlerinin keşfi ve gelişimi MÖ 2600'lü yıllarda başlamıştır. Mısır'da ise dokuma sanatı MÖ 3400'den sonra gelişmeye başladı. 18. ve 19. yüzyıllardaki sanayi devrimiyle birlikte dokuma makineleri icat edildi ve doğal lifler işlenmeye başlandı.

Ayakkabının, insanlar tarafından ilk kullanım tarihinin kötü hava koşulları sebebiyle yaklaşık 5 milyon yıl önce buz devrinin başlangıcı olduğu tahmin edilmektedir. İlk ayakkabı parçaları, genellikle deriden veya kuru otlardan yapılan sargılardan ibaretti. Daha sonra, güçlü bir deri kayışla parçalar birleştirildi ve ilk işlenmiş ayakkabı olan sandaletler icat edildi.

Mısır’daki mezar odalarında bulunan resimler, deri kıyafetlerin ve ayakkabının hazırlanmasındaki çeşitli aşamaları betimlemektedir. Bu resimler Mısır'da ayakkabının “gücü ve statüyü” temsil ettiğini anlatır. Roma'da da ayakkabılar Mısır’da olduğu gibi sosyal sınıfı sergilerdi. Konsoloslar beyaz renkli ayakkabılar, senatörler ise kahverengi ayakkabılar giyerlerdi. Geri kalan halk ise tek tip ayakkabı kullanırdı.

Mısır’daki sandaletler hasır, papirüs ve hurma lifinin çeşitli muamelelere tabi tutulmasından sonra üretilirdi. Kadınlar sandaletlerini değerli taşlar ve mücevherlerle süslerdi. Ancak günümüzde ise ayakkabı üretiminde suni deri, suni kauçuk, metaller, sentetik malzemeler, çeşitli tipte plastik malzemeler ve yapıştırıcılar kullanılmaktadır. Eskiden tekstil ve ayakkabı ürünlerinin imalatı doğal malzemelerle yapılmaktaydı. Ancak günümüzde ürün maliyetlerini düşürmek adına kolaylıkla üretilebilen ve maliyeti daha düşük malzeme ve kimyasallardan faydalanılmaktadır. Tekstil ürünleri ve ayakkabı imalatı aşamasında sentetik boyar maddeler, poliüretan kumaşlar, poliüretan deriler, renkli suni deri, kumaş üzerine renkli baskılar ve sünger dolgu malzemeleri gibi çeşitli ürünler kullanılmaktadır. Bu ürünlerin büyük bir kısmı kanserojen olan ve teratojenik özellik taşıyan, endokrin sistem üzerinde zararlı etkileri olan kimyasalları içerir. Bu kimyasallara endokrin bozucu kimyasallar denilmektedir. Endokrin bozuculardan olan dietilheksil fitalatın, bisfenol A’nın, ağır metallerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların çoğu Avrupa ülkeleri ve Amerika’da üç yaşın altındaki çocuk kıyafet ve ürünlerinde kullanılması yasaklanmış ve diğer endokrin bozucuların da kullanımına ciddi sınırlamalar getirilmiştir.

1999 yılı Mart ayında Ekotoksisite, Toksisite ve Çevre Bilim Komitesi ekotoksikoloji testlerinin yöntemleri ve vahşi yaban hayatı temalarının üzerinde durarak bu toksik kimyasalların yaban hayatı ve insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili bir rapor hazırladı ve EBK’ları “küresel potansiyel sorun” olarak belirledi. Türkiye’de de 31066 sayılı,

12 Mart 2020 tarihinde Resmi gazetede yayımlanan “Biyosidal ürünler yönetmeliğinde değişiklik yapılmasına dair yönetmeliğin” 6. maddesinin 2,3 ve 4. fıkrasında “Kalıcı biyobirikimli ve toksik veya çok kalıcı çok biyobirikimli maddeler içeren ya da üreten, endokrin bozucu özellikleri olan, gelişimsel nörotoksik veya immünotoksik etkileri olan, biyosidal ürünlere, halka pazarlanması veya halkın kullanımı amacıyla ruhsat verilmez” denilmektedir.

Bu kimyasalların düşük dozları bile etki gösterebilmeleri için yeterli olmaktadır. Bunlar ne yazık ki artık günlük modern yaşamımızın önemli bir parçası olmuşlardır. Doğal yaşamda bu kimyasallar bazı canlılarca sentez edilebilirlerken bir kısmı da endüstriyel faaliyetler sonucunda üretilmektedir. Ayrıca bazı kimyasallar da bu faaliyetlerin bir yan ürünü olarak meydana gelirler. Sanayi devrimi sonrası ve teknolojinin hızlı gelişimi ile listeye her geçen gün bir yenisi eklenen bu kimyasalların sayıları son 20 yıl içinde önemli ölçüde artmıştır. İnsanoğlu su, hava, yiyecek, anne sütü, boya, temizlik maddeleri ve tekstil ürünleri vasıtasıyla bu kimyasallara maruz kalmaktadır. EBK’lar yağda çözünebildiklerinden insan ve hayvanların yağ dokularında kolaylıkla birikebilmekte ve vücutta uzun süre kalabilmektedir. Bu endokrin bozuculara maruziyet eğer hızlı hücre bölünmesi ve farklılaşmasının olduğu embriyonel ve fetal dönemlerinde gerçekleşirse önemli sağlık problemleri ile karşı karşıya kalınabilir. Doğum öncesi fetal hasar, yaşamın ilerleyen dönemlerinde olumsuz sonuçlara neden olabilir. Çoğu maruziyet durumda, hasarın geri dönüşümü imkânsızdır. Çünkü fetüs hasara yetişkinlere göre çok daha duyarlıdır. Bu yüzden biz de endokrin bozucuların embriyonel gelişim üzerine olan etkilerini gözlemek amaçlı zebrabalığı embriyolarını kullandık.

Çalışmamızda insanların farklı sıcaklıklarda tekstil ürünlerini kullanmaları durumunu simüle etmek amacıyla, farklı tekstil ürünleri yapay tere değişen sürelerde ve belirli

sıcaklıklarda maruz bırakılacaktır. EBK'ların farklı tekstil ürünlerinden yapay tere migrasyonu incelenecek, buradan elde ettiğimiz verilerle tere geçen ağır metal, fitalat ve PAH'ları belirledikten sonra bu maddelere fetal dönemdeki maruziyetin etkileri, zebrabalığı embriyolarındaki muhtemel toksik etkileri üzerinden incelenecektir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Endokrin Sistem

Canlı sistemlerde bulunan hücre, doku ve organlar arası etkileşim, merkezi sinir sistemi ve endokrin sistem ile sağlanmaktadır. Canlı sistemlerde bulunan bu kompartımanlarda çeşitli nedenlerden dolayı değişimler meydana gelir. Bu değişimlere karşı merkezi sinir sistemi ve endokrin sistemin uyarıları aracılığıyla kompartımanlar arasında bir uyum mekanizması oluşturulur. Bu uyum mekanizmasında etkili olan merkezi sinir sisteminde uyarılar devamlı ve hızlı olurken endokrin sistemde bu uyarılar devamlı olmamakla beraber daha yavaştır (1).

Vücudumuzda birçok metabolik yolda düzenlemelerden sorumlu olan hormonlar vücudumuzun mesajcı molekülleri olarak adlandırılan kimyasallardır. Bu kimyasallar vücutta sentez edilmelerinin ardından düzenleyici görevlerini yerine getirmek adına kan yoluyla vücudun farklı hücre, doku ve organlarına ulaşırlar. Hücre yüzeyindeki ya da nükleustaki reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler (2).

Vücudumuzda endokrin ve ekzokrin bezler olmak üzere iki farklı salgı bezi çeşidi bulunmaktadır. Endokrin bezler ile salgı direkt olarak kana verilirken ekzokrin bezler aracılığıyla salgı vücut dışına ya da vücut boşluklarına salınır. Hormonlar endokrin bezler tarafından salgılanır ve salgılanmalarının ardından kan yoluyla hedef hücre ya da dokuya ulaşarak etkilerini gösterirler. Hormonlar hipotalamus, epifiz bezi, hipofiz bezi, tiroid bezi, böbreküstü bezleri, pankreas, ovaryum ve testis gibi vücudun farklı organlarından salgılanmaktadır (1).

Endokrin sistem büyüme ve gelişmenin düzenlenmesi, organizmadaki birçok metabolik yolağın düzenlemesi, üreme hücrelerinin oluşumu, embriyonik gelişim gibi birçok önemli fonksiyona sahiptir. Endokrin sistem normal şartlar altında bu fonksiyonlarını düzenli olarak yerine getirecek şekilde programlanmıştır, fakat

organizmaya kimyasallar aracılığıyla endojen ya da ekzojen etkiler sonucu bu sistemde defektler meydana gelebilmektedir. Endokrin sistemde negatif etkiye sebep olan birçok kimyasal bulunmaktadır. Bu kimyasallar bazı organizmalar tarafından üretilebilirken bazıları da endüstriyel faaliyetlerin sonucunda meydana gelirler (2). Endüstriyel faaliyetlerde ara veya yan ürün olarak oluşan ya da sanayide kullanılan kimyasalların bazıları fitalatlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlardır (PAH) (1). Endokrin sistemde bozukluklara sebep olan bu kimyasallara endokrin bozucu kimyasallar (EBK) denir.

2.1.1. Endokrin bozucu kimyasallar ve sınıflandırılmaları

Son yıllarda EBK olarak adlandırılan ve insan yapımı olan bileşikler bilim dünyasında dikkatleri üzerine çekmektedir. Bu kimyasallar endokrin sistemin gelişimini ve fonksiyonunu değiştirebilmekte, hormonların bağlanma, taşınma, üretim ve vücuttan uzaklaştırılmaları üzerine etki etmektedir. Şu ana kadar yapılan bilimsel çalışmaların çoğu EBK'ların kanserojen etkilerine, balıkların ve memelilerin üreme sistemlerine olan etkilerine odaklanmıştır (2).

Endokrin bozucular doğal ve sentetik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Doğal endokrin bozucular yarı ömürlerinin kısa olması sebebiyle vücutta ciddi yan etkiler göstermezken, sentetik endokrin bozucular yarı ömürlerinin uzun olması ve yüksek konsantrasyonlarda vücut sıvılarında birikmeleri ve bunların yanı sıra yağda çözünme özelliğine sahip olduklarından, yağ dokusu içerisinde depolanabilmeleri ve canlı sistemlerde uzun süre kalabilmeleri nedeniyle yüksek toksisiteye neden olmaktadır. Vücutta bu derece ciddi yan etkilere sebep olan sentetik endokrin bozuculara fetal dönemde maruz kalmak ise gelişim geriliği, mental retardasyon gibi daha ciddi sonuçlar doğurabilmektedir (2).

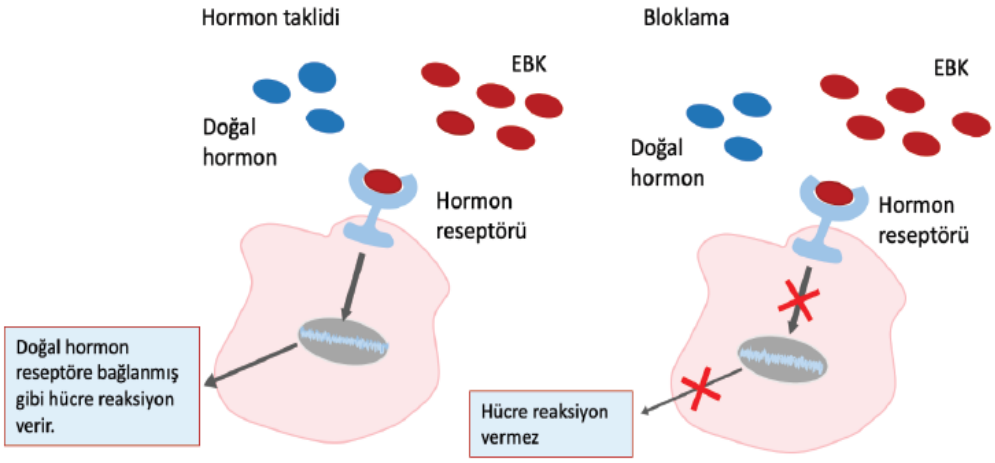
Hayvan deneyleri sonucunda EBK'ların mekanizmaları hakkında belli düzeyde bilgiye sahip olunsa da insan üzerine olan etkileri önem arz etmekte ve derinlemesine araştırma gerekmektedir. Günümüzde elde edilen bilgilere göre; yetişkinlerde görülen hastalıkların çoğunun fetal dönem kaynaklı olduğu düşünülmekte ancak bunların sebepleri tam olarak açıklanamamaktadır (2).

2.1.2. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları

Endokrin bozucu kimyasallar etkilerini farklı mekanizmalar üzerinden gösterir. Birçok EBK farklı yapıdaki (steroid, amino asit ve peptit/protein yapıda) hormonların reseptör dönüşümünü (turnover) değiştirerek, endojen hormon konsantrasyonunu etkileyerek ya da sinyal mekanizmalarını bozarak biyolojik sistemlerde etkilerini gösterirler (2). Bazı endokrin bozucular ise direkt gen ekspresyonunu etkileyerek biyolojik sistemlerde bozukluğa sebebiyet verir (3). Bunula birlikte endokrin bozucular gen ekspresyonunda kalıcı değişimlere de yol açabilir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, yaşamın erken dönemlerinde fitalat maruziyeti sonucu genlerde meydana gelen metilasyon reaksiyonlarının yaşamın ileriki dönemlerinde canlı sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği ve bu olumsuzlukların genetik geçişli olabileceği düşünülmektedir (3).

ABD Çevre Koruma Ajansı'na (EPA) göre hormon taklit edebilme özelliği olan EBK'lar, homeostazın devamından ve gelişim ile ilgili süreçlerin regülasyonundan sorumlu hormonların üretimine, salgılanmasına, taşınmasına, bağlanmasına, metabolizmasına ya da eliminasyonuna neden olabilen dışsal ajanlar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1). Dolayısıyla bu ekzojen kimyasallardan en fazla endokrin sistem etkilenir (4). İnsanlar ve hayvanlar EBK'lara günlük hayatta pek çok yol ile

maruz kalabilmektedir. Son yıllarda tekstil ürünlerinin üretiminde EBK'ların varlığı dikkat çekmektedir.



Şekil 2. 1: Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları

Soldaki hücrede EBK'lar hormonları taklit ederek hormon reseptörüne bağlanır ve hücrede sinyal iletimini başlatırlar. Sağdaki hücrede ise doğal hormon EBK'ların varlığı nedeniyle reseptörüne bağlanamaz ve doğal hormon etkisini gösteremez.

2.1.3. Endokrin bozucuların sağlık üzerine etkileri

Salgı bezleri ile kana verilen hormonlar hedef hücrelerde etkilerini gösterirler. Hormonlar, canlıların birçok metabolik olayını hücre içinde gerçekleştirilen kimyasal reaksiyonları, hücre membran transportunu, hücre farklılaşmasını, gelişim gibi fonksiyonları düzenlerken aynı zamanda periferden gelen uyarılara karşı da canlı sistemdeki birçok metabolik faaliyeti düzenlemekle yükümlüdür. Endokrin sistem beyinde bulunan hipofiz, hipotalamus ve çeşitli endokrin bezlerden oluşur (2).

Birçok düzenleyici göreve sahip olan endokrin sistem farklı hormonları çok düşük konsantrasyonlarda üretir ve kana salınmasını sağlar. Salınan bu hormonların etkileri saniyeler, günler, bazen haftalarca sürebilir. Hormonların endokrin bezlerden salınımı sırasında konsantrasyonlarında belirgin bir artış ya da azalışın meydana gelmesi ile

endokrin sistemde bozukluklar meydana gelebilir. Hormonlar etkilerini gösterebilmek için reseptörlerle kompleks oluşturur. Hormon reseptör etkileşiminin meydana gelmesinin ardından bir dizi kimyasal olay meydana gelir (2). Fakat bu sistemin bozulmasına sebebiyet verebilecek birçok kimyasal yapı da mevcuttur. Bunlar arasında günümüzde en çok bahsi geçen endokrin bozucular, fitalatlar, PAH'lar ve ağır metallerdir.

Endokrin bozucuların canlılar üzerindeki olumsuz etkileri genel olarak tiroid bezi ve üreme sistemi üzerinde meydana gelmektedir (5,6). Sentetik ve doğal olmak üzere günlük hayatımızda pek çok endokrin bozucuya maruz kalıyoruz. Bu kimyasallar kanser, gelişim bozukluğu, mental retardasyon, üreme fonksiyonunda bozukluk gibi birçok rahatsızlığa sebebiyet vermektedir. Özellikle fetal ve gelişim dönemlerinde bu endokrin bozuculara maruz kalmak daha ciddi sonuçlar doğurur (Şekil 2.2).

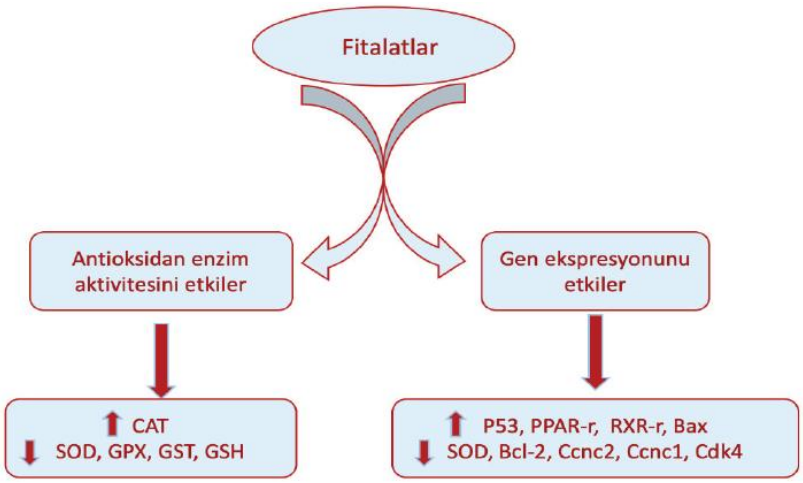


Şekil 2. 2: EBK'lere gelişim dönemlerinde maruz kalmış olan deney hayvanları ve insan çalışmalarında ortaya çıkan bozukluklar

Artan nüfus, teknolojinin hızla gelişmesi, hazır ve tek kullanımlık ürünlerin daha fazla kullanılmaya başlanmasıyla endokrin bozucular hayatımıza giderek daha fazla girmektedir. Bu kimyasallar günlük hayatımızda kullandığımız plastik şişeler, plastik torbalar, metal yiyecek ve içecek kutuları, oyuncaklar, kozmetik ürünler, tekstil ürünleri gibi birçok alanda karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanı sıra sanayii ve evsel atıklarda da hatırı sayılır düzeylerde EBK'lara rastlanmaktadır.

2.1.4. Endokrin bozucu kimyasalların tekstil endüstrisinde kullanımı

Endokrin bozucu kimyasallar yiyecek, içecek kapları gibi günlük kullanılan çeşitli plastik ürünlerde, fabrika ve evsel atıklarda bulunmasının yanı sıra tekstil ürünlerinde de yer alırlar. Endokrin bozucular sindirim, solunum ve deri yoluyla terden göç ederek insan vücuduna girebilmekte ve çeşitli metabolik bozukluklara, gelişim ve üremede defektlere sebebiyet verebilirler. Sentetik kimyasallar grubuna giren ve plastiklere şeffaflık, esneklik ve dayanıklılık kazandırmak amacı ile üretilen fitalatlar en dikkat çeken endokrin bozuculardan biridir. Dünya çapında yıllık ortalama 3 milyon ton fitalat işlendiği bilinmektedir (2,7). Fitalatlar polimerlere plastikleştirici olarak katılırlar ve bu yapılara kovalent olarak bağlanamadıkları için özelikle ısı etkisiyle farklı ürünlerin yüzeylerinden kolaylıkla göç edebilme özelliğindedir. Bu nedenle örneğin plastik şişelerde kullanılan fitalatlar kolaylıkla şişe içerisindeki sıvılara geçerek insan sağlığına zarar verir (8,9). (Şekil 2.3)



Şekil 2. 3: Fitalatlar gen ekspresyonu ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyerek toksisiteye sebep olurlar

Yarı ömürleri kısa olan fitalatlar monoesterlere ve glukronik konjugatlara bağlanarak idrarla atılır (10). Yapılan çalışmalarda fitalatların meydana getirdiği metabolitler anne sütü, amniyotik sıvı, insan tükürüğü gibi çeşitli biyolojik sıvılarda tespit edilmiştir (11). Pedersen ve Hartmann' ın (2004) yaptıkları çalışmaya göre tekstil sanayinde kullanılan kumaşların özelikle baskılı olan kısımlarında fitalat tayin edilmiş fakat bu fitalatların konsantrasyonları yapılan analizlerde baskının yerine göre değişiklik göstermiştir (2). Fitalat içeren tekstil ürünlerinin kullanımı süresince tüketicinin ürünleri yıkaması ile bu fitalatların sulara geçmesi sonucu çevre kirliliği oluşmaktadır. Yıkama ile atık sulara karışan fitalatlar kanalizasyon yoluyla nehir, göl ve deniz gibi doğal sulara karışarak canlı sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. (2,12).

2.2.Fitalat

2.2.1.Yapısı ve kullanım alanları

Fitalatlar veya fitalat esterleri (1,2-benzendikarboksilik asit) çeşitli tüketici ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılır. Yüksek molekül ağırlıklı fitalatlar, örneğin di-2-etilheksil fitalat (DEHP) ve bütil benzil fitalat (BBP), temel olarak döşeme ve boya gibi tüketici ürünlerinde ve esnek vinil üretiminde plastikleştirici olarak kullanılır. Düşük molekül ağırlıklı fitalatlar, örneğin dietil fitalat ve dibütil fitalat, parfüm ve kozmetik gibi kişisel bakım ürünlerinde, selüloz asetat için çözücü ve plastikleştiricilerde, boya ve bazı farmasötik ürünlerin bileşiminde kullanılır. Fitalatlar ve diğer kimyasallar arasındaki zayıf kimyasal bağlar (dipolar etkileşimler) nedeniyle, fitalatlar bağlı oldukları yüzeylerden çevreye nispeten daha kolay göç ederler (13).

Endokrin bozucu kimyasalların bir sınıfı olan fitalat esterleri (PAE'ler), özellikle endüstriyel ürünlerde karşımıza çıkar. Liu ve ark. (2019) günlük giysilerde PAE'lerin varlığını ve cilt teması yoluyla maruziyet riskini değerlendirmek için günlük giysilerde PAE konsantrasyonunu araştırmışlardır (14).

2.2.2. Biyolojik etkileri

İnsanlar genellikle oral yol, inhalasyon ve deri ile temas yoluyla fitalatlara maruz kalırlar. Bazı fitalatlar, daha kısa hamilelik süresi, kızlarda erken meme gelişimi ve menarş, erkekte sperm defektleri gibi üreme ile ilgili sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmişlerdir (13).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar BBP, DEHP ve DBP ile çocuklarda artan astım ve alerjik semptomlar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Sağlık sorunları nedeniyle, 1999'dan beri Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde fitalatların kullanımı birçok üründe yasaklanmıştır. Bununla birlikte, çeşitli tüketici ürünlerindeki

yaygınlığı göz önüne alındığında, fitalatlara maruz kalma kaçınılmazdır ve bu nedenle bu kirleticilere maruz kalınması, bunların potansiyel sağlık etkilerini araştırmak amaçlı yeni çalışmalara gereksinim duyulmasına neden olmuştur (13).

Avrupa Komisyonu'nun (EC) 2005/84/EC sayılı direktifi, çocuk ürünlerinde dibütil fitalat (DBP), bis (2-etil heksil) fitalat (DEHP) ve BBP' nin yasaklanmasını sağlamıştır. Bu bağlamda ABD'de çocuk bakım ürünleri ve çocuk oyuncaklarında toplam DEHP, DBP, BBP, diisononil fitalat (DINP), di-n-oktil fitalat (DNOP) ve diizodesil ftalat (DIDP) içeriğinin %0,1'i geçmesine müsaade edilmemektedir. Çin'de ise BBP'nin tolere edilebilir günlük alımı (TDI) 0,5 mg olarak düzenlenmiştir (13).

2.3. Fitalat Çeşitleri

2.3.1. Bütil benzil fitalat (BBP)

2.3.1.1. *Yapısı ve kullanım alanları*

Bir fitalat türevi olan BBP açık renkli bir kimyasaldır. Çoğunlukla gıda ambalajı, kozmetik, parfüm, suni deri, otomotiv kaplama, tekstil, vinil eldiven ve yapıştırıcı üretiminde katkı maddesi olarak kullanılır (15). İnsan sağlığına ve çevreye yönelik tehdit unsuru olmaları nedeniyle, bu kimyasallar birçok ülkede öncelikli kirleticiler olarak belirlenmiştir (15).

2.3.1.2. *Biyolojik etkileri*

Araştırmalar, fitalik asit esterlerine (PAE) maruz kalındığında üreme ve sinir sistemi dahil olmak üzere birçok sisteminin zarar göreceğini ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa sebep olabileceğini, çevre tahribatına neden olabileceğini ortaya koymuştur (15).

BBP' nin zebrabalığı üzerindeki toksik etkileri sonucunda süperoksit dismutaz (SOD), asetilkolin esteraz (AChE) ve katalaz (CAT) aktivitelerini önemli ölçüde inhibe ettiği

bildirilmiştir (15). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (IARC) göre, BBP' nin hayvanlar için 3. derece kanserojen olduğu açıklanmış ve sınıflandırılmıştır (16).

2.3.2. Di-etil fitalat (DEP)

2.3.2.1. *Yapısı ve kullanım alanları*

Fitalat ailesine dahil olan di-etil fitalat (DEP) açık renkli ve kokusuz bir kimyasaldır. Suda çözünmez. DEP, kısa zincirli ve düşük molekül ağırlıklı bir fitalat esteri olup pek çok üründe polimerin esnekliğini arttırmak için plastikleştirici olarak endüstride yaygın olarak kullanılır (17).

Bu kadar çok sayıda uygulamaya rağmen, düşük molekül ağırlıklı PAE'lerin kullanımındaki önemli sorun, bulundukları materyale kovalent bağlı olmamalarıdır. Bu nedenle doğaya kolaylıkla geçiş yaparlar (18). Çeşitli çevresel matrislerde de (toprak, yüzey suyu, içme suyu, kanalizasyon atıkları, tortular ve iç mekân hava ve toz partikülleri) DEP kalıntısı tespit edilmiştir (19). Bu nedenle DEP, kalıcı, hemen hemen her yerde bulunan çevresel kirletici olarak sınıflandırılmıştır.

2.3.2.2. *Biyolojik etkileri*

Api (2001) yaptığı çalışmada, kozmetik ürünlerden potansiyel maruziyetin günde ortalama 3.73 μM DEP olduğunu tespit etmiştir (20). Ayrıca, DEP'in çeşitli su kaynaklarında bulunduğu ve su ürünlerinde yaygın etkilere neden olduğu bildirilmiştir (17,21,22).

Çok sayıda balık türü üzerinde yapılan çalışmada, DEP maruziyetinin ciddi endokrin sistem harabiyetine (23), oksidatif strese (17), üreme işlev bozukluğuna (24), immünotoksisiteye (25), hepatotoksisiteye (26), embriyotoksisiteye (27), hematotoksisiteye (28), dokularda histopatolojik lezyonlara (29), ve nörotoksisiteye neden olduğunu bildirilmiştir (23). Oksidatif stresin balıklarda DEP kaynaklı

toksisitenin temel olduğu düşünülmektedir (30). Oksidatif strese bağlı kayıplarla mücadele amacıyla balık yemine çeşitli sentetik antioksidanlar eklenmiştir; ancak bu antioksidanların balık kaslarındaki biyobirikimleri hem balık hem de tüketici sağlığı için ciddi tehditler oluşturmaktadır (31).

2.3.3. Di-izononil fitalat (DINP)

2.3.3.1. Yapısı ve kullanım alanları

DINP, yüksek moleküler ağırlığa ve uzun yarılanma ömrüne sahip bir kimyasaldır (32). PAE' ler oldukça toksik olduğundan, ABD EPA, 1980'lerde DEHP, DBP, DOP, DEP, DMP ve BBP dâhil olmak üzere altı fitalat esterini öncelikli kirleticiler olarak sınıflandırmıştır. Bununla birlikte, düzenleyici önlemlerin uygulanması nedeniyle son yıllarda DEHP kullanımının yerini yavaş yavaş DINP ve DIDP almıştır (33).

2.3.3.2. Biyolojik etkileri

DINP organizmalar için kronik toksisiteye neden olabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda DINP maruziyetinin karaciğeri etkilediği ve hepatik nekroz ve dejenerasyona yol açtığı belirtilmiştir (34,35). Yetişkin dişi zebrabalığı üzerinde yapılan bir araştırma, 3 haftalık DINP maruziyetinden sonra iştah sinyallerinin yukarı regülasyonunu, hepatik steatoz ve lipid metabolizmasının düzensizliğini ortaya çıkardığı bildirilmiştir (36). Ayrıca, Forner-Piquer ve ark. (2018), yetişkin erkek çipura balıklarında toksikolojik testler yapmış ve DINP' nin karaciğer morfolojisini ve biyokimyasal belirteç konsantrasyonlarını ve endokannabinoid seviyelerini değiştirdiğini bildirmişlerdir (37).

2.3.4. Dimetoksietil fitalat (DMEP)

2.3.4.1. Yapısı ve kullanım alanları

DMEP bir endokrin bozucu kimyasaldır. Literatürde DMEP ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. DMEP özellikle selüloz asetat için iyi bir plastikleştirici ve bir çözücüdür. Oyuncaklarda, giysilerde, bebek bezlerinde ve ev tozunda tespit edilmiştir (38,39).

2.3.4.2. Biyolojik etkileri

Yapılan çalışmalar DMEP' in erkek sıçanlarda üremeyi olumsuz etkilediği, testis kütlesini ve sperm sayısını azalttığını bildirmektedir. Nörotoksisite çalışmasında DMEP'in beyinde oksidatif stresi arttırdığını ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir (40).

2.4. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH)

2.4.1.Yapısı ve kullanım alanları

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, düz zincir veya açılı şeklinde bulunan iki veya daha fazla benzen halkası yapısına sahip moleküllerdir. Mikroorganizmaların ve alglerin biyosentezinden, bakterilerin bitkiler ve hayvanlar üzerindeki biyokimyasal etkileri sonucu, volkanik faaliyetler, orman yangınları gibi doğal olaylar neticesinde ortaya çıkabileceği gibi, kimyasal reaksiyonlar sırasında da yan ürün olarak sıkça karşılaşılmaktadır. Sanayide üretilen ürünlerde PAH'larla karşılaştırıldığında, doğal kaynaklardan yayılan toplam PAH miktarı son derece küçüktür, hatta ihmal edilebilir düzeydedir ve PAH'ların bu kısmı çoğunlukla çevrenin kendi kendini temizleme süreci ile elimine edilir (41). Bugüne kadar yüzlerce PAH tanımlanmıştır (42). PAH' lar, hem doğal hem de antropojenik süreçte karbonlu malzemelerin tamamlanmamış yanma reaksiyonlarının yan ürünleri olarak meydana gelir. Çevrede hemen her yerde

bulunurlar. Soluma ve yutma yoluyla insanlarda maruziyete yol açarlar (43). Tekstil endüstrisi atık sularında bulunan maddelerin çoğu doğal, inorganik veya sentetik kaynaklardan üretilebilen boyalardır. Hâlihazırda sentetik boyalar, yüksek miktarlarda ve düşük maliyetle üretilebilmesi nedeniyle daha çok kullanılmaktadır (44). Tekstil ürünlerinde bulunan PAH'lar yaygın olarak kullanılan boyaların içeriğinde de bulunur. Tekstil boyama çamuru (TBÇ), tekstil atık su arıtma istasyonlarının en önemli yan ürünüdür ve ikincil çevre kirliliğinin ana kaynağıdır. TBÇ' de PAH'lar, dioksinler, anilinler, mono-benzen bileşiği ve ağır metaller gibi birçok kirletici vardır. Bunlar arasında, PAH'lar toksik, kanserojen ve mutasyona neden olan öncelikli kirleticilerdir. Ning ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, TBÇ katı fazındaki PAH'ların çoğunluğunun, antrasen (Ant), fenantren ve floranten gibi üç ya da dört halkalı PAH olduğunu göstermişlerdir (45).

2.4.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri

Soluma, yutma ve dermal kontakt yoluyla maruz kalınan PAH'lar vücutta kolayca emilebilir, metabolize edilir ve idrarla atılır. PAH'ların toksik etkilerinin keşfedilmesi son yıllarda halk sağlığı için büyük endişe kaynağı olmuştur. Mutajenik ve kanserojenik etkilerine ek olarak, son yıllarda PAH' lara maruz kalmanın solunum yolu hastalıkları ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kapalı ortamda ise PAH'lara maruz kalma sigara içimi ile belirgin şekilde artar. Yüksek sıcaklıkta gıda işleme sırasında oluşan pişirme dumanlarındaki PAH'lar, akciğer vasıtasıyla insan vücuduna girer (44). PAH'lar, in vitro çalışmalarda endokrin bozucu bileşikler olarak tanımlanmışlardır. Gebe kadınlar ve gelişmekte olan fetüsleri, çevresel kirleticilere karşı oldukça duyarlıdır (46).

PAH'ların varlığı birçok kıyafet, ayakkabı, takı, süs eşyasında gösterilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar kıyafetlerde bulunan PAH'ların ter yoluyla vücuda göç edebildiğini göstermektedir. Liu Yubin ve ark. (2019) farklı giysi materyalleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda kıyafetlerde bulunan farklı PAH türlerinin ter yoluyla deri içine migrasyonlarının mümkün olduğunu göstermiştir. Yeni kıyafetlere oranla yıkanmış kıyafetlerden; yetişkin kıyafetlerine oranla bebek kıyafetlerinden tere daha fazla PAH migrasyonu olduğunu bildirilmiştir (14). Bu durum giysilerin yıkanmasına bağlı olarak PAH miktarının tere geçme oranını arttırdığını düşündürmektedir. Zaman içerisinde ürünler yıkandıkça PAH'lara daha fazla maruz kalınması kaçınılmazdır (14).

2.5. PAH Çeşitleri

2.5.1. Naftalin

2.5.1.1. Yapısı ve kullanım alanları

Naftalin (CAS-Nr. 91-20-3), oda sıcaklığında buharlaşan, karakteristik katran benzeri bir kokuya sahip olan ve 0.44 mg/m3 (0.084 ppm) kadar düşük konsantrasyonlarda kokusu hissedilebilen beyaz kristal bir maddedir. Naftalin esas olarak fitalik anhidrid sentezi için kullanılır. Bununla birlikte, aşındırıcıların imalatında gözenek oluşturucu bir ajan olarak naftalinin kullanımı önemli bir niş uygulamadır. Naftalin ayrıca tütün dumanının bir bileşenidir ve katran içeren yapı ürünlerinde bulunur (47).

2.5.1.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri

Naftalin'e işyerinde veya çevre yoluyla maruz kalma, öncelikle soluma yoluyla gerçekleşir. Naftalin vücuda alınır alınmaz, sitokrom P450 (CYP) monooksijenazlar tarafından 1- ve 2-naftol'e metabolize edilir (47).

Naftalin toksisitesi genellikle aniden ortaya çıkar ve yönetilmesi zor olan akut hemoliz, methemoglobinemi, böbrek yetmezliği, solunum depresyonu ve akut beyin disfonksiyonuna yol açar. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) eksikliği olan hastalarda toksisite daha belirgindir ve yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (48).

Naftalinin, nörojenik inflamasyonu indükleyebildiği bilinmektedir. Trigeminal sinir uçları, immün hücre yanıtlarını düzenleyen nöropeptidleri (örn., Madde P) serbestleştirdiğinden ve ayrıca inflamatuar aracılara yanıt verebilen sitokin reseptörleri (örn., IL-1β, tnf-α reseptörleri) barındırdığından, naftaline uzun süreli maruz kalma bağışıklık sisteminden gelen tepkileri de tetikleyebilir (47).

Naftalin Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından 2B grubunda kategorize edilmiştir (IARC2002). Naftalinin inhalasyonundan sonra kemirgenlerin burun ve akciğerlerinde tümörlere neden olduğu belirtilmektedir. Naftalin gibi sitotoksik ajanlar ve kronik inflamatuar reaksiyonlar, sıçanların ve farelerin solunum yollarında kansinojeneze sebep olabilir. Kemirgenlerde naftalinin neden olduğu tümörlerin önemi, önemli anatomik ve fizyolojik farklılıklar nedeniyle insanlarda göz ardı edilse de, naftalinin kemirgenlerde bu tümörlere neden olduğu temel mekanizmanın insanlarda da geçerli olduğu belirtilmektedir (47).

2.5.2. Fenantren (Phenanthrene)

2.5.2.1. Yapısı ve kullanım alanları

Üç halkaya sahip olan fenantren ($C_{14}H_{10}$) Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı'nın (USEPA) öncelikli dikkat edilmesi gereken PAH'ları arasındadır. Renksiz, kristalize bir yapıya sahiptir (49). Yapılan çalışmalarda, havada, suda ve toprakta fenantren tayin

edilmiştir. Fenantrenin birçok toksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (50). Yüksek sıcaklıklarda pişirme, otomobil egzoz emisyonları, fosil yakıtların kullanımı, üretim ve hammadde işleme faaliyetleri PAH üretimiyle sonuçlanır. PAH'lar, yağış ve çökelme gibi doğal olaylar yoluyla toprağı ve su kaynaklarını kirletir ve sonunda besin zinciri yoluyla insan vücuduna girer (50).

2.5.2.2. *Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri*

Çocukların erken dönem gelişimlerinde fenantren maruziyetinin olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda erken çocukluk döneminde fenantrene maruziyet sonucu nörolojik hasarların meydana geldiği ifade edilmiştir.

J. Xie ve ark (2021) yaptıkları çalışmada farklı dozlarda fenantrene maruz bıraktıkları farelerde sosyal davranışlarda gerileme, reaktif oksijen türlerinde artış, glutatyon (GSH) seviyesinde azalma, tnf-alfa ve otizm ile ilişkili bazı genlerin (shank3, beclin1) ekspresyonlarında değişimlerin gözlendiği bildirilmiştir. Fenantrene mazuriyetin oksidatif strese sebebiyet verdiği bilinmektedir (51). J. Xie ve ark (2021) göre, farelerde erken beyin gelişimi sırasında belirli bir fenantren konsantrasyonuna maruz kalmak beyinde oksidatif hasara neden olarak otizm benzeri davranışlara sebep olmuştur. Fenantren maruziyeti mTOR yolunu aktive edebilir ve oksidatif stresi arttırır. MTOR yolunu ve oksidatif stresi inhibe etmek, otizm benzeri davranışı azaltabilir. Suda yaşayan hayvanlar üzerinde yapılan birkaç çalışma, fenantrenin büyüme ve gelişimi etkileyebileceğini ileri sürmektedir. Hayvan deneylerinde, örneğin zebra balıklarının PAH'lara uzun süre maruz kalmasının beyinde bulunan monoamin konsatrayonunu anlamlı düzeyde düşürdüğü gösterilmiştir (52).

2.5.3. Floranten (FLU)

2.5.3.1. Yapısı ve kullanım alanları

Floranten (FLU) dört halkalı yapıya sahip bir PAH türüdür. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı'nın (USEPA) öncelikli dikkat edilmesi gereken PAH'ları arasındadır (49). FLU, denetimlerin sıklıkla yapıldığı Japonya dâhil olmak üzere birçok ülkede oldukça sık rastlanılan tipik bir PAH örneğidir. Esas olarak otomobil egzozundan çevreye yayılır (53).

2.5.3.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri

FLU, oldukça kanserojen olan ve parçalanması zor olan tipik tetrasiklik polisiklik aromatik hidrokarbondur. FLU'nun mikrobiyal aktivite üzerinde güçlü inhibitör etkileri olduğu ve daha yüksek organizmalar için etkili mutajenler ve kanserojenler olduğu bildirilmiştir (42). Ayrıca FLU sitotoksisitesi ve fitotoksisitesi de gösterilmiştir. Bu nedenle, FLU çevresel risk oluşturabilecek bir PAH'tır (42).

2.5.4.Piren

2.5.4.1. Yapısı ve kullanım alanları

Dört benzen halkasından oluşan PAH sınıfına ait bir kimyasal maddedir. Piren pirolitik reksiyonlar soncunda meydana gelmektedir. Asetilen ve hidrojenin pirolizi sonucu ortaya çıkar. İlk olarak sentetik boya endüstrisinde kullanılmıştır. Son 50 yılda florosan özellikleri sebebiyle suda çözünür polimerlerin tespitinde kullanılmaktadır (54).

2.5.3.2. Canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri

Piren ksenobiyotik metobolizmasında bulunan enzimlerin aktivitesinde bozukluklara sebebiyet verir. Jin-Kui Ma ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada insan Hep-G2 hücrelerinde sitotoksik etkiye ve oksidatif etkiye sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun sebebinin, antioksidan ve detoksifikasyon mekanizmalarında etkili olan enzimlerin düzenlenmesindeki bozulmalardan kaynaklandığını belirtmişlerdir (55).

2.6.Ağır Metaller

2.6.1.Yapısı

Ağır metaller yüksek atom ağırlığına ve metalik özelliğe sahip olmalarının yanı sıra elektriği ve ısıyı iletebilen, doğada ve birçok materyalde sıkça rastlanılan elementlerdir. Endüstriyel tarımın ve teknolojinin her geçen gün gelişmesiyle beraber ağır metallerin günlük hayatta kullanımı ve bununla beraber bu metallere maruziyet oranı da artış göstermektedir. Bu durum hava, su, toprak ve besinlerin kirlenmesi gibi birçok olumsuz sonucu da beraberinde getirir.

Metaller elektron ve proton transferi sonucu farklı metal formlarına dönüşebilmeleri nedeniyle yüksek oranda toksik etkiye sahiptir. Bu toksik etkiler yaşa, cinsiyete, yaşam koşullarına, doza ve genetik yatkınlığa göre değişiklik gösterir. Yetişkinlere oranla çocuklarda ağır metal toksisitesi daha ağır etkilere neden olur. Bunun sebebi; çocuklarda gastrointestinal sistemdeki emilim mekanizmasının yetişkinlere oranla daha hızlı olmasıdır.

Ağır metal maruziyeti sonucu biyolojik sistemlerde birçok olumsuz etki meydana gelir. Oksidatif stres, enzimlerin aktivitelerinin inhibe edilmesi, DNA hasarının oluşumu, gen ekspresyonlarındaki değişimler bu olumsuz etkilerden sadece birkaçıdır.

Kurşun (Pb), Arsenik (As) ve Kadmiyum (Cd) gibi ağır metaller de biyolojik sistemlerde toksisiteye sebebiyet vermektedir. Amerikan Çevre Koruma Ajansı' nın verilerine göre bu ağır metaller karsinojen etkiye sahiptir ve çok düşük oranlarda bile yüksek toksisiteye neden olduğu ve hatta ölüme sebebiyet verdiği görülmektedir (56). Ağır metallerin vücut sıvılarındaki transportunda etkili olan birçok protein vardır. Albümin, hemoglobin, metallotiyoneinler, seruloplazmin, transferrin bu proteinlerden birkaçıdır. Bu proteinler genel olarak sistein amino asidi ve tiyol (-SH) grupları içerir. Tiyol grupları metallerin proteinlere bağlanmasında özellikle etkilidir. Ağır metaller bu gruplara bağlanmalarının ardından hızlıca dokulara yayılır ve çoğu dokuda birikim gösterir. İçme suları, hava, toprağın ağır metallere maruziyeti sonucu besinlere bu ağır metaller kolaylıkla geçer ve beslenme ile canlı vücuduna dâhil olurlar. Bunun yanı sıra kullanılan kıyafetler, ayakkabılar, çeşitli aksesuarlar, oyuncaklar, ev eşyaları gibi günlük hayatta devamlı olarak temas ettiğimiz materyallerin üretiminde de birçok ağır metal kullanılmaktadır. Yaşamımızın birçok alanında maruz kaldığımız ağır metallerin vücudumuza geçişi, solunum veya ter yolu ile olur. Bu geçişler sonucunda biyolojik sistemlerimizde birçok defekt gelişmekte ve bununla beraber çeşitli hastalıklar görülür (56).

2.7. Tekstil Sanayinde Sıklıkla Kullanılan Ağır Metaller:

2.7.1. Kurşun (Pb)

Canlıların yaşamını sürdürdüğü neredeyse tüm alanlarda kurşun elementine rastlamak mümkündür. Kurşuna maruziyet çoğunlukla doğal kaynaklar, endüstriyel kaynaklar ve petrol kullanan motorlu taşıtlar ile olur. Günümüzde yasal düzenlemelerle beraber geçmiş yıllara oranla kurşun maruziyetinde azalmalar görülmektedir. Kurşun ağırlıklı

olarak pil ve akülerde (%71), su borusu üretiminde, pirinç ve bronz alaşımında stabilizatör olarak kullanılan polivinil klorürün (PVC) içeriğinde bulunur (56).

Canlı organizmaya girdikten sonra kurşunun kandaki konsantrasyonu hızlıca artar ve önce kemikler ve dişlerde daha sonra da yumuşak dokularda birikir. Toksik etkisini 0.4 µmol/L üzerine çıktığında merkezi ve periferal sinir sisteminde, endokrin ve üreme sisteminde, böbrekler ve immün sistem üzerinde gösterir. Gebelik ya da laktasyon döneminde kurşuna maruz kalınması ve kemiklere mobilizasyonu sonucu fetüse ve annenin sütü ile de bebeğe geçer. Kurşun kan, kemik ve yumuşak dokularda uzun süre kalabilir. Bu nedenle kurşun maruziyetinden uzun süre sonra bile kanda tayini mümkündür (56).

2.7.1.1. Emilimi ve atılımı

Kurşun düşük erime ve kaynama noktasına sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle solunum yoluyla kolaylıkla inhale edilebilir. Kurşunun inhalasyonu sonucu kurşun partikülleri akciğerlerde tutulum gösterir. Bu tutulum sonrası akciğerlerde yüksek miktarda mukus oluşumu meydana gelir ve ardından gastrointestinal sistem aracılığıyla emilerek kana geçer. İnsanlarda kurşun maruziyeti sonrası kalsiyum ve fosfatça zengin içeriğe sahip olan süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi önerilir. Bunun nedeni kalsiyum ve fosfatın gastrointestinal sistem ile kurşun emilimini azaltmasıdır. Kalsiyum ve fosfatın yanı sıra demir, magnezyum ve alkol de kurşunun emilimini azaltırken, D vitamini ve çinko kurşunun gastrointestinal sistem ile emilimini arttırır (56).

Gastrointestinal sistem ile emilerek kana geçen kurşun büyük oranda eritrositlerde düşük oranda (%1) da plazmada bulunur. Kan plazmasındaki kurşun başta karaciğer ve böbrekler olmak üzere çeşitli organlarda birikir. Bunun yanı sıra kan beyin bariyerini de belli bir orana kadar geçebilen kurşun sinir sistemine de hasar verebilir. Emilen kurşunun yaklaşık %90' ı iskelette depolanır. İskelette birikiminin yanında

dişlerde de kurşun birikimi görülür. Dişlerdeki kurşun düzeyleri ölçülerek vücuttaki kurşunun miktarının takibi yapılabilir (56).

Kurşunun vücuttan atılımı büyük oranda idrar ve dışkı ile olur. İdrarla atılımında böbreklerdeki glomerular filtrasyon etkili iken, dışkı ile atılımında kurşunun glutatyon ile konjugasyonu ve safra tuzları gereklidir. Ayrıca atılım düşük oranda ter, tükürük, saç ve tırnakla da olabilir.

2.7.1.2. Toksik etki

Kurşun maruziyeti doza ve süreye göre toksisite gösterir. Bu toksik etki sonucu enzim inhibisyonuna bağlı gelişen ağır patolojiler ve hatta ölüm görülebilir. Çocuklarda yetişkinlere kıyasla merkezi sinir sisteminde kurşun toksisitesi daha belirgin görülür. Yetişkinlerde ise toksisite sonucu kronik nefropati ve periferal nöropati görülebilir.

Kurşunun enzim inhibisyonu sonucu toksisiteye neden olduğu en önemli metabolik yollardan biri Hem sentezidir. Hem sentezinde yer alan aminolevulinik asit (ALA) dehidratazı inhibe ederek Hem sentezini inhibe eder ve ALA birikimine sebep olur. ALA molekülünün birikimi sonucu nörotoksisitenin de geliştiği bilinmektedir. Hem sentezinde yol açtığı bu defekt nedeniyle kurşun anemiye neden olur. Kurşun toksisitesinin neden olduğu bir başka durum ise Na-K ATPaz pompasının etkili bir biçimde çalışmasının engellemesi sonucu meydana gelir. Bu pompanın aktivitesini yitirmesi sonucu membran proteinlerinin yapısı bozulur ve hemoliz gelişir. Hemoliz sonucu eritrositlerin yaşam süresi kısalır. Kurşun toksisitesi nörotransmitterlerin salınımını da bozar. Bunu kalsiyumun depo edildiği endoplazmik retikulum ve mitokondrinin çalışma mekanizmasını etkileyerek yapar. Bu organellerde meydana gelen hasarlar sonucu nörotransmiterlerin salınımı bozulur, dopaminerjik ve glutaminerjik nöronlarda defektler gözlenir (56).

2.7.2. Arsenik (As)

Arsenik, doğada gaz, organik ve inorganik formlarda bulunur. Çeşitli balık türlerinde ve kabuklu hayvanlarda arseniğin organik formu yüksek düzeylerde tespit edilmiştir. Arseniğin inorganik formu ise su, yiyecek, içecek ve bazı ilaçlarda bulunmaktadır. Arsenik maruziyeti genellikle boya, cam ve kimya sanayinde, pestisit üretiminde görülür. Arsenik birikimi genellikle karaciğer, dalak, akciğer, böbrekler, deri, saç ve tırnaklarda olur.

2.7.2.1. Emilimi ve Atılımı

Arseniğin deniz ürünlerinde bulunan organik formu ile yiyecek, içecek, ilaçlarda bulunan , +3 ve +5 değerlikli inorganik formu %70-90 oranında gastrointestinal sistem tarafından emilir. Arsenik metil vericisi olarak S-adenozilmetiyonin (SAM) kullanan metiltransferazlar tarafından, kolaylıkla emilebilen, dimetilarsenik asit (DMA) türevlerine dönüştürülür. Oral ve deri yoluyla da emilimi mümkündür. Büyük oranda metilasyon ile metabolize olan arsenik başlıca idrarla atılır (56).

Yapılan literatürde arsenik ve metabolitleri eritrositlerdeki hemoglobine sıkıca bağlanabilmekle beraber, insan kadavrasında yapılan çalışmalarda saç, deri, tırnak, diş ve kemikte yüksek oranda arsenik kalıntılarına rastlanmıştır. Normal şartlarda arsenik ya da metabolitleri hızlıca kandan temizlenir. Arsenik atılımı büyük oranda böbrekler ile sağlanır. Bunun yanı sıra feçes ve ter yolu ile de küçük bir kısmının atılımı gerçekleşir (56).

2.7.2.2.Toksik etkisi

Arsenik toksisitesi, doz, yaş, cinsiyet, beslenme gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Yüksek dozda arsenik maruziyeti ölüme sebebiyet verir. Akut toksisite belirtileri genellikle kardiyak aritmi, bulantı, kusma, diyare, nazal mukozal irritasyon iken, kronik belirtilerde ise dermatit, ensefelopati, nöropatik, nörit, uyuşukluk, anemi, trombositemi, lökositüri gibi semptomlar görülür (56). Arseniğin +3 değerlikli formu +5 değerlikli formuna göre daha toksiktir. Arsenik, proteinlerin içerdiği tiyol (-SH) gruplarına bağlanarak çok sayıda enzimin aktivitesini bozar. Arsenik piruvat dehidrojenaz enziminin koenzimi olan lipoik aside yüksek afinite ile bağlanma özelliğine sahiptir. Lipoik aside arsenik bağlanması sonucu bu enzimin katalizlediği reaksiyon olan piruvatın asetil KoA' ya dönüşümü yavaşlar ve glukoneojenez yolağı inhibe olur. Arsenik, fosfat ile kimyasal benzerliği nedeniyle fosfatla yer değiştirebilme özelliğine de sahiptir. Bu özelliği nedeniyle fosforilasyon reaksiyonlarına dahil olur. ADP ile reaksiyona girmek için fosfatla yarışır ve bunun sonucunda ATP yerine ADP-arsenat kompleksi meydana gelir. Arsenik solunum mekanizmasında inhibisyona sebebiyet vererek hücre ölümlerinin primer nedenlerinden biri olmuştur. Bu etkiyi solunum mekanizmasında görevli mitokondriyal enzimlerin ve bazı proteinlerin –SH gruplarına bağlanarak yapar. Bu bağlanma sonucu enzimler inhibe olur ve oksidatif fosforilasyon mekanizması bozulur. Arsenik farklı formları ile ileri derecede toksik olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. Böylelikle hücre bazında toksisite görülür. Arseniğin DNA düzeyinde meydana getirdiği oksidatif stres, apoptoz, nekroz ve karsinojenez ile yakından ilişkilidir (56).

2.7.3. Kadmiyum (Cd)

Ağır metaller sınıfına ait olan kadmiyum çelik üzerine kaplamada, boya sanayinde, nikel-kadmiyum içerikli pillerde ve plastik yapımında kullanılmaktadır. Fosil yakıtların kullanımı, endüstriyel atıklar, hayvan gübreleri ve antropojenik kaynakların kullanımı sonucu kadmiyum toksisitesi gelişir. İnsanların kadmiyuma maruziyeti genellikle yiyecek ve içeceklerden kaynaklanmaktadır. Bunların yanı sıra tekstil endüstrisinde kullanılan boyaları da, takı ve aksesuar ürünlerinde de kadmiyuma rastlanmaktadır (57–59).

Sigara kullanımı da kadmiyum maruziyetine neden olur. Yarı ömrü çok uzun olması nedeniyle maruziyetten uzun süre sonra bile bazı biyolojik materyallerde (tırnak, saç gibi) yapılan analizler sonucu kadmiyuma rastlamak mümkündür. Kadmiyum özellikle böbrek, karaciğer ve kas dokularında birikim gösterir (56).

2.7.3.1*. Emilimi ve Atılımı*

Kadmiyum emilimi demir depolarına bağlı olarak değişim gösterir. Eritrositlerde duodenal metal taşıyıcısı (DMT) aracılığıyla kadmiyum hücre içine taşınır, ardından gastrointestinal sistemde metallotiyoneine bağlanarak emilimi sağlanır. Kadmiyum ayrıca glutatyon, sistein ve albumine bağlanarak da kanda taşınabilir. Böylelikle farklı dokulara dağılır. Bunun yanı sıra kadmiyum plasentaya da geçiş yapar. Embriyo ve fetüsün gelişimini etkiler. Atılımı idrar, feçes ve ter ile olur (56).

2.7.3.2. *Toksik etkisi*

Kadmiyum vücuda sindirim, solunum ve deri yoluyla girer. Yiyeceklerle vücuda alınması sonrası akut gastrointestinal şikâyetler, diyare ve kusma gibi semptomlar gelişir. Solunum yolu ile maruziyet sonucu ise akciğerler ile ilgili birçok hastalık (pnömoni, obstrüktif akciğer hastalığı, akciğer kanseri gibi) gelişebilir. Kronik

kadmiyum maruziyeti sonucunda ise nefes darlığı, pulmoner disfonksiyon, renal tübüler disfonksiyonlar gözlenmiştir. Kronik toksisite akut toksisiteye oranla daha sık görülür. Mesleki nedenlerle kadmiyuma maruz kalan bireylerde kanser riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı kadmiyumu birinci sınıf kanserojen olarak tanımlar. Kadmiyum toksisitesinin kalsiyum metabolizması ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Toksisite sonrası gelişen osteomalazide D vitamini takviyesi yapılmalıdır (56).

Nakamura ve ark. (2012) deney hayvanları ile yaptıkları çalışmada, $CdCl_2$ çiftleşmenin 3 hafta öncesinden itibaren uygulanmış laktasyonun dördüncü haftasına kadar her hafta arka arkaya 6 gün mide tüpü ile günlük olarak verilmiş ve gebe sıçanların laktasyonun dördüncü haftasında sakrifiye edilmesinin ardından yapılan analizlerde plasenta ve uterusta kadmiyum düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra yeni doğan sıçanların da böbrek ve karaciğerlerinde Cd konsantrasyonlarının yüksek olduğu, tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kadmiyumun taşınmasında görevli olan metallotiyonein (MT) proteinine bağlı olmayan serbest kadmiyumun anneden plasenta ve fetüse geçebildiği MT-Cd kompleksi oluştuğunda ise sınırlı olarak Cd' nin plasenta ve fetüse geçişinin engellenebildiği görülmüştür (60).

2.8. Tekstil Ürünlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Tüketici ürünlerinin imalatında, özelikle en çok kullanılan hammadde olan kumaşın üretilmesinden son ürün haline gelişine kadar geçen süreçte, ürünler birçok kimyasal işleme tabi tutulur. Bu kimyasal işlemler boyama, baskı gibi ürünün tasarımı ile ilgili adımlar olmakla birlikte bazen de su geçirmezlik, geç alev alma gibi ürüne ek bir özellik sağlamak amacı ile yapılan apre uygulamalarıdır. Zaman içerisinde yapılan

bilimsel araştırmalar sonucunda kullanılan bu kimyasalların bazılarının insan ve çevre sağlığına zararlı oldukları tespit edilmiştir.

2.8.1. Tekstil ürünlerinde kullanılan kimyasal maddeler

2.8.1.1. Hammadde

Tüketici ürünlerinde kullanılan temel madde kumaştır. Kumaş üretiminde kullanılan iplik ve iplik eldesinde kullanılan elyaf, elde ediliş yöntemine göre doğal ya da sentetik elyaf olarak tutulur. Doğal elyaflar, üretim sırasında kullanılan kimyasallardan dolayı risk taşımaktadır. Örneğin pamuk üretiminde kullanılan pestisit ya da herbisitler son kullanıcıya kadar ulaşır ise sağlık sorunlarına sebep olabilir. Üretimde kullanılan sudan ya da topraktan ağır metallerin geçme riski de bulunmaktadır. Kumaş üretiminde son yıllarda kullanımı giderek artan diğer elyaf türü de sentetik elyaf ailesine ait olan polyesterdir. Kimyasal sentez yolu ile üretilen polyester gibi sentetik elyafların üretimi sırasında kullanılan kimyasallar ve hammaddeler farklı riskler taşır. PAH grubu kimyasalların yan ürün olarak ortaya çıkması da bu süreçte mümkündür (2,12,45).

2.1.8.2.Boyama

Boyama işlemi sırasında kullanılan boyar madenin kendisinden gelen riskler bulunmaktadır. Azo boyar madde kaynaklı arilaminlerin insan sağlığına zararları konusunda kanıtlanmış çalışmalar mevcuttur (61). Arilamin salınımı yapan azo boyar maddeler ülkemizde 1995 yılında yasaklanmıştır. Boyarmaddeler ayrıca kurşun, civa, bakır, çinko gibi metalleri içerir. Boyama verimini arttırmak amacı ile klorlu organik taşıyıcılar (COC) gibi farklı kimyasallar da kullanılır. Boyama sonrasında kumaş üstündeki ölü boyaları almak adına yapılan yıkama çalışmalarında yardımcı kimyasal olarak kullanılan alkilfenoller (AP) ve alkilfenol etoksilatlar (APEO)grupları, özelikle çevre kirliliğine sebep olur (60).

2.8.1.3. Baskı

Ürünlerde, özellikle çocuk ürünlerinde çokça kullanılan ve farklı renkler içeren baskıların yapımı aşamasında farklı kimyasallar kullanılır. Baskı için kullanılan karışım boyar madde, pat ve bağlayıcı içerir. Baskı türüne göre ek kimyasallar ve/veya malzemeler de kullanılmaktadır. Kumaşlarda olduğu gibi kanserojonik, alerjenik boyar madde, ağır metal gibi riskler baskı için kullanılan boyar maddeden gelebilir. Baskının kumaşa sabitlenmesi için kullanılan yardımcı kimyasallar olan pat ve binder gibi malzemelerden ise polimerik yapıda olduklarından fitalat PAH riski taşımaktadır. Bazı baskılarda kullanılan PVC kaplama veya payet gibi ek malzemeler fitalat ve PAH bulunma riskini daha da arttırmaktadır (12).

2.8.1.4*. Apre uygulamaları*

Ürünlere ek özelikler kazandırmak için yapılan uygulamalara apre denir. Kumaşa daha yumuşak bir doku vermek amacı ile farklı fırçalar ile yapılan fiziksel işlemler olduğu gibi kimyasal eklenerek yapılan apreler de mevcuttur. Su geçirgenliğini azaltıcı, alev almasını geciktirici, anti bakteriyel özellik katıcı gibi farklı apre çeşitleri mevcuttur. Bu kimyasallar da kendi grupları içerisinde farklı riskler taşımaktadır.

2.8.2. Güvensiz ürün

Dünyada ve ülkemizde satışa sunulacak ürünlerin ithalatı sırasında veya belirli aralıklar ile yapılan piyasaya gözetimi yolu ile bazı kimyasalların denetimleri yapılmaktadır. Otoritenin koymuş olduğu bu sınırlar dışında kalan ürünler güvensiz ürün olarak tanımlanıp piyasaya arzı engellenmekte ya da arz edilmiş bir ürün ise toplatılması sağlanmaktadır.

“Güvenli ürün, normal kullanım koşullarında tüketiciler için risk taşımayan veya kabul edilebilir ölçülerde risk taşıyan ve yukarıda bahsedilen temel gerekler bakımından

azami ölçüde koruma sağlayan ürünü ifade eder" şeklinde bakanlık tarafından tanımlanmıştır (60).

Ülkemizde farklı bakanlıkların tüketici ürünlerinde kullanılan kimyasallar ile ilgili düzenlemeleri mevcuttur. Bunlar genellikle resmi gazetede yayınlanan tebliğler vasıtası ile yapılmaktadır. Tüketici ürünlerinde yasaklanan ilk grup arilamin salınımı yapan azo boyar madde grubu olmuştur. Tebliğde 30mg/kg üzerinde miktarının ürünlerde bulunması yasaklanmıştır. Fitalat grubunda ise ülkemizde sadece 6 fitalat türü (DEHP, DBP, BBP, DINP, DIDP, DNOP) 1000 mg/kg toplam değer ile sadece oyuncak ve çocuk bakım ürünlerinde kısıtlanmıştır.

Arsenik bileşikleri mikroorganizmalar, bitkiler veya hayvanlar tarafından bozulmasını önlemek amacıyla ahşap ürünlerde (tekne, su altı ekipmanı, inşaat malzemesi vb) kullanılmamasına ilişkin kısıt bulunmaktadır. Plastik malzemelerde kadmiyum içeriği tekrar aynı tebliğ ile 100mg/kg olarak sınırlanmıştır. Kurşun miktarı "eşyalarda ve eşya parçaların normal ve öngörülen kullanımlarında ağırlıkça % 0,05'e eşit veya daha yüksek ise halkın kullanımına sunulan ve çocukların ağızlarına alabilecekleri eşyalarda kullanılmaz ve piyasaya arz edilemez" ile sınırlı bir kısıt bulunurken kurşun sülfatlar ve kurşun karbonatlar için boya içinde kullanılmamaları konusunda bir kısıt bulunmaktadır (60).

2.8.3. Kumaştan tere migrasyon

Tekstil ürünlerinde kullanılan yüksek miktarda ve çeşitlilikteki kimyasallar hem sağlık riski oluşturmakta hem de deride alerji, dermatitis gibi sağlık sorunlarına sebep olabilmektedir. Terleme yolu ile giysilerimizdeki kimyasal maddelerin çözülmesi ve deri yolu ile vücuda emilimi mümkündür. Nikel, bakır gibi bazı metallerin alerjen etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ağır metallerin ise daha toksik etkilerinin olduğu

farklı çalışmalarda da gösterilmiştir. Metaller bazen tek başlarına bazen de kimyasal bileşik olarak organizmada toksik özellikler gösterir. Joaquim ve ark (2016) metal maruziyeti üzerine yaptıkları çalışmada birçok tekstil ürününde metal varlığını tespit etmiş ve polyester kumaştan tere antimon geçişini gözlemlemiştir (60).

DEHP'nin oyuncakladan tere geçişi konusunda Elif Tümay ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 3 farklı oyuncak numunesi ile denemeler yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda DEHP'nin %0,05-%33 oranı arasındaki değerler ile yapay ter çözeltisine geçiş yaptığını bildirmişlerdir (60).

Danimarka Sağlık Bakanlığının fitalatlar üzerine yaptığı diğer bir çalışmada farklı tüketici ürünlerindeki DEHP, DINP, DBP, DIBP'nin yapay tükürük ve yapay ter çözeltilerine geçişi çalışılmış ve farklı sürelerde bu kimyasallar ekstrakte edilmiştir. Tüm çalışma sonuçlarında belirli oranlarda geçiş gözlenmiştir (60).

2.9. Deneysel Hayvan Modeli Olarak Zebrabalığı

Doğal yaşam alanı Himalaya bölgesi olan küçük tropikal tatlı su balığı Zebrabalığı (Danio rerio), insan hastalıklarında model organizmalar olarak popülerliğini her geçen gün arttırmaktadır (62). Zebrabalığı birçok deneysel çalışmada model (obezite, Parkinson hastalığı, epilepsi, ağrı modeli, kanser, gestasyonel diyabet, sirkadyen ritim, otizm) olarak kullanılır (63–68). Zebrabalığının deneysel hayvan modeli olarak popüler olmasının nedenleri arasında kolay yetiştirilebilmesi, maliyetinin düşük olması, tek seferde yetişkin balıklardan 200-1000 arası embriyo alınabilmesi, embriyo gelişiminin mikroskop altında kolaylıkla gözlenebilmesi bulunmaktadır (69).

2.10. Apoptoz İle İlişkili Genler

2.10.1. Tp53 (Tümör baskılayıcı gen)

İnsan p53 proteini, birbirine bağlı bir dizi geni düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. Tümörün baskılanmasında önemlidir. Tamir proteinlerini harekete geçirir. Eğer nükleik asitler hasar görmüşse ve onarılamayacaklar ise apoptozu başlatır. Tp53 amino asitlerden, beş yapısal ve fonksiyonel alandan oluşur. İlk 1-55 amino asit benzer ve farklı gen setlerini düzenleyen iki transaktivasyon bölgesini (21-28 amino asitler ve 47-55 amino asitler) içerir (70).

Tp53, gen ekspresyonunu etkileyerek doğrudan protein etkileşimleri yoluyla hücre ölümü ve farklılaşmasını, hücre döngüsünü, hücresel yaşlanmayı, metabolik adaptasyonu düzenler. Tp53 hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki hassas dengeyi korur. Tp53 aktivitesi mutasyona uğradığında, tümörlere karşı direncin azaldığı bildirilmiştir. TP53 tamir mekanizmasını harekete geçirir. Eğer DNA tamir edilemeyecek kadar zarar görmüşse TP53 apoptozu indükler (71).

2.10.2. Bax

B hücresi Lenfoma-2 (bcl-2) protein ailesinin apoptozun oluşumunda ve düzenlenmesinde, kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün aktivasyonunda önemli roller oynadığı bilinmektedir. Eğer hücrede DNA tamir mekanizması işlevini yerine getiremezse p53 geni bcl-2 protein ailesinden bax proteinini aktif hale getirerek mitokondri vasıtasıyla hücreyi apoptoza doğru yönlendirir. Böylelikle zarar gören hücre yok edilmiş olur.

Tüm bcl-2 ailesi arasında, pro-apoptotik bax ve anti-apoptotik bcl-2 genleri, iyon kanalları oluşturabildiklerinden apoptotik sinyallemenin düzenlenmesinde ana faktör olarak bildirilmişlerdir. Genellikle mitokondrinin dış zarında lokalize olan bcl-2, hücrenin yaşamasında önemli bir rol oynar ve proapoptotik proteinlerin hareketlerini

inhibe ederken, bax proteini bcl-2 ile heterodimer oluşturur.bcl-2 bir apoptotik aktivatördür (72). Bax ve bcl-2, hücre apoptozunun mitokondriyal yolunda önemli işlevlere sahiptir. Mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirerek kaspazların aktivasyonuna ve nihayetinde apoptoza yol açarlar (73). Raisova ve ark. (2001) hücredeki bax/bcl-2 oranının, apoptotik uyarıyı takiben hücre ölümünün iyi bir göstergesi olabileceğini ortaya koymuştur. Düşük bax/bcl-2 oranı hücrelerin apoptoza dirençli olduğunu gösterirken, yüksek bax/bcl-2 oranı hücrelerin apoptoza duyarlı olduğunu gösterir (74).

2.10.3. Tnf-α (Tümör nekroz faktörü)

Enflamatuar yanıt esnasında makrofaj, monosit ve aktive edilmiş lenfositlerde sentezlenen ve salınan sitokinler, glikoprotein yapısında olan, bağışıklık süreçlerinde görev alan medyatörlerdir**.**

Sitokinler, otokrin, parakrin ve endokrin işlevlerde görev alır ve pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar etkiler gösterir. Pro-inflamatuar sitokinler, inflamasyon, ağrı ve kanser dâhil olmak üzere inflamatuar reaksiyonların veya patolojilerin hem indüklenmesinde hem de ilerlemesinde rol oynar. Bir inflamatuar sitokin olan, tümör nekroz faktörü-alfa (tnf-α), bağışıklık sisteminin modülasyonundan sorumlu, iyi bilinen bir pro-inflamatuar sitokindir (75).

Tnf-α, 233 amino asitten oluşan tip II transmembran proteini olarak sentezlenir ve daha sonra aktif tnf-α'yı oluşturmak üzere tnf-α dönüştürücü enzim aracılığıyla proteolitik bölünmeye uğrar. Artan tnf-α üretimi, hücrelerin nekroz veya apoptoza maruz kalmasına neden olabilen hücresel sinyalleri değiştirebilir. tnf-α'nın inflamatuar koşullara karşı savunma mekanizmasındaki rollerinin yanı sıra Alzheimer hastalığı,

Parkinson hastalığı, felç, sedef hastalığı, artrit, septik şok ve pulmoner bozukluklar da dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklarda da önemli rolleri bulunmaktadır (75).

2.10.4. BDNF (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör)

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin ailesinin bir üyesidir. Periferik ve merkezi sinir sisteminde nöronların büyümesini, sinaptik fonksiyonu ve stabilizasyonunu sağlayan bir nörotrofindir. Bdnf sinir sisteminde nöronların gelişimine yardımcı olurken nörotransmitterlerin işlevlerini sürdürmelerine katkı yapar. Bdnf sentezideki bozukluk ya da yetersizlik hayvan ve insanlarda nörolojik ve nörodejeratif hastalıkların habercisi olabilir (76).

Bdnf ve reseptörü, reseptör tirozin kinaz TrkB tarafından indüklenen sinyal kaskadları, nöronal büyümeyi ve farklılaşmayı sinaptik plastisite ile ilişkilendirir. Bu nedenle, bdnf sinyalizasyon yolaklarının incelenmesi, psikiyatrik ve nörolojik bozukluklarda umut veren tedavi yöntemlerinin temelini oluşturmaktadır (77).

Bdnf, MSS' de en çok çalışılan ve iyi karakterize edilmiş nörotrofik faktörlerden biridir. Trk reseptör ailesinin bir üyesi olan TrkB'yi bağlayarak ve aktive ederek normal beyin fonksiyonlarının devam etmesinde ve korunmasında yer alan birçok hücresel süreci düzenler. Bdnf glutamaterjik nöronlar, korteks ve hipokampustan izole edilen astrosit ve mikroglialar tarafından eksprese edilir. Embriyogenez sırasında, bdnf-TrkB sinyali, kortikal progenitör hücrelerin farklılaşmasını destekler ve daha sonra kortikal progenitör hücrelerin nöronlara farklılaşmasını sağlar (78). Yapılan çalışmalarda, oksidatif stres ve apoptozun bdnf aktivitesinden etkilenen iki önemli biyolojik süreç olduğu vurgulanır. Kumar ve ark. (2021), artan bdnf ekspresyonunun, zebra balığı beyninde oksidatif stres ve apoptozu modüle ettiğini göstermişlerdir (79).

3. Materyal ve Metot

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Tablo 3. 1: Kullanılan Kimyasalların listesi

Kimyasal adı	**Markası**
L-Histidin monohidroklorür monohidrat, (C6H9O2N3 HCl. H2O)	Sigma-Aldrich BioUltra, ≥99.5%
Sodyum di-hidrojen ortofosfat di-hidrat (NaH2PO4 2H2O)	Sigma-Aldrich ≥99.0%
Nitrik asit (HNO3) (%65)	Merck 100456
Hidroklorik Asit (HCl) (%37)	Merck 100314
Sodyum Klorür (NaCl),	Merck ≥99,5%
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich ≥99.0%
Magnezyum Sülfat Heptahidrat (MgSO4.7H2O)	Sigma-Aldrich 230391
Susuz Sodyum Sülfat	Tekkim LB.TK.170560.25006
Diklorometan (DCM),	Merck 106050
Toluene	Supelco 108325
Pentan	Supelco 10882
Hekzan	Supelco 104374
Antimon (Sb)	Agilent 1000ppm
Krom (Cr)	Agilent 1000ppm
Kobalt (Co)	Agilent 1000ppm
Bakır (Cu)	Agilent 1000ppm
Nikel (Ni)	Agilent 1000ppm
Arsenik (As)	Agilent 1000ppm
Kadmiyum (Cd)	Agilent 1000ppm
Kurşun (Pb)	Agilent 1000ppm
Cıva (Hg)	Agilent 1000ppm
Di etil hekzil fitalat (DEHP)	CPA Chem
Bis 2-metoksi etil fitalat (DMEP)	CPA Chem

Kimyasal adı	**Markası**
Di-n-oktil fitalat (DNOP)	CPA Chem
Di-iso-desil fitalat (DIDP)	CPA Chem
Di-isononil fitalat (DINP)	CPA Chem
Di-n-heksil fitalat (DHP)	CPA Chem
Dibütil fitalat (DBP)	CPA Chem
Bütil benzil fitalat (BBP)	CPA Chem
Dinonil fitalat (DNP)	CPA Chem
Dietil fitalat (DEP)	CPA Chem
Di-n-propil fitalat (DPRP)	CPA Chem
Di-isobütil fitalat (DIBP)	CPA Chem
Di-siklo hekzil fitalat (DCHP)	CPA Chem
Di-iso-oktil fitalat (DIOP)	CPA Chem
Fitalik asit, bis-n-heptil ester (DHEP)	CPA Chem
Di-un dekil fitalat (DUP)	CPA Chem
DIHP	CPA Chem
Dipentil fitalat (DPP)	CPA Chem
Fitalik acit, bis-iso-heksil ester (DIHxP)	CPA Chem
Fitalik asit, bis-2-n-bütoks etil ester (DBEP)	LGC
Benzik Benzoat (ISTD) (BB)	MERCK
Diiso pentil fitalat (DIPP)	LGC
Fitalik asit, bis-metil ester (DMP)	LGC
Benzo(j)floranten	CPA Chem RD0085051.2
Benzo(a)piren	CPA Chem RD0085051.2
Benzo(e)piren	CPA Chem RD0085051.2
Benzo(a)antracen	CPA Chem RD0085051.2
Krizen	CPA Chem RD0085051.2
Benzo(b) floranten	CPA Chem RD0085051.2
Benzo(k) floranten	CPA Chem RD0085051.2
Dibenz(a,h) antracen	CPA Chem RD0085051.2
Asenaften	CPA Chem RD0085051.2
Asenafetilen	CPA Chem RD0085051.2

Kimyasal adı	**Markası**
Benzo(g,h,i)perilen	CPA Chem RD0085051.2
Floranten	CPA Chem RD0085051.2
Floren	CPA Chem RD0085051.2
Indeno(1,2,3-c,d)piren	CPA Chem RD0085051.2
Naftalin	CPA Chem RD0085051.2
Fenantren	CPA Chem RD0085051.2
Piren	CPA Chem RD0085051.2
Siklopenta(c,d)piren	CPA Chem RD0085051.2
Dibenzo(a,e)piren	CPA Chem RD0085051.2
Dibenzo(a,h)piren	CPA Chem RD0085051.2
Dibenzo(a,i)piren	CPA Chem RD0085051.2
Dibenzo(a,l)piren	CPA Chem RD0085051.2
1-Metilpiren	CPA Chem RD0085051.2
Antrasen	CPA Chem RD0085051.2
Sodyum karbonat	MERCK 1.06392.1000
Sodyum hidroksit	MERCK 1.06482.1000
Bakır (III) sülfat	FISHER CHEMICAL C/8600/50
Sodyum potasyum tartarat	MERCK 1.08087.1000
Folin çözeltisi	SIGMA F9252
Sodyum klorür	SIGMA S9888
Albumin	SIGMA A3912
Tiyobarbürik asit (TBA)	SIGMA T5500-25G
Triklorasetik asit (TCA)	ACROS 421451000
Hidroklorik asit	MERCK 1.00317.2500
n-bütanol	FISHER BIOREAGENTS B/4800/17
Çinko sülfat heptahidrat	MERCK 1.08883.1000
Vanadyum (III) Klorür	ACROS 197000250
Sülfaniamid (SULF)	SIGMA S9251
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	MERCK 1.06237.0025

Kimyasal adı	Markası
Dipotasyum hidrojen fosfat	SIGMA P2222-100G
Potasyum dihidrojen fosfat	SIGMA P5655-100G
Disodyum hidrojen fosfat	SIGMA 255793-10G
Sodyum Etilendiamin tetraasedik asit (Na-EDTA)	SIGMA E4884-100G
Riboflavin	FISHER BIOREAGENTS BP167-50
o-dianisin	ACROS 407890050
L-Glutatyon (GSH)	SIGMA G4251-5G
1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	ACROS 160511000
Formaldehit	SIGMA 252549
Etanol	MERCK 1009862500
Metanol	SIGMA 322415
Aseton	SIGMA 90872
Fosfat Tampon Tuzu Tablet (PBS)	SIGMA P4417-100TAB

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Tablo 3. 2: Kullanılan cihazların listesi

Cihaz Adı	Markası
RT-PCR	Rotor Gene-Q, Qiagen
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAcube, Qiagen
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Santrifüj	Sigma 1-16K, Sigma
Vorteks	V-1 PLUS, Biosan
pH metre	Hanna HI 2211
Otomatik pipet	Rainin
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Homojenizatör	Tissuelyser LT, Qiagen
Etüv	Nüve EN 400
Manyetik karıştırıcı	Witeg Wisd Hotplate Stirrer MSH
Sterio Discovery V8 mikroskop	Zeiss
Akvaryum	Zebtec mini sistem

Cihaz Adı	Markası
Distile su cihazı	Elga Option-Q Ultra saf su sistemi
Buzdolabı	İndesit TAA 12 V
Termostat	EHEIM thermocontrol
Kamera	Canon Zoom Lens 5X IS
Terazi	Radwag
Otomatik Pipet	Brand
Dispenser	Brand
Su Banyosu	Memmert
Ultrasonik Su Banyosu	Everest
ICP-MS	Agilent 7700
GC-MS	Agilent 5975
GC-MS	Shimadzu QP2020

3.2. Kumaş Örneklerine Yapılan İşlemler ve Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Yapay ter çözeltisinin hazırlanması

Ter çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar belirtilen gramajlarda tartılarak 1000 ml'lik balon joje içinde grade 1 su ile çözülmüştür. 0,1N NaOH çözeltisi ile pH 5,5±0,1'e ayarlanmıştır. Yapay ter çözeltisi çalışmaların yapıldığı günlerde taze olarak hazırlanmıştır.

- 0,5 g L-Histidin monohidroklorür monohidrat, ($C_6H_9O_2N_3$ HCl. H_2O)
- 5,0 g Sodyum klorür
- 2,2 g Sodyum di hidrojen ortofosfat di hidrat (NaH_2PO_4 $2H_2O$) (ISO 105-E04 Textiles) (80)

3.2.2. Yapay ter çözeltisi ile ekstraksiyon

Tekstil testleri yapan test laboratuvarları, üreticiler ve ekolojik kontrolleri olmayan pazarlardan elde edilen yaklaşık 1000'den fazla kumaş, ürün ve ayakkabı numuneleri,

içeriklerinin tespiti için öncelikle uluslararası standartlarına göre test edilmiştir. Pozitif sonuç verenler çalışmada kullanılmak üzere ayrılmıştır (81–84).

Ekstraksiyon süresi ve sıcaklığını optimize etmek için Minitab programı kullanılarak deney tasarımı (DOE) yapılmıştır. Deney tasarımında migrayon üzerinde etkisi olduğu düşünülen girdiler olarak sıcaklık ve süre alınmıştır.

Ön çalışmalarda minimum süre 7 gün maksimum süre 14 gün olarak belirlenmiştir. Sıcaklık ise 37^{O}C ve 60 ^{O}C olarak tercih edilmiştir. Etkileşimi daha iyi anlayabilmek için bir adet orta nokta seçilmiştir.

Fitalat, PAH ve ağır metal içerdikleri tespit edilen örneklerden 1g numune alınarak fitalat ve PAH analizi için ağzı kapaklı 100mL hacimli cam şişelere, ağır metal analizi için 100 mL hacimli ağzı kapaklı plastik şişelere konulmuştur. Üzerlerine 20mL yapay ter çözeltisi eklenmiş, belirlenen süre ve sıcaklıkta su banyosu içerisinde bekletilmiştir.

3.3. Ağır Metal Analizi

3.3.1. Kütlece (w/w) %2'lik Nitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

22,2 ml %65' lik HNO_3 1 litrelik balon jojeye alınıp, grade 1 su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti kalibrasyon noktaları, internal standartlar ve seyreltme işlemlerinde kullanılmıştır.

3.3.2. Internal standart çözeltisinin hazırlanması (200 ppb)

1000 ppm'lik internal standartlarının her birinden 100 µl alınıp, 500 ml 'lik balon jojeye aktarılmış ve %2'lik HNO_3 ile hacmi tamamlanmıştır.

3.3.3. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

1000 ppm konsantrasyonundaki ana stok standart çözeltilerinden kademeli seyreltme işlemi yapılarak 100ppb-1000ppb arasında 5 farklı noktada kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Çözücü olarak hazırlanan %2'lik HNO_3 çözeltisi kullanılmıştır.

Tablo 3. 3: Kalibrasyon Noktaları ve Hazırlanan Metaller

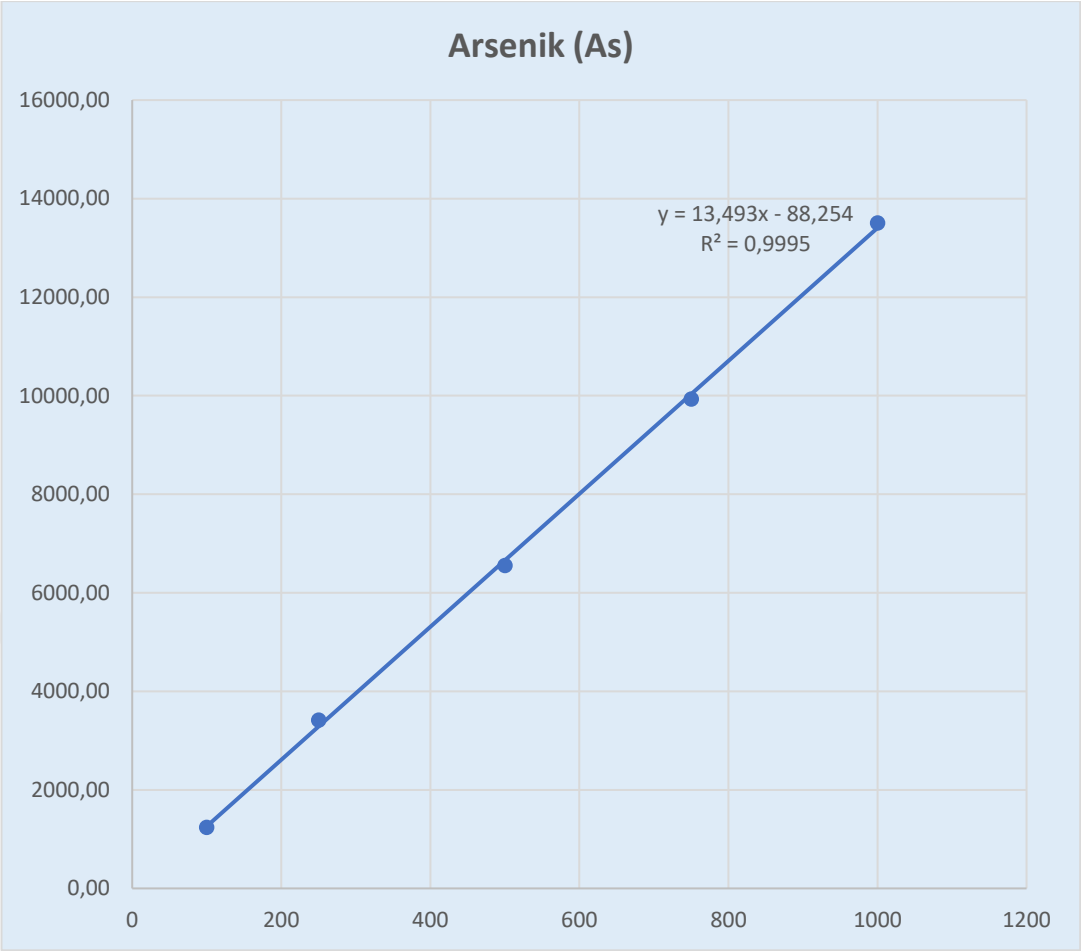
Metal	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Antimon (Sb) (ppb)	100	250	500	750	1000
Krom (Cr) (ppb)	100	250	500	750	1000
Kobalt (Co) (ppb)	100	250	500	750	1000
Bakır (Cu) (ppb)	100	250	500	750	1000
Nikel (Ni) (ppb)	100	250	500	750	1000
Arsenik (As) (ppb)	100	250	500	750	1000
Kadmiyum (Cd) (ppb)	100	250	500	750	1000
Kurşun (Pb) (ppb)	100	250	500	750	1000
Cıva (Hg) (ppb)	100	250	500	750	1000

3.3.4. Ter çözeltilerinin ICP-MS cihazında analizi

10mL'lik ter çözeltileri direkt enjeksiyon ile ICP-MS cihazında analiz edilmiştir. Kalibrasyon standartları ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiği R^2 değerinin 0,995'den büyük olduğu görülmüştür. Yapılan metot geliştirme çalışmaları ile elde edilen Cihaz Parametreleri Tablo 3.7 deki gibi belirlenmiştir.

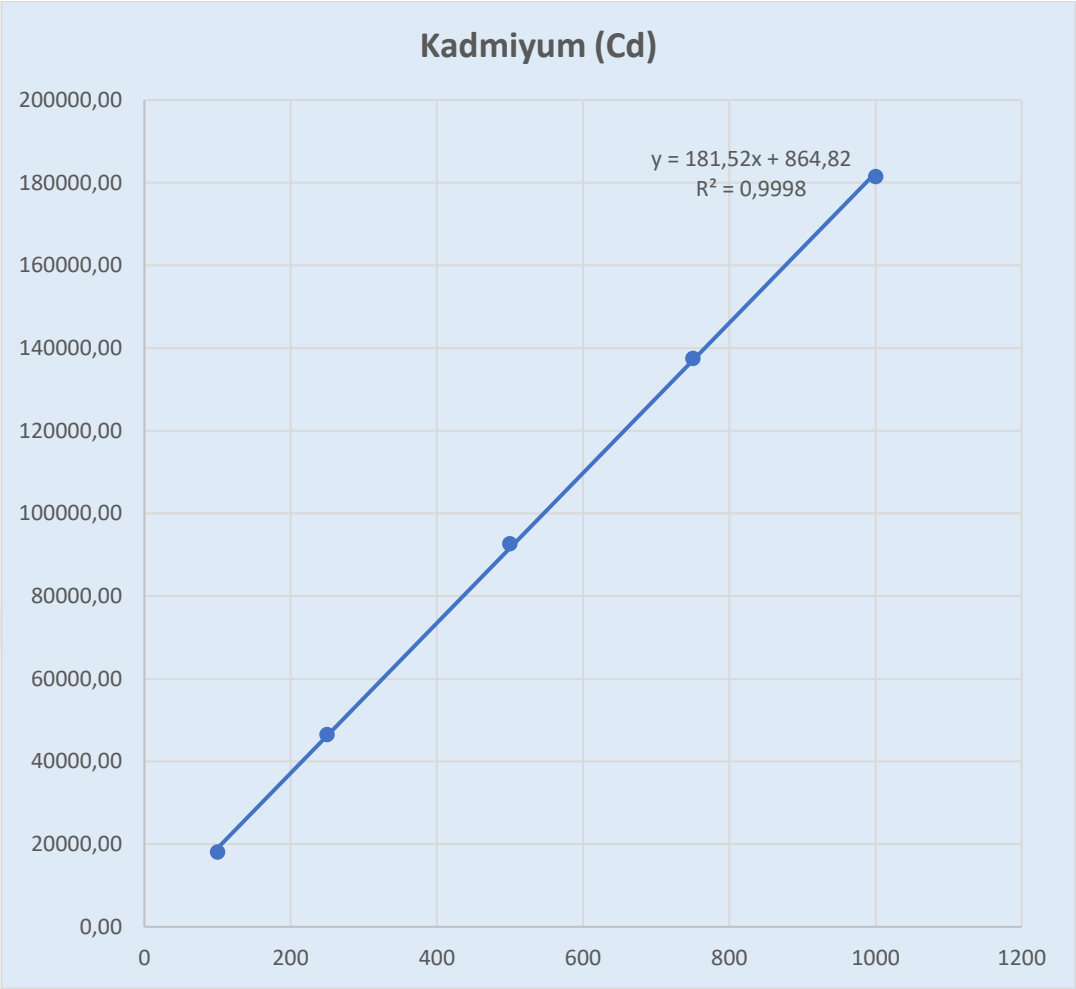


Şekil 3. 1: Çalışmada Kullanılan Agilent ICP-MS Cihazı



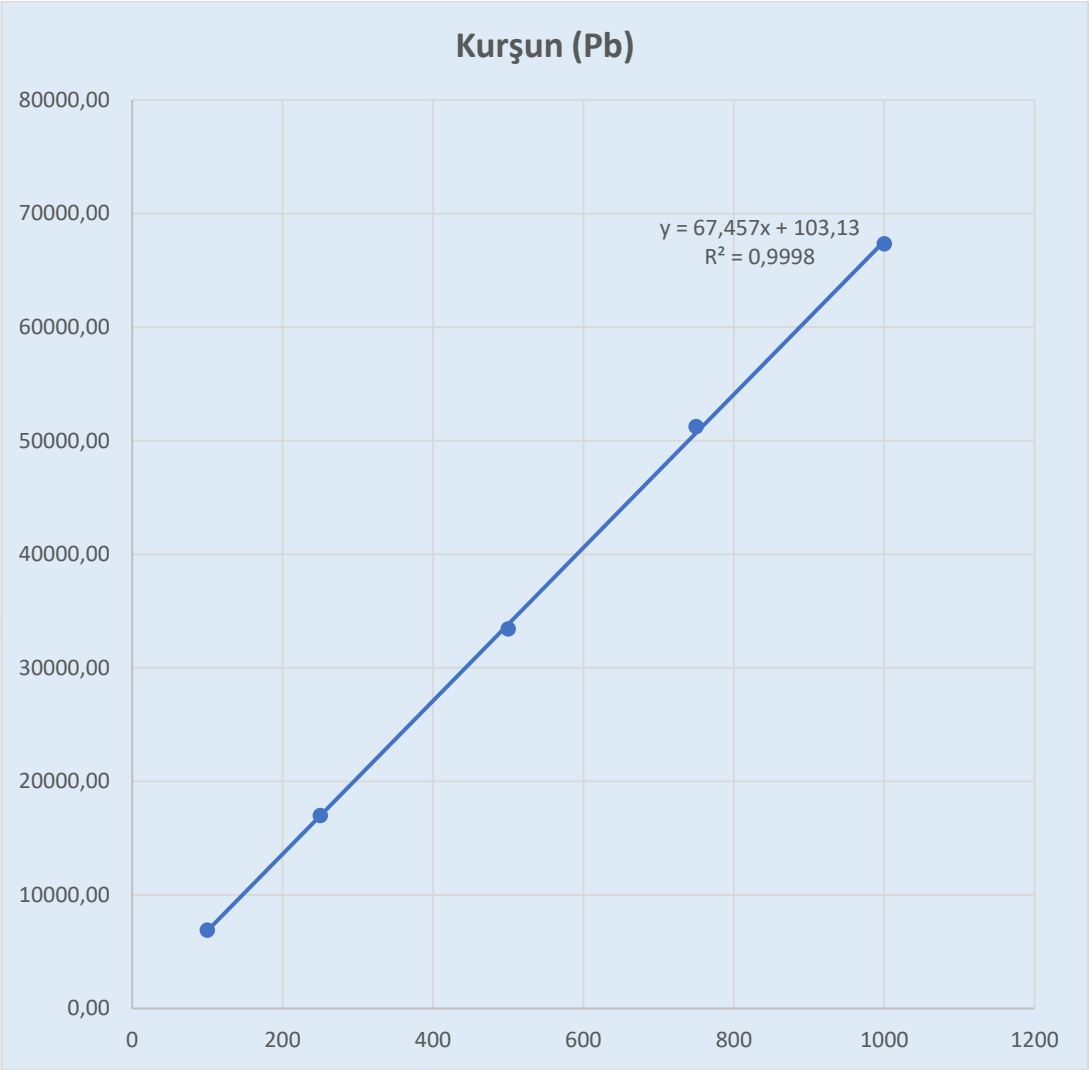
Şekil 3. 2: Arsenik Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Arsenik için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9995 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 3: Kadmiyum Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Kadmiyum için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9998 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3. 4: Kurşun Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Arsenik için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9998 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Tablo 3. 4: ICP-MS Cihaz Parametreleri

Elementler	Kütle	Doğrulama Kütlesi	Çalışma Modu	İntegrasyon Zamanı
Cu	65	63	He	0,2
Co	59	-	He	0,2
Ni	60	-	He	0,2
Cr	52	-	He	0,2
Pb	208	-	He	0,3
Cd	111	114	He	0,5
Sb	121	-	He	0,2
As	75	-	He	1
Hg	202	201	He	0,5

ICP-MS cihazında metaller için taranan kütleler ve var ise doğrulama kütleleri Tablo 3.4' te verilmiştir. Helyum çalışma modu tüm metaller için tercih edilmiştir. Veri toplama süresinin bir ölçütü olan integrasyon zamanları da metallerin cihazdaki tepkilerine göre arttırılmıştır.

3.4. Fitalat Analizi

Çalışmada taranan ve metot geliştirilen fitalatların listesi Tablo 3.5' te verilmiştir.

Tablo 3. 5: Fitalatlar

İsmi	Kısaltması	Saflık
Di etil hekzil fitalat	DEHP	99,9
Bis 2-metoksi etil fitalat	DMEP	97,6
Di-n-oktil fitalat	DNOP	99,9
Di-iso-desil fitalat	DIDP	99,9
Di-isononil fitalat	DINP	99,9
Di-n-heksil fitalat	DHP	99,7
Dibütil fitalat	DBP	99,9
Bütil benzil fitalat	BBP	99,2
Dinonil fitalat	DNP	99,5
Dietil fitalat	DEP	99,5
Di-n-propil fitalat	DPRP	99,9
Di-isobütil fitalat	DIBP	99,7
Di-siklo hekzil fitalat	DCHP	99,7
Di-iso-oktil fitalat	DIOP	99,5
Fitalik asit, bis-n-heptil ester	DHEP	99,8
Di-un dekil fitalat	DUP	99,5
Di-iso heptil fitalat(C7 izomer karışımı)	DIHP	99,9
Dipentil fitalat	DPP	99,9
Fitalik acit, bis-iso-heksil ester	DIHxP	100
Fitalik asit, bis-2-n-bütoks etil ester	DBEP	99,4
Di etil hekzil fitalat	DEHP	100

21 farklı fitalat türü GCMS cihazına tanıtılıp ardından en uygun analiz parametreleri seçilmiştir.

3.4.1 Ana stok referans ve internal standart çözeltilerinin hazırlanması (1000 ppm)

Tablo 3.8'de bulunan fitalat ve iç standart maddeleri saflık oranları dikkate alınarak her biri ayrı ayrı 20 ml'lik amber renkli cam şişelere konulmuş ve üzerlerine 10 ml asetonitril eklenmiştir.

3.4.2. Ara Stok Miks Çözeltisinin Hazırlanması (10 ppm)

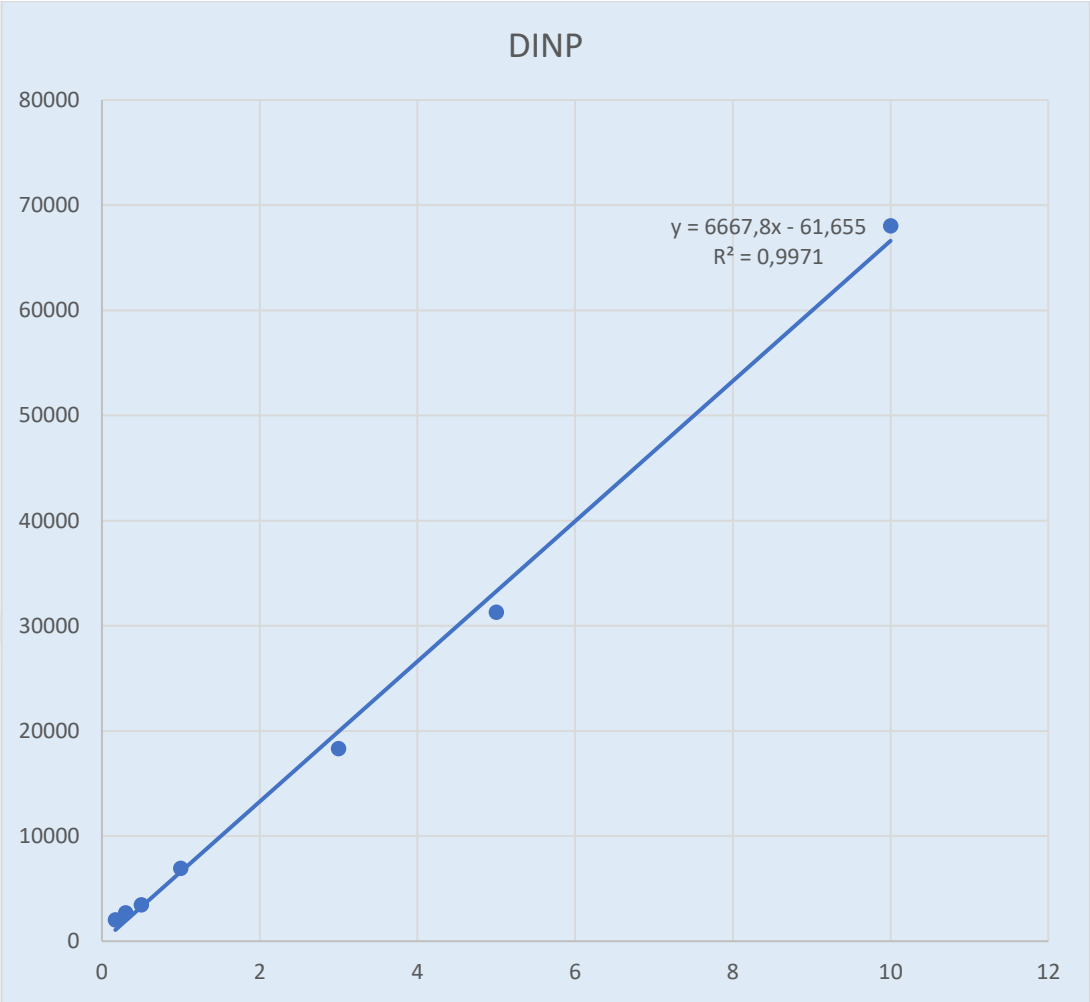
Hazırlanan stok çözeltilerin her birinden 100 µl alınarak 10 ml hacimli balon jojeye aktarılmış, 1000 ppm Internal standart (BB) çözeltisinden 20 µl aynı balon jojeye eklenip asetonitril ile hacme tamamlanmıştır.

Tablo 3. 6: Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Konsantrasyonlar (ppm)	Blank	0,17	0,3	0,5	1	3	5	10
10 ppm fitalat mix (µl)	0	85	150	250	500	1500	2500	1000
İç standart içeren ACN (µl)	1000	4915	4850	4750	4500	3500	2500	0

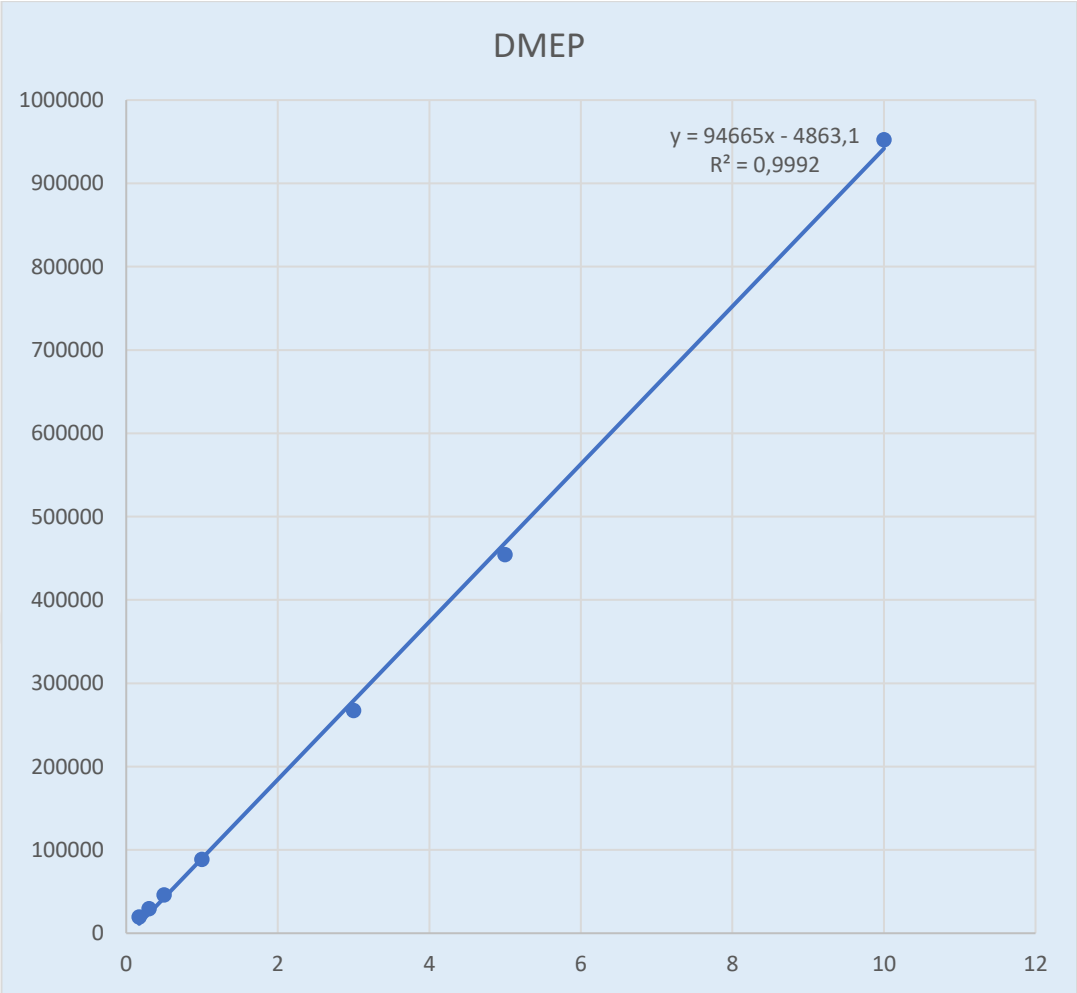
3.4.3. Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Tablo 3.6' da verilen miktarlarda kalibrasyon noktaları hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği R^2 değerinin 0,995'ten büyük olduğu görülmüştür.



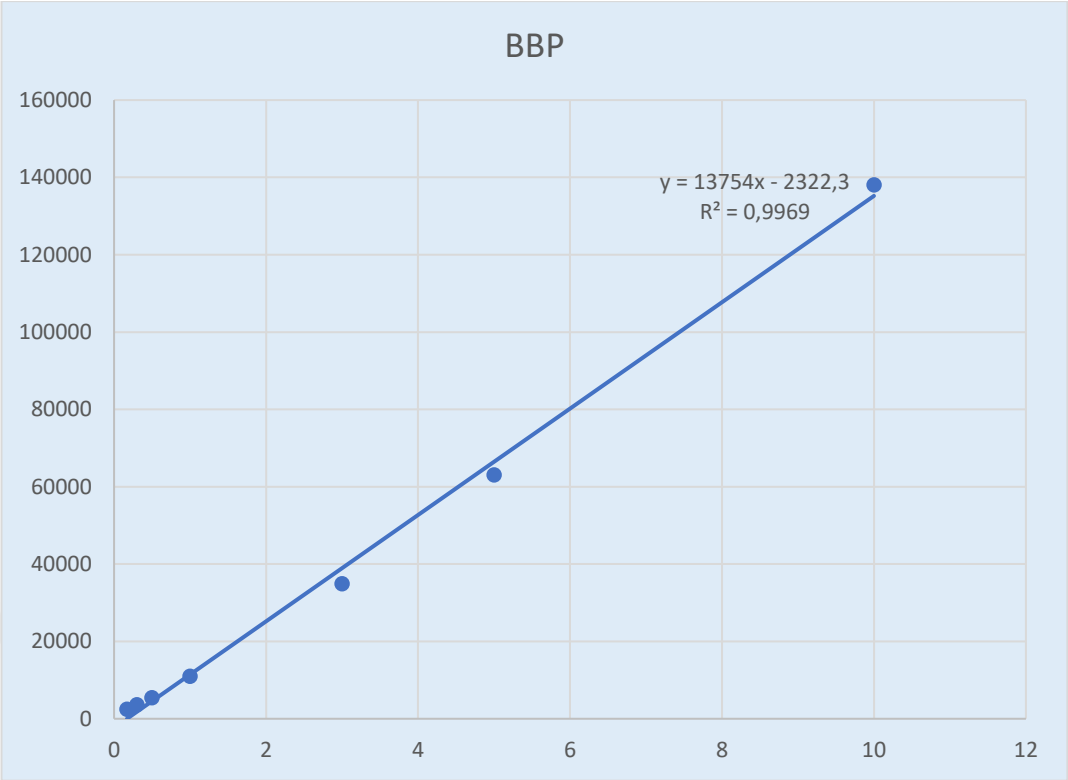
Şekil 3. 5: DINP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

DINP için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9971 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. 6: DMEP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

DMEP için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9992 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. 7: BBP Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

BBP için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9969 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir.

3.4.4. Ter numunelerinin fitalat analizi için ekstraksiyonu

20mL ml ter numunesi alınıp 200 ml hacimli ayırma hunisine alınarak üzerine BB internal standardından 20 µL eklenmiştir. 1g sodyum klorür (NaCl) ve 1g magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$) eklenip kuvvetlice elde çalkalanmıştır. Çalkalama sonrasında gaz çıkışı sağlanmıştır.

10 ml DCM (Diklorometan) eklenerek 30 dk mekanik çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Fazların ayrılması için bir süre beklenmiş ve altta kalan DCM fazı 100 ml hacimli balona susuz sodyum sülfattan süzülerek alınmıştır. 1mL alınıp viallenerek geliştirilen metotta analiz edilmek üzere gaz kromotografisi kütle spektroskopisi (GC-MS) cihazına verilmiştir.

3.4.5. GC-MS Cihazında Fitalat Analizi

Çalışma sırasında 21 farklı fitalatı tespit edebilecek metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metoda ait GCMS parametreleri Tablo 3.7 ve 3.8’ de verilmiştir.



Şekil 3. 8: Çalışmada Kullanılan Agilent Marka GCMS Cihazı

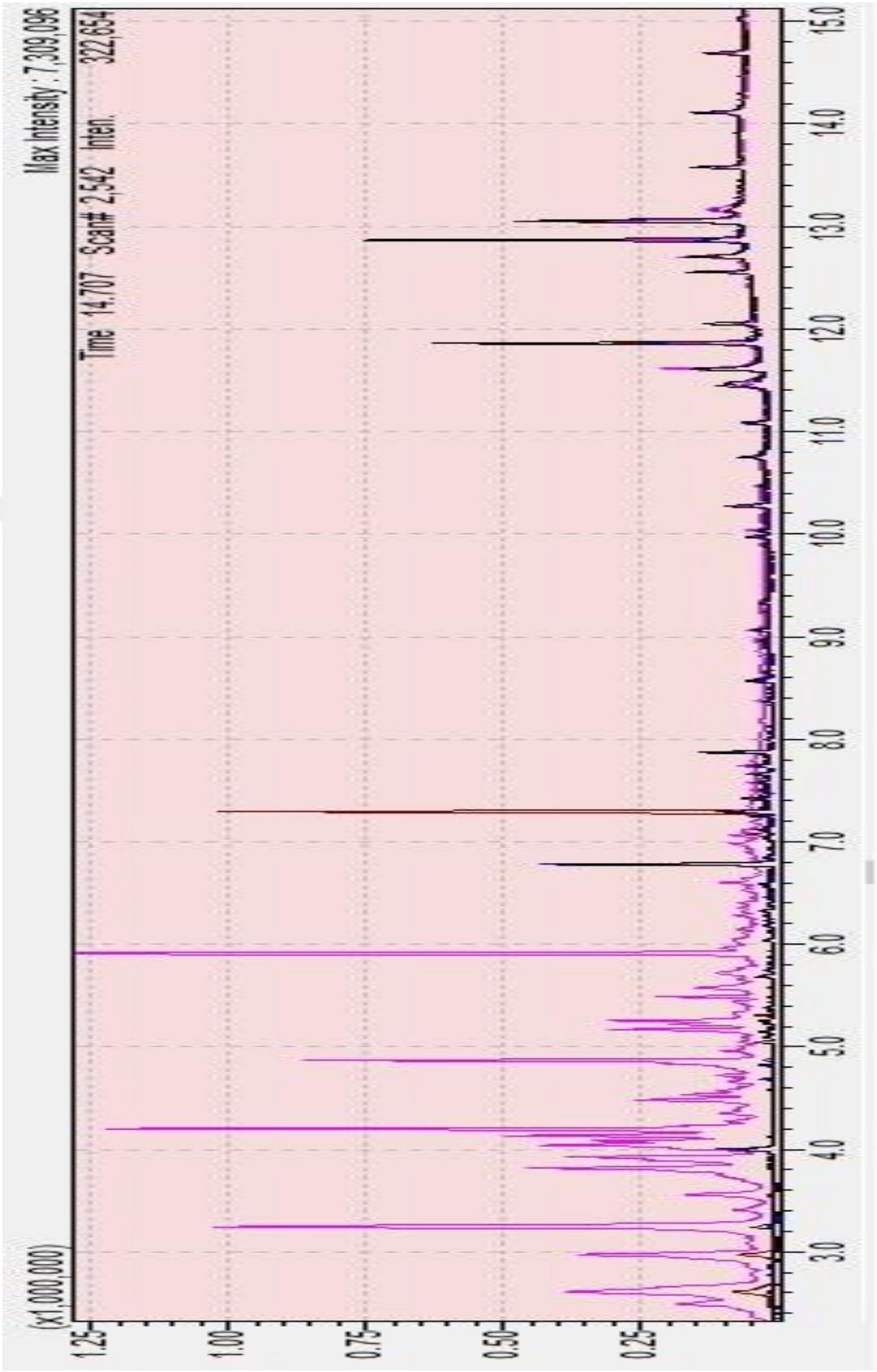
Tablo 3. 7: GC-MS Cihaz Parametreleri

Parametreler	**Değerler**
Enjeksiyon	
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Enjeksiyon Hızı	Hızlı
Inlet Sıcaklığı	250 °C
Inlet Modu	Split 5/1
Kolon	
Kolon Türü	Agilent HP-5MS %5 Fenil metil siloksan 325 °C 30 m x 250 µm x 0,25 µm
Akış Hızı	1 ml/min
Toplam Analiz Süresi	17,2 min
Dengelenme Süresi	0,5 min
MS	
Çözücü Gecikmesi	2 min
MS Modu	SIM
Aux	280 °C

Tablo 3. 8: GCMS SIM Metot Parametreleri

Sıra	**İsim**	**Alıkonma Zamanı**	**Hedef İyon (m/z)**
1	Benzyl benzoate	6.464	212
2	DINP	12.629	293
3	DIDP	13.097	307
4	DEHP	11.199	279
5	DCHP	11.145	249
6	DNOP	12.221	279
7	DPRP	6.414	149

Sıra	İsim	Alıkonma Zamanı	Hedef İyon (m/z)
8	DBP	7.451	223
9	DEP	5.519	149
10	BBP	9.968	206
11	DHEP	11.153	265
12	DIHP	10.531	149
13	DHxP	9.834	149
14	DIHxP	9.622	149
15	DIBP	6.907	149
16	DPP	8.585	149
17	DMEP	7.694	149
18	DNP	13.032	149
19	DIOP	11.857	279
20	DMP	4,72	163
21	DBEP	11,5	176
22	DIPP	9,15	237



Şekil 3. 9: Fitalat Toplam İyon Kromatogramı (TIC)

3.5. PAH Analizi

Çalışma sırasında taranan PAH'lar Tablo 3.9' da verilmiştir.

Tablo 3. 9: PAH Etken Maddeleri

PAH	Marka- Katalog No	Saflık (%)
Benzo(j)floranten	CPA CHEM RD0085051.2	98,40
Benzo(a)piren	CPA CHEM RD0085051.2	97,80
Benzo(e)piren	CPA CHEM RD0085051.2	97,50
Benzo(a)antracen	CPA CHEM RD0085051.2	98,40
Krizen	CPA CHEM RD0085051.2	98,70
Benzo(b) floranten	CPA CHEM RD0085051.2	99,50
Benzo(k) floranten	CPA CHEM RD0085051.2	98,90
Dibenz(a,h) antracen	CPA CHEM RD0085051.2	99,00
Asenaften	CPA CHEM RD0085051.2	99,90
Asenafetilen	CPA CHEM RD0085051.2	95,30
Benzo(g,h,i)perilen	CPA CHEM RD0085051.2	98,50
Floranten	CPA CHEM RD0085051.2	98,90
Floren	CPA CHEM RD0085051.2	98,80
Indeno(1,2,3-c,d)piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,20
Naftalin	CPA CHEM RD0085051.2	99,40
Fenantren	CPA CHEM RD0085051.2	98,50
Piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,90
Siklopenta(c,d)piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,90
Dibenzo(a,e)piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,60
Dibenzo(a,h)piren	CPA CHEM RD0085051.2	98,00
Dibenzo(a,i)piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,90
Dibenzo(a,l)piren	CPA CHEM RD0085051.2	99,72
1-Metilpiren	CPA CHEM RD0085051.2	97,20
Antrasen	CPA CHEM RD0085051.2	99,30

3.5.1. Ana stok referans ve internal standart çözeltilerinin hazırlanması (1000 ppm)

Tablo 3.15'te bulunan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) etken maddeleri ve iç standartların saflık oranları farklılık gösterdiğinden aşağıdaki formüle göre hesaplanan miktarları alınarak her biri ayrı ayrı 20 ml'lik amber kaplı cam şişelere konup ve üzerlerine 10 ml toluen eklenmiştir.

$$X = \frac{V}{A}$$

X= Alınması gereken miktar (katılar için mg, sıvı olanlar için µL)

A= Referans Standart maddenin saflık oranı (% değeri)

V= Tamamlanan çözücü hacmi (mL)

3.5.2. Ara stok miks çözeltisinin hazırlanması (10 ppm)

Stok çözeltilerin her birinden 100 µL alınarak 10 ml hacimli balon jojeye aktarılıp, toluen ile hacmi tamamlanmıştır.

3.5.3. Ara stok miks çözeltisinin hazırlanması (0,5 ppm)

10 ppm ara stok miks çözeltisinden 0,5 ml alınarak 10 ml hacimli balon jojede toluen ile hacme tamamlanıp, vorteks ile karıştırılmıştır.

3.5.4. Ara stok internal standart çözeltisinin hazırlanması (5 ppm)

Hazırlanan 1000 ppm stok internal çözeltisinden 50 µL alınarak 10 ml hacimli balon jojede toluen ile hacme tamamlanıp vorteks ile karıştırılmıştır.

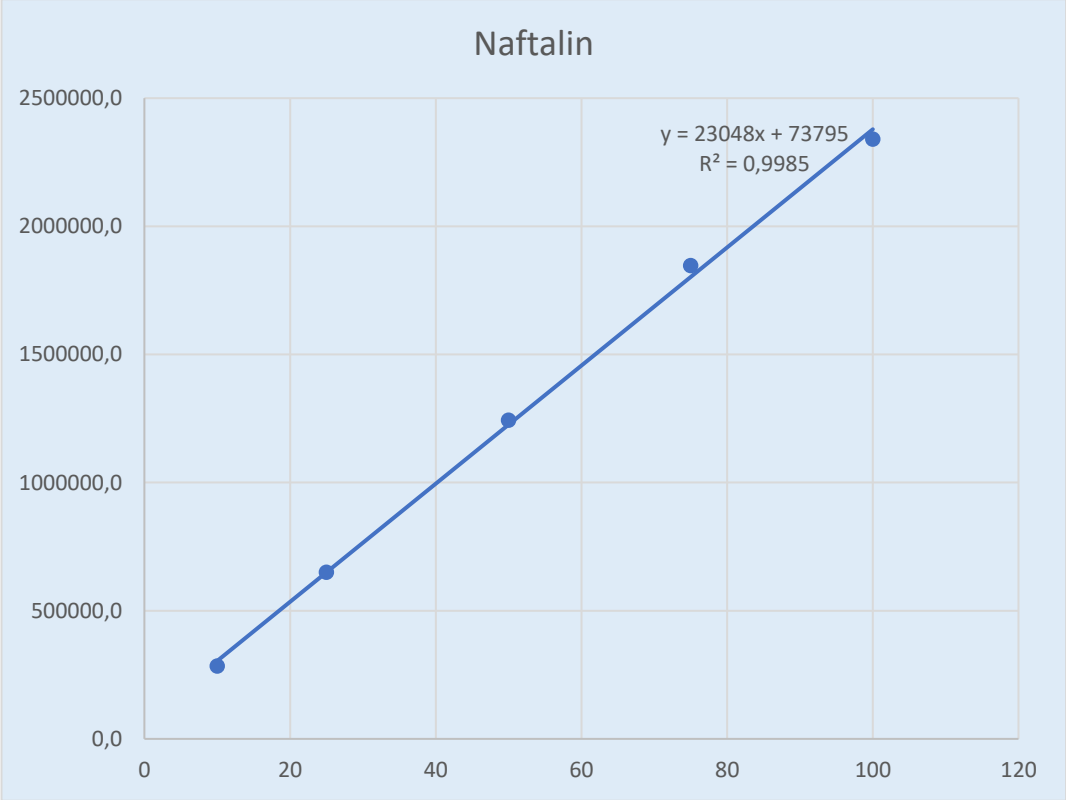
0,25 ppm Internal Standart İçeren 0,5 ppm PAH Stok Miks Çözeltisinin Hazırlanması: 10 ppm hazır referans PAH miksinden ve 5 ppm internal çözeltisinden 50'şer µL alınır ve içinde 900 µL toluen bulunan viale aktarılmıştır.

3.5.5. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan prosedür Tablo 3.10' da verilmiştir.

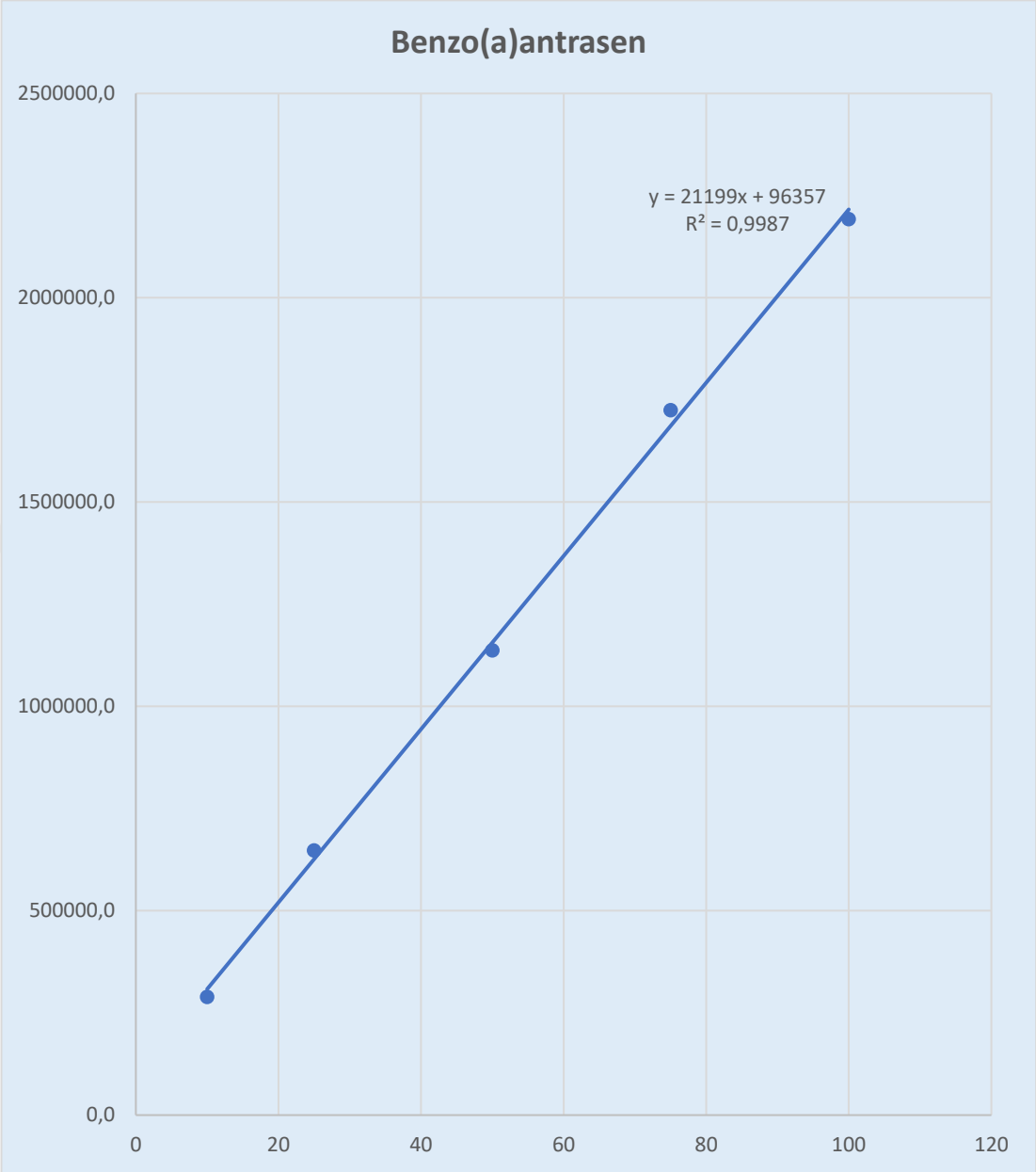
Tablo 3. 10: Kalibrasyon Standart Çözeltilerinin Hazırlanması İçin Kullanılan Miktarlar.

Konsantrasyonlar (ppb)	Blank	10	25	50	75	100
0,5 ppm PAH Miks (µL)	-	10	25	50	75	100
Toluen (µL) (internal standart içeren)	500	490	475	450	425	400



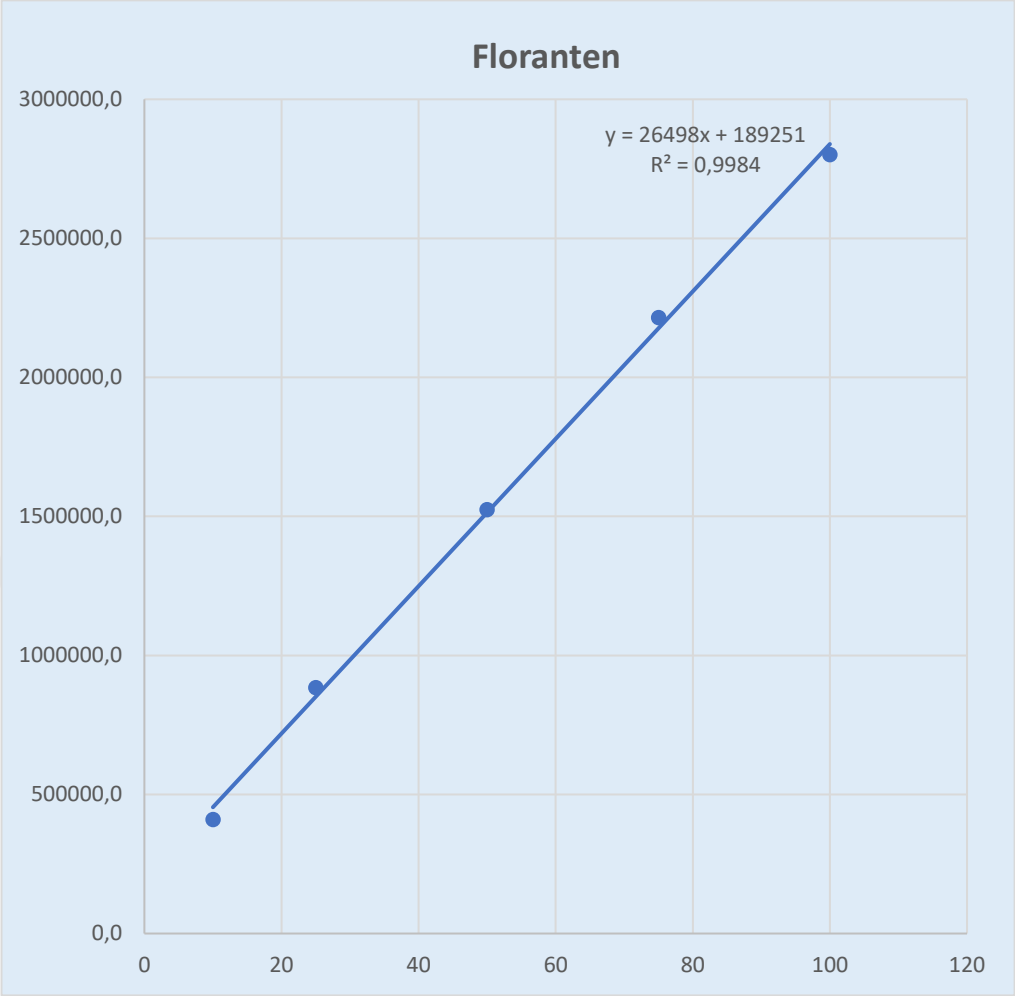
Şekil 3. 10: Naftalin Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Naftalin için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9985 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3. 11: Benzo(a)antrasen Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Benzo(a)antrasen için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9987 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3. 12: Floranten Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi

Floranten için çizilen kalibrasyon eğrisinin çalışılan aralıkta doğrusal olduğu görülmüştür. R^2 değeri 0,9984 olduğu ve 1'e çok yakın olduğu görülmüştür. Bu aralıkta geliştirilen metot ile çalışmanın güvenli olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12).

3.5. 6. Ter numunenin PAH analizi için ekstraksiyonu

20mL ter numunesi alınarak 200 ml hacimli ayırma hunisine aktarılıp üzerine BB iç standardından 20 µL eklenmiştir. 1g sodyum klorür (NaCl) ve 1g magnezyum sülfat (MgSO4.7H2O) eklenip kuvvetlice elde çalkalanmıştır. Çalkalama sonrasında gaz çıkışı sağlanmıştır.

10 ml DCM (Diklorometan) eklenerek 30 dk mekanik çalkalayıcıda çalkalanmış, fazların ayrılması için bir süre beklenmiş ve altta kalan DCM fazı 100 ml hacimli balona susuz sodyum sülfattan süzülerek alınmıştır. Buradan 1mL alınıp viallenerek geliştirilen metotta analiz edilmek üzere gaz kromotografisi kütle spektroskopisi (GC-MS) cihazına verilmiştir.

3.5.7. Numunenin GCMS cihazında analizi

Metot geliştirme çalışmaları sonrasında elde edilen parametreler ve 24 farklı PAH'a ait tespit parametreleri Tablo 3.11' de verilmiştir.

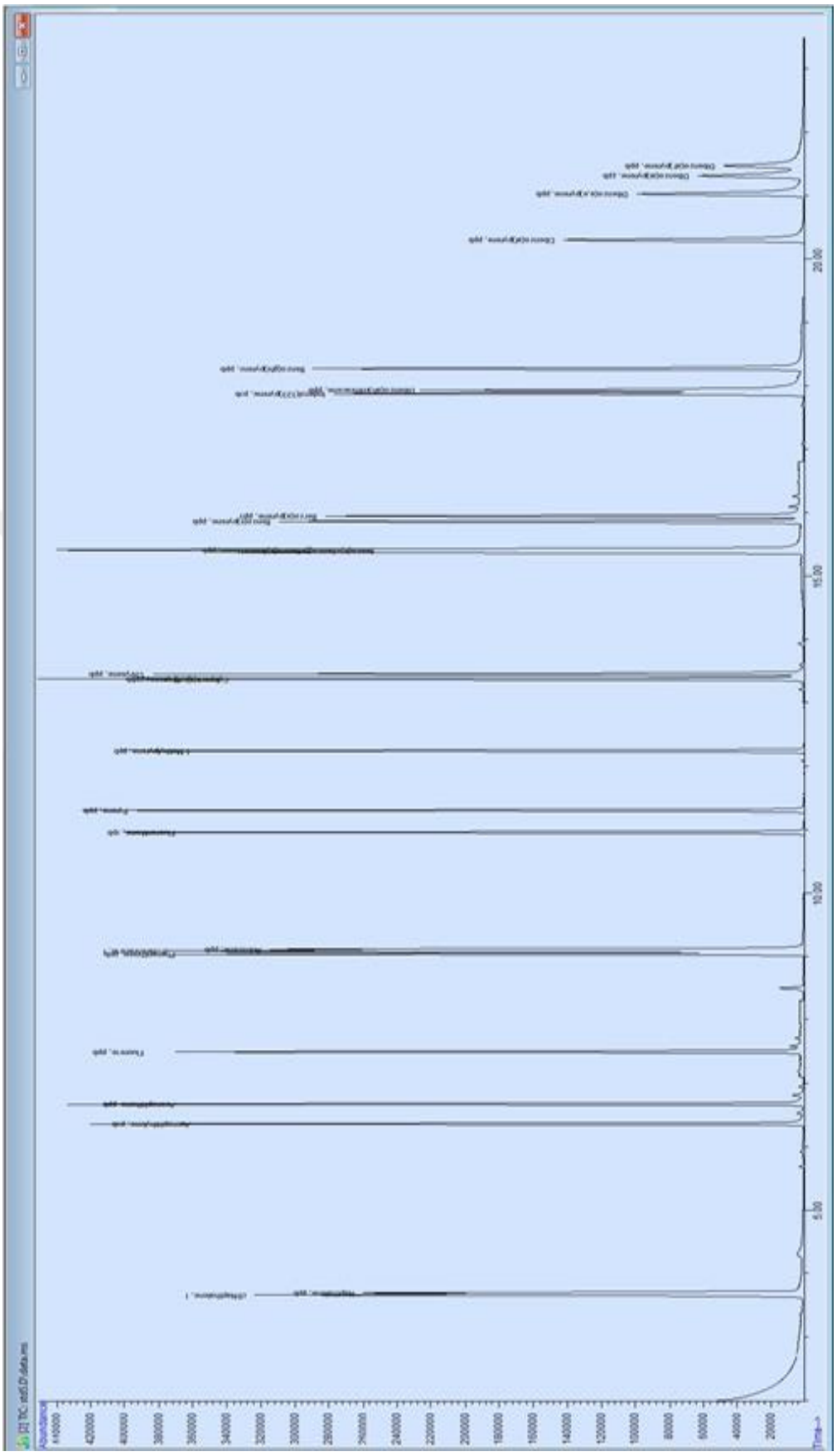
Tablo 3. 11: GCMS Cihaz Parametreleri

Parametreler	Değerler
ALS	
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
İnlets	
İnlet Sıcaklığı	280 °C
Gaz Koruma	20 ml/dk – 2 dk sonra
Temizleme Akışı	30 ml/dk – 2dk'da
İnlet Modu	Basınçlı toplam
Kolon Türü	DB-EUPAH Fused Silica 0.14 µm / 20 m / ID: 0.18 mm
Kolon Akış Hızı	1,6 ml/min
Toplam Analiz Süresi	23,5 min
Dengelenme Süresi	0,5 min
Çözücü Gecikmesi	3 min
MS Modu	SIM
İyon Kaynağı Sıcaklığı	230 °C

GCMS SIM metot parametreleri Tablo 3.12' de verilmiştir.

Tablo 3. 12: GCMS SIM Parametreleri

PAH	Target ion (m/z)
Naftalin-d8 (ISTD)	136
Naftalin	128
Asenaftelen	152
Asenaften	153
Floren	166
Penantren	178
Antrasen	178
Antrasen-d10 (ISTD)	188
Floranten	202
Piren	202
1-Metilpiren	216
Siklopenta(c,d)piren	226
Benzo(a)antrasen	228
krizen	228
Benzo(b)floranten	252
Benzo(k)floranten	252
Benzo(j)floranten	252
Benzo(e)piren	252
Benzo(a)piren	252
İndeno(1,2,3-cd)piren	276
Dibenz(a,h)antrasen	278
Benzo(ghi)perilen	276
Dibenzo(a,l)piren	302
Dibenzo(a,e)piren	302
Dibenzo(a,i)piren	302
Dibenzo(a,h)piren	302



Şekil 3. 13: PAH Toplam İyon Kromotografı (TIC)

3.6. Zebra Balığı Embriyolarında Maruziyet Deneyleri

3.6.1. Zebra balıkları bakım ve beslenme prosedürü

Çalışmamızda Boğaziçi Üniversitesi'nden temin edilen ve ZEBTEC akvaryum sisteminde barındırılan yetişkin yabani tip AB suşu zebra balıkları kullanılmıştır. Zebra balıkları bilgisayar kontrollü ZEBTEC akvaryumda barındırılmıştır (Şekil 3.14). Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadiyen ritimleri oluşturulmuştur. Sıcaklık ve nem sırasıyla 28 ± 1 ºC ve % 61 olarak ayarlanmış ve otomasyon sitemle sabit tutulmuştur. Sistemin suyunun pH'sı 6,9-7,2 arası ayarlanmış ve sabit tutulmuştur. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon sistemi ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Günde iki kez kuru yem ve bir kez de canlı yem ile toplam üç kez beslenmişlerdir.



Şekil 3. 14: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

3.6.2. Zebrabalıklarından embriyo eldesi

Fotoperiyodik üreme özellikleri gösteren zebra balıkları havanın aydınlanması ile beraber üreme davranışını başlatırlar. Dişi ve erkek zebra balıkları, koordineli bir şekilde yumurtlama ve sperm salınımı davranışlarına başlar. Erkek zebra balıkları, daha ince vücut yapıları, vücutları boyunca gümüşi bantlar ve bantlar üzerinde turuncu ile kırmızımsı renk tonları ile dişiler farklılık gösterir. Dişiler yumurtaları nedeni ile şişkin olan karın yapıları ile erkeklerden farklıdır. Embriyo eldesi için bir gece önceden aktif erkek balıklar ve karnı şişkin gözüken dişiler seçilerek çiftleştirme tanklarına alınırlar (Şekil 3.15). Dişilere erkeklerin oranı 2:1 olacak şekilde seçilen balıklar aralarına aparat konarak ayrılırlar Bu şekilde dişiler ile erkeklerin karışımı önlenmiş olur. Havanın aydınlanması ile aradaki kapı yarım saat sonra kaldırılır ve aralıklı olarak tankın dibi kontrol edilir. Döllenmiş embriyolar eşleştirme tankları altında delikler bulunan bölme sayesinde tankın dibinde toplanır ve döllenmiş ve uygun gelişim düzeyindeki embriyolar stereomikroskop altında seçilerek ayrılır. Embriyolar E3 embriyo ortamında 28 ^{0}C'de etüvde saklanır.



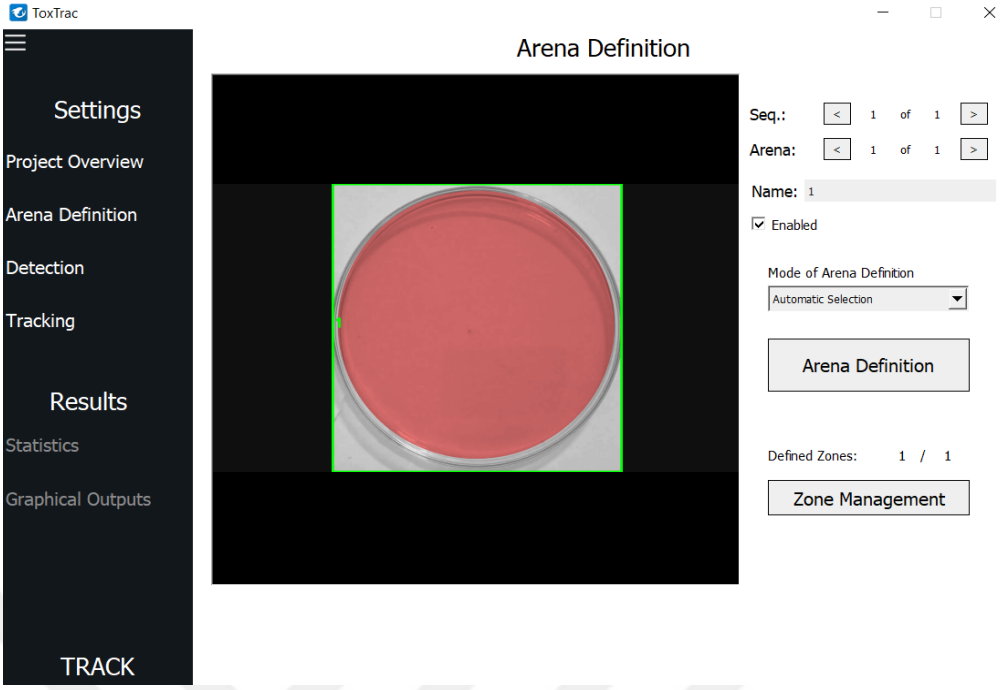
Şekil 3. 15: Zebra Balığı Çiftleştirme Tankı

3.6.3. Maruziyet uygulanması

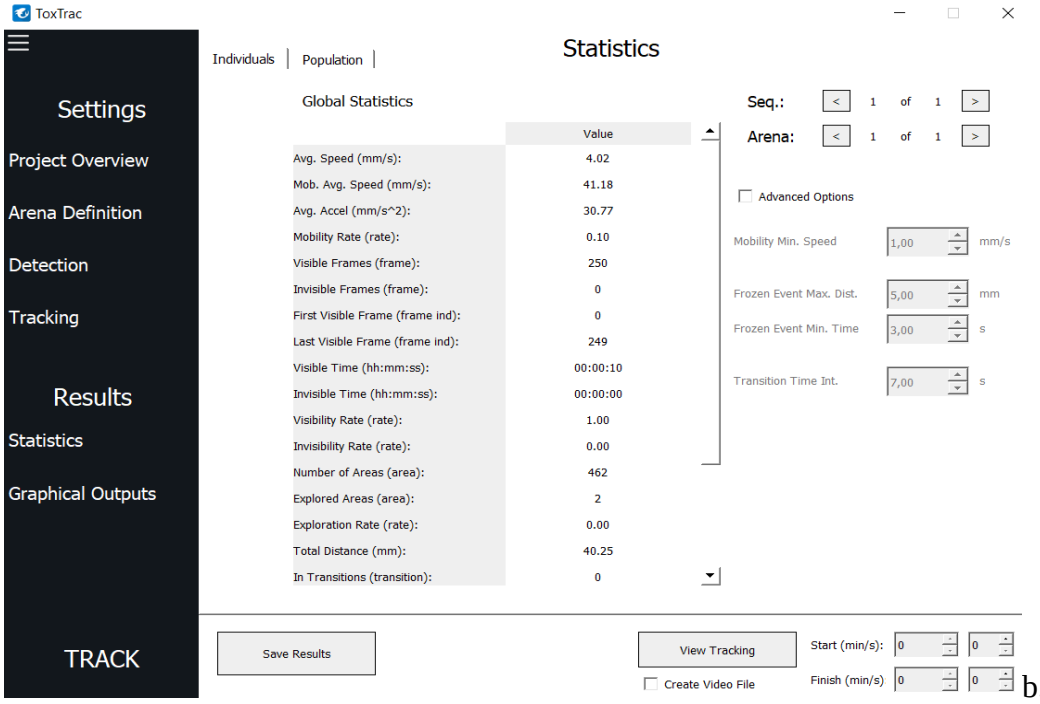
Embriyolar 24 kuyucuklu platelerin içine her bir kuyucuğa 20 embriyo olacak şekilde konmuşlardır. Her bir doz için 3 tekrar çalışılmıştır. Dietil fitalata (DEP) 5 mg/L (85); butil benzil fitalata (BBP) 1 mg/L (86); diizononil fitalata (DINP) 1 mg/L (87); Kadmiyumda 1 mg/L (88) ; Arsenikte 20 µg/L (89) ve kurşun için 50 µg/L (90) olacak şekilde dozlar belirlenmiştir. 72 saat boyunca izlenen embriyolarda meydana gelen anomaliler Zeiss Sterio Discovery V8 mikroskopta görüntülenip, ölüm-kalım oranı her gün not edilmiş ve her kuyucuğun çözeltisi her gün değiştirilmiştir.

3.7. Lokomotor aktivite testi

Maruziyet grupları ve kontrol grubu arasında hareketliliğe dair değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite testi uygulanmıştır. Bu uygulama sırasında 72 saatlik zebra balığı (embriyolar genelde 48 saatin sonunda koryondan çıktığı için 72 saatlikler tercih edilmiştir) embriyosu petrinin merkezine yerleştirilir. Sivri uçlu bir cisim yardımıyla kuyruklarına dokunulur ve kat ettikleri mesafeyi ölçmek için üstten kamera kaydı yapılır. Alınan kamera kayıtları öncelikle Kinovea programında takip edildi ardından ToxTrac programı ile görüntüler analiz edildi. Daha somnra ToxTrac programı ile elde edilen numerik verilerinin istatistiksel analizi yapıldı (Şekil 3.16).



a.



b.

Şekil 3. 16: ToxTrac programı ile 72 hpf' de embriyoların davranış analizleri için ayarların yapılması ve embriyoların izlenmesi

3.8. Homojenat hazırlama

Maruziyet sonrası embriyolar oksidan/antioksidan parametrelerin tayini için demir bilyeler ve homojenizatör yardımıyla homojenize edilmişlerdir. Bu işlem öncesinde hayvanlara anestezi uygulanmıştır. Anestezi işlemi için Tricane (Sigma A5040) kimyasalı kullanılmıştır. Tricane çözeltisi, 400 mg Tricane, 97.9 ml distile su, 2,1 ml 1 M Tris ile hazırlanarak pH: 7'ye ayarlanmıştır. 1 ml serum fizyolojik çözeltisinin içinde 100 embriyo olacak şekilde hazırlanan homojenatlar -20 ^{o}C'de kullanılacağı güne kadar muhafaza edilmiştir.

3.9. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

3.9.1. Total protein tayini

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Mavi rengin koyuluğu protein konsantrasyonu ile orantılıdır (91).

Gerekli Çözeltiler

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi; 0.4 g NaOH az miktarda suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür, hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi: 1 g bakır sülfat distile suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2): 2 g sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

B çözeltisi: % 1'lik bakır sülfat çözeltisi ile % 2'lık sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır.

C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır. Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat x2H_2O, 50 ml % 85 g lik fosforik asit, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li_2SO_4 ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır. (çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır.

Serum fizyolojik (% 0,9 NaCl): 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. Protein stok standart çözeltisi (% 100' lük albumin çözeltisi):100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (% 100' lük albumin çözeltisi): 100 mg albumin az miktarda serum fizyolojikde çözüldükten sonra hacmi 100 ml tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

5 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3. 13: Total Protein Tayin Yöntemi

	Numune	**% 5 Albumin**	**% 10 Albumin**	**% 15 Albumin**	**Kör**
Albumin (%100)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (veya süpernatanat)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0.5 ml
Toplam hacim	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Vortekste karıştırılır.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin ayıracı	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilir. 30 dakika sonunda 500 nm de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

3.9.2 Lipit peroksidasyon (LPO) tayini

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir (92).

Gerekli Çözeltiler

NaOH (1 M): 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 ml ye tamamlanır.

TBA çözeltisi (0.047 M): 500 mg TBA, 6 ml 1 M'lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl deki): 20 ml TCA (% 100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır. Hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı

2 tane deney tüpü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir. Aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3. 14: Lipit Peroksidasyon Tayin Yöntemi

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0.25 ml	-
TCA	1.25 ml	-
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0.75 ml	-
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-butanol	2 ml	1 ml

Tüm çözeltiler ilave edilerek vortekslenir ve 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir.1ml butanol fazı alınarak 532 nm'de cam küvette köre karşı absorbanslar okunur

ve kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56x10^5$ $M^{-1}cm^{-1)}$ kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

3.9.3. Total Nitrik Oksit Tayini

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülür (93).

Gerekli Çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri 50 ml' ye tamamlanır.

% 10'luk $ZnSO_4$: 5 g $ZnSO_4$ ya da 8,9 g $ZnSO_4.7\ H_2O$ tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri 50 ml tamamlanır.

1 M HCl: 4,20 ml HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

VCl_3: 0,4 g VCl_3 bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzeri aynı çözelti ile 50 ml' ye tamamlanır.

% 5 ' lik HCl: 2,86 ml % 37'lik HCl pipet ile çekilerek balon jojeye alınır ve üzeri su ile 25 ml ye tamamlanır.

%2'lik SULF(Sülfanilamid): 0,5 g Sülfanilamid tartılır, 25ml % 5' lik HCl içerisinde çözülür.

%0,1'lik N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözülür ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 ml süpernatant alınır, üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir. 0,3 ml % 10'luk $ZnSO_4$ ilave edilir ve vortekslenir. +4'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4'de 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. İki adet deney tüpü anılır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 3. 15: Nitrik oksit tayin yöntemi

	Numune	Kör
Deprotenize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,6 ml
VCl_3	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dk 37 °C'de etüvde inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm'de absorbans kaydedilir. Sonuçlar 53000 M^{-1}/cm^{-1} ekstinsiyon katsayısı ile µmol/ L cinsinden hesaplanır.

3.9.4. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Prensip: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD

aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (94).

Gerekli Çözeltiler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.8): 0.136 g KH_2PO4 ve 0.697 g K2HPO4 tartılıp ayrı ayrı az miktarda distile suda çözülür, birleştirilir ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7.8'e ayarlanır) (2˚C de saklanır).

Fosfat tamponu + 0.1 mM'lık Na-EDTA: 0.0037 g Na-EDTA tartılır 50 mM'lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH= 7.5): 0.041 g KH_2PO_4 ve 0.122 g K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı distile su içinde çözülür, birleştirilir. Hacmi 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7.5'e ayarlanır) (2˚C de saklanır).

Riboflavin (0.2 mM): 7.5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (100 mM'lık, pH=7.5) çözülür.

o-dianisin (6 mM): 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin Yapılışı: Doku süpernatantı gerekirse serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. % 10' luk embriyo 10 dakika 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınır tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır.

Tablo 3. 16: Süperoksit Dismutaz Tayin Yöntemi

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu EDTAlı (pH = 7,8)	2,6 ml	2,6 ml
o- dianisidin	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	--	0.1 ml
--	--	--
Dilue süpernetant	0.1 ml	--
Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konur, vorteksle karıştırılır. Plastik makro küvette 460 nm 'de absorbans okunur		
Sonra deney tüpleri oda sıcaklığında 20 W Floresan lamba bulunan kutu içinde 8 dakika inkübe edilir. 460 nm'de absorbans okunur.		

NOT: Lamba 20 dakika önceden açılır ve ısınması sağlanır.

3.9.5. Asetikolin Esteraz Aktivitesi

Asetilkolin esteraz'ın asetilkoline hidrolizi sonucu kolin ve asetat oluşur. Bu reaksiyonun katalizi sonucu oluşan renk spektrofotometre ile absorbans olarak ölçülür (95)

Fosfat Tamponu: (100mM Ph:8.0)

1,070 gr Na_2HPO_4 ve 0,295 gr NaH_2PO4 alınır ve 80 ml distile suda çözülür. pH 8' e ayarlanarak son hacim 100 ml ye tamamlanır.

DTNB: (0,01M) 39.6 mg DTNB 10 ml (0,1M pH:7.0) fosfat tamponunda çözülür. Ardından 15 mg sodyum bikarbonat ilave edilir.

Asetiltiyokolin iyodür: (0,88mM) 12.1 mg asetiltiyokolin iyodür tartılır ve 50 ml distile suda çözülür. (15 güne kadar +4C de saklanabilir). 12.1 mg asetiltiyokolin iyodür tartılır 25 ml distile suda çözülür.

Tablo 3. 17: Asetikolin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemi

	Numune	**Kör**
Fosfat Tamponu	1300ul	1300ul
DTNB	50ul	50ul
Örnek	200ul	----
Absorbanstaki artışın sabitlenmesini beklenir (yaklaşık 15 dk)		
Asetiltiyokolin iyodür (substrat)	10ul	10ul
Serum fizyolojik	---	200ul

412 nm'de dakika başına 7 dakika boyunca absorbans alınır.

Hesaplama: 5.74*(10^-4)*ΔA/Co

Co: Dokunun ilk konsantrasyonu (mg/ml)

ΔA: Ortalama absorbans farkı

3.10. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi 72 saatlik embriyolarda yapılmıştır. Embriyolar RLT Lizis tamponu homojenize edilmiştir. Bu homojenatlardan mRNA elde edilerek (RNA-easy kit, Qiagene) sonrasında cDNA sentezi yapılmış ve tp53, bax, tnf α, bdnf genleri ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagene, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagene, Almanya) ile analiz edilmiştir. cDNA eldesi SuperScript™ IV kiti ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz edilecek genlerin ifadeleri, RT2 SYBR Green Master Mix karışımına elde edilen cDNA örneklerinin eklenmesi şeklinde Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Housekeeping gen olarak actb1 kullanılmıştır. Örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır. Verilerin analizi housekeeping gen β-aktin ile normalizasyona dayalı delta delta CT (ΔΔCT) metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntem ile PCR'da

belirlenen eşik değer döngü sayısı (threshold cycle number = Ct), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki Ct değer farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip ΔΔCt oranı belirlenerek bulunur. "Housekeeping" genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β-aktin, albumin, β-globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Çalışmamızda housekeeping gen olarak β-aktin kullanılmıştır. Karşılaştırmalı Ct metodu aynı zamanda $2^{-\,[delta][delta]Ct}$ olarak bilinmektedir (96)

[delta] [delta] C_t = [delta] $C_{t,örnek}$ - [delta] $C_{t,referans}$

Bu formülde [delta]$C_{T,örnek}$; ilgilenilen örneğe ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değer farklılığıdır. [delta]$C_{T,referans}$ ise kontrole ait Ct değeri ile housekeeping genin Ct değer farklılığıdır (96)

3.11. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi One Way Anova sonrası Post Hoc Tukey Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak Graph Pad 9 İstatistik programı ile yapılmıştır. Sonuçlar Ortalama±Standart Sapma şeklinde verilmiş ve $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. Bulgular

4.1. Giysi ve Ayakkabı Bileşenlerine Uygulanan İşlemler Sonucu Tere Geçiş Yapan EBK Analiz Sonuçları

4.1.1 Tarama sonrasında pozitif numune sonuçları

1000'den fazla numune uluslararası standartlarda belirtilen yöntemler ile analiz edilmiştir (78-81). Tere geçişlerini gözlemlemek için uygun bulunan 35 numune çalışmanın devamı için seçilmiştir. Numunelerin tamamı 3 EBK grubu içinde değerlendirilmiştir ancak çalışmamıza konu olan fitalat, ağır metal ve PAH gruplarından sadece bir gruba ait EBK'lar tespit edilmiştir. Bu yüzden her bir test grubunda farklı numuneler kullanılmıştır. Pozitif sonuçların ağırlıklı olarak baskı, ayakkabı, suni deri ve tekstil ürünlerinde bulunan aksesuarlardan kaynaklığı görülmüştür.

Sıcaklık ve sürenin tere fitalat ve ağır metal geçişinde önemli iki parameter olduğu görülmüştür. Değerlendirmeler sonrasında deney süresi her bir numune için 14 gün, sıcaklık ise 37^0C olarak seçilmiştir.

4.1.2 Ter çözeltisine migre olan ağır metal sonuçları

Numuneler 14 gün ve 37^0C sıcaklıkta ter çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra, alınan ter örnekleri ICP-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, 4,63mg/kg miktarında arsenik içerdiği tespit edilen açık gri baskılı kumaştan 0,111mg/L miktarının tere geçtiği, 9,74 mg/kg miktarında arsenik içerdiği tespit edilen yeşil baskılı kumaştan 0,310 mg/L miktarının tere geçtiği, 20,12 mg/kg miktarında Arsenik içerdiği tespit edilen ayakkabı iç tabanından 0,137 mg/L miktarının tere geçtiği,11,84 mg/kg miktarında arsenik içerdiği tespit edilen yeşil kumaştan 0,484

mg/L miktarının tere geçtiği, 2,64 mg/kg miktarında kadmiyum içerdiği tespit edilen siyah baskılı kumaştan 0,08 mg/L miktarının tere geçtiği, 2,87 mg/kg miktarında Kadmiyum içerdiği tespit edilen mavi dokuma kumaştan 0,033 mg/L miktarının tere geçtiği,3,90 mg/kg miktarında kadmiyum içerdiği tespit edilen gri kumaştan 0,024 mg/L miktarının tere geçtiği, 2,7 mg/kg miktarında kadmiyum içerdiği tespit edilen mavi baskılı kumaştan 0,015 mg/L miktarının tere geçtiği, 3,44 mg/kg miktarında kurşun içerdiği tespit edilen gri metraj baskılı kumaştan 0,059 mg/L miktarının tere geçtiği, 11,8 mg/kg miktarında kurşun içerdiği tespit edilen açık kahverengi suni deri (PU) kumaştan 0,157 mg/L miktarının tere geçtiği, 3,2 mg/kg miktarında kurşun içerdiği tespit edilen siyah baskıdan 0,071 mg/L miktarının tere geçtiği, 7,25 mg/kg miktarında kurşun içerdiği tespit edilen kahverengi suni deri (PU) kumaştan 0,044 mg/L miktarının tere geçtiği, 1,89 mg/kg miktarında kurşun içerdiği tespit edilen sarı kumaştan 0,087 mg/L miktarının tere geçtiği görülmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1: Ağır Metal Çalışma Sonuçları

	Tanım	Metal	Miktar (mg/kg)	Tere Geçen Miktar (mg/L)
1	Açık gri baskılı kumaş	As	4,63	0,111
2	Yeşil baskılı kumaş	As	9,74	0,310
3	Ayakkabı iç tabanı	As	20,12	0,137
4	Kırmızı baskılı kumaş	As	8,96	0,121
5	Yeşil kumaş	As	11,84	0,484
6	Siyah baskılı kumaş	Cd	2,64	0,080
7	Mavi dokuma kumaş	Cd	2,87	0,033
8	Gri kumaş	Cd	3,90	0,024
9	Mavi baskılı kumaş	Cd	2,70	0,015
10	Turuncu kumaş	Cd	14,85	0,080
11	Gri metraj baskılı kumaş	Pb	3,44	0,059
12	Açık kahverengi suni deri (PU) kumaş	Pb	11,80	0,157
13	Siyah baskı	Pb	3,20	0,071
14	Kahverengi suni deri (PU)	Pb	7,25	0,044
15	Sarı kumaş	Pb	1,89	0,087

4.1.3 Ter çözeltisine göç eden fitalat sonuçları

Numuneler 14 gün ve 37^0C sıcaklıkta ter çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra, diklorametan ile ekstrakte edilmiş ve GC-MS cihazı ile analizleri yapılmıştır. Buna göre; 38895 mg/kg miktarında DEHP ve 518,5 mg/kg miktarında DBP içerdiği tespit edilen simli gri renkli poliüretan kumaştan sırasıyla 468,3 mg/L ve 10,8 mg/L miktarlarının tere geçtiği, 23705 mg/kg miktarında DEP içerdiği tespit edilen siyah bağcık ucundan 201,7 mg/L miktarının tere geçtiği, 5516,3 mg/kg miktarında DINP içerdiği tespit edilen açık kahverengi poliüretan kumaştan 25,8 mg/L miktarının tere geçtiği, 5905,7 mg/kg miktarında DIBP içerdiği tespit edilen siyah ayakkabı iç tabanından 91,8 mg/L miktarının tere geçtiği, 43237,0 mg/kg miktarında DEP içerdiği tespit edilen açık mavi renkli düğmeden 108,2 mg/L miktarının tere geçtiği, 1158,4 mg/kg miktarında BBP, 262,35 mg/kg miktarında DEHP ve 15727,1 mg/kg miktarında DINP içerdiği tespit edilen siyah renkli baskılı kumaştan sırasıyla 10,1 mg/L, 351,9 mg/L ve 174,4 mg/L miktarlarının tere geçtiği, 987,3 mg/kg miktarında DEHP içerdiği tespit edilen beyaz kumaş üzerine kırmızı baskıdan 15,8 mg/L miktarının tere geçtiği,12351,8 mg/kg miktarında BBP içerdiği tespit edilen mavi kumaş üzeri siyah baskıdan 28,4 mg/L miktarının tere geçtiği, 44074,8 mg/kg miktarında DEHP içerdiği tespit edilen siyah poliüretan suni deriden 28,4 mg/L miktarının tere geçtiği, 2376 mg/kg miktarında BBP içerdiği tespit edilen mavi kumaş üzeri siyah baskıdan 40,1 mg/L miktarının tere geçtiği tespit edilmiştir (Tablo 4. 2).

Tablo 4. 2: Fitalat Çalışma Sonuçları

	Tanım	Fitalat	Miktar (mg/kg)	Tere Geçen Miktar (mg/L)
1	Simli gri renkli poliüretan kumaş (ayakkabı)	DEHP	38895,0	468,3
		DBP	518,5	10,8
2	Siyah bağcık ucu	DEP	23705,0	201,7
3	Açık Kahverengi poliüretan kumaş	DINP	5516,3	25,8
4	Siyah ayakkabı iç taban	DIBP	5905,7	91,8
5	Açık Mavi düğme	DEP	43237,0	108,2
6	Siyah renkli baskılı kumaş	BBP	1158,4	10,1
		DEHP	26235,2	351,9
		DINP	15727,1	174,4
7	Beyaz kumaş üzerine kırmızı baskı	DEHP	987,3	15,8
8	Mavi kumaş üzeri siyah baskı	BBP	12351,8	28,4
9	Siyah poliüretan suni deri	DEHP	44074,8	213,7
10	Beyaz kumaş üzeri çok renkli baskı	BBP	2376,0	40,1

4.1.3 PAH analiz sonuçları

7 ve 14 gün süre ile ve 37 ve 60^0C sıcaklıklarda yapılan ön çalışmalarda PAH içerden örneklerden yapay ter çözeltisine tekrarlanabilir ve anlamlı bir migrasyon gözlemlenmemiştir. Çalışmada kullanılan siyah suni deride 0,26 mg/kg Floranten, 0,59 mg/kg Fenantren ve 0,20 mg/kg Piren, kahverengi suni deride 0,55 mg/kg Fenantren, plastik baskıda 0,31 mg/kg Floranten ve 0,57 mg/kg Fenantren, siyah suni deride 0,45 mg/kg Floranten ve 0,66 mg/kg Fenantren, turkuaz renkli cırt cırtta 0,46 mg/kg Krizen, 1,03 mg/kg Fenantren ve 0,49 mg/kg Piren, düğmede 0,2 mg/kg Siklopenta(c,d)piren, 0,915mg/kg Naftalin, 0,1 mg/kg Fenantren ve 0,3 mg/kg Piren, lila renkli baskıda 0,63 mg/kg Floranten ve 0,82 mg/kg Fenantren, açık pembe renkli suni deride 11,66 mg/kg Naftalin, sünger dolgu malzemesinde 0,64 mg/kg Naftalin, mor ayakkabı tabanında 0,95 mg/kg Asenaften, 0,53 mg/kg Asenafetilen, 1,59 mg/kg Antrasen, 2,52 mg/kg Floranten, 1,29 mg/kg Floren, 3,90 mg/kg Fenantren ve 3,16 mg/kg Piren içerdikleri tespit edilmiştir. Seçilen numunelerin içerdikleri PAH türleri ve miktarları Tablo 4.3’ te verilmiştir.

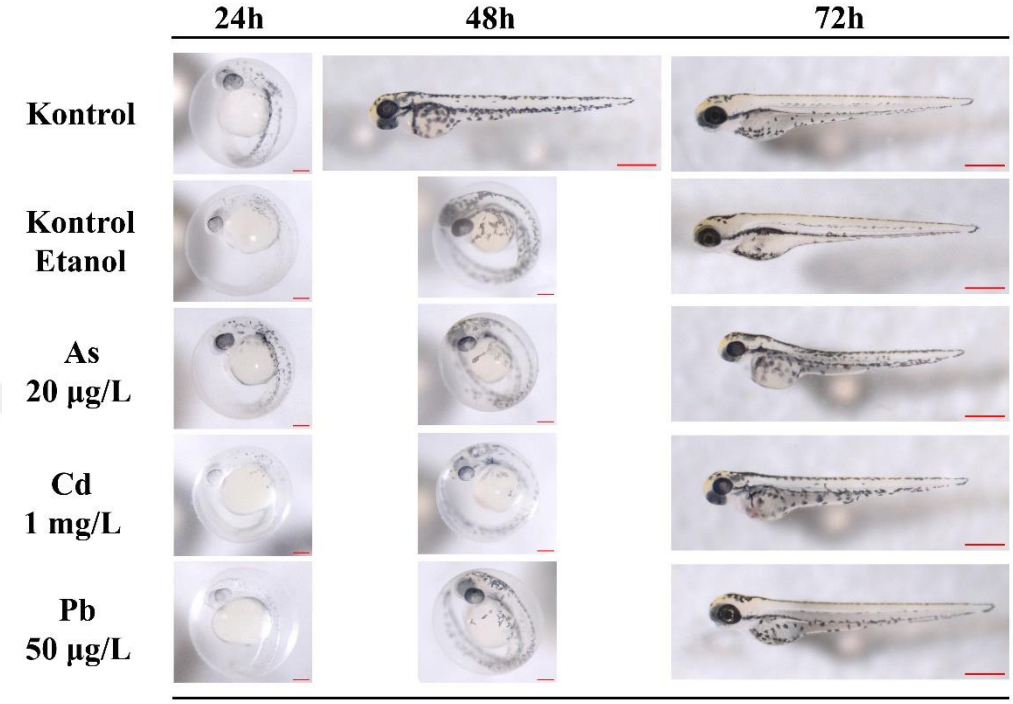
Tablo 4. 3: PAH Çalışması Sonuçları

	Tanım	PAH	Miktar (mg/kg)
1	Siyah Suni Deri (PU)	Floranten	0,26
		Fenantren	0,59
		Piren	0,20
2	Kahverengi Suni Deri (PU)	Fenantren	0,55
3	Plastik baskı	Floranten	0,31
		Fenantren	0,57
4	Siyah Suni Deri (PU)	Floranten	0,45
		Fenantren	0,66
5	Turkuaz cırt cırt	Krizen	0,46
		Fenantren	1,03
		Piren	0,49
6	Düğme	Siklopenta(c,d)piren	0,2
		Naftalin	0,915
		Fenantren	0,1
		Piren	0,3
7	Lila baskı	Floranten	0,63
		Fenantren	0,82
8	Açık pembe suni deri	Naftalin	11,66
9	Sünger dolgu malzemesi	Naftalin	0,64
10	Mor ayakkabı tabanı	Asenaften	0,95
		Asenafetilen	0,53
		Antrasen	1,59
		Floranten	2,42
		Floren	1,29
		Fenantren	3,90
		Piren	3,16

4.2. Zebra Balığı Embriyosundaki Analizlerin Sonuçları

4.2.1. Maruziyet sonrası gelişim takibi

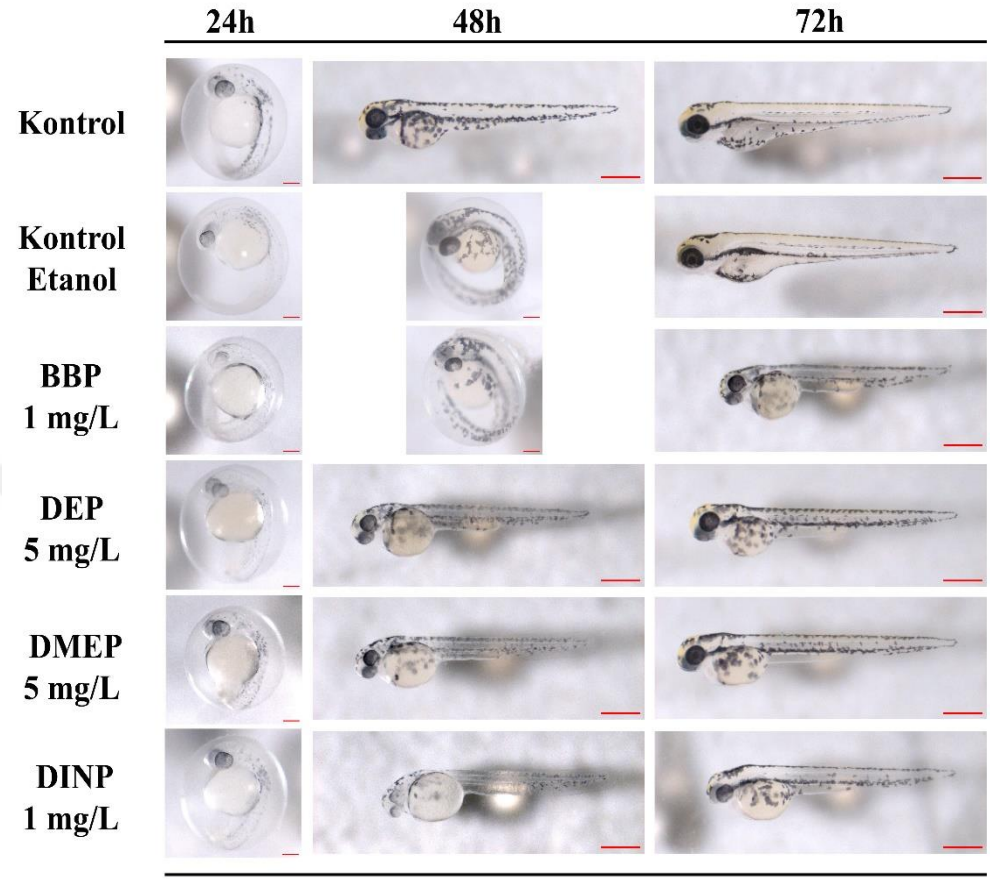
4.2.1.1. Ağır Metal Maruziyeti



Şekil 4. 1: Ağır Metal Maruziyeti Sonucu Zebrabalığı Embriyolarının Morfolojisi

Ağır metale maruz bırakılan zebra balıklarının 24, 48 ve 72 hpf' de gelişimleri izlenmiştir. Bunun sonucunda 50 µg/L Pb, 1mg/L Cd ve 20 µg/L As' ye maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında koryondan çıkmada gecikme görülmüştür. 1mg/L Cd grubunda 72 hpf' de kardiyak ödem tespit edilmiştir. 1mg/L Cd ve 20 µg/L As gruplarında 72 hpf' de omurgada eğrilik görülmüştür (Şekil 4.1).

4.2.1.2. Fitalat Maruziyeti

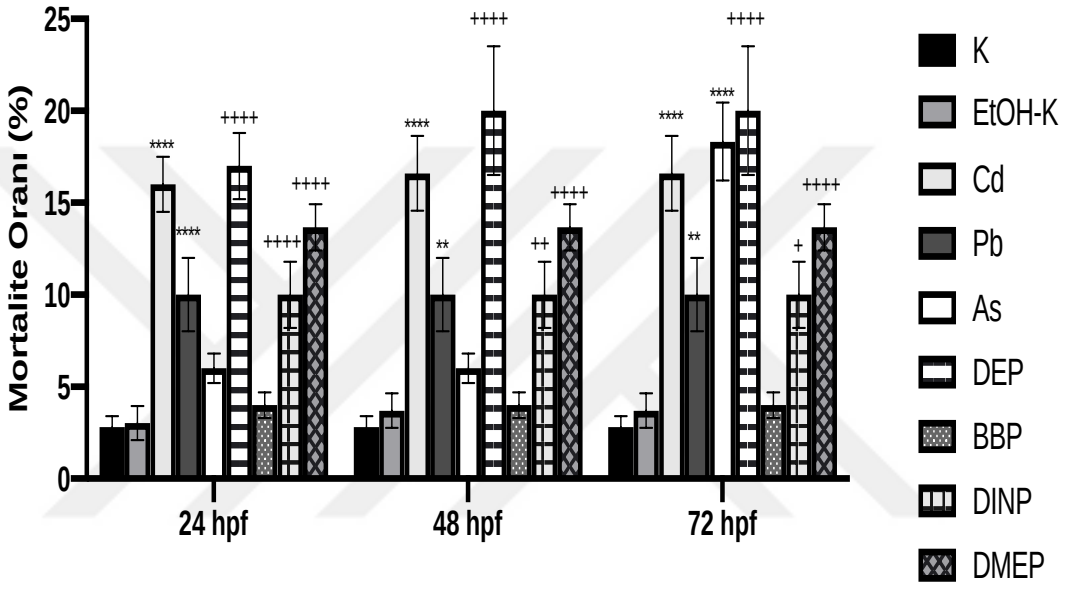


Şekil 4. 2: Fitalat maruziyeti sonucu Zebrabalığı embriyolarının morfolojisi

Zebra balığı embriyoları dört farklı fitalata maruz bırakılmıştır ve bunun sonucunda, 1mg/L BBP, 1mg/L DINP, 5 mg/L DEP ve 5mg/L DMEP dozları uygulanan gruplardan kontrole kıyasla 1 mg/L BBP grubunda koryondan çıkmada gecikme görülmüştür. Bunun yanı sıra 1 mg/L BBP grubunda 72 hpf' de kontrole kıyasla embriyonun boyunun daha kısa olduğu görülmüştür. 1 mg/L DINP grubunda 72 hpf' de kontrole kıyasla boyda kısalık görülmüştür (Şekil 4.2).

4.2.2 Mortalite analizi sonuçları

24 hpf, 48 hpf ve 72 hpf' de mortalite oranları Cd, Pb, DINP ve DMEP gruplarında kontrol gruplarında göre anlamlı artış göstermiştir. As grubunda ise kontrole göre anlamlı derecede artış sadece 72 hpf' de gözlenmiştir (Şekil 4.3).

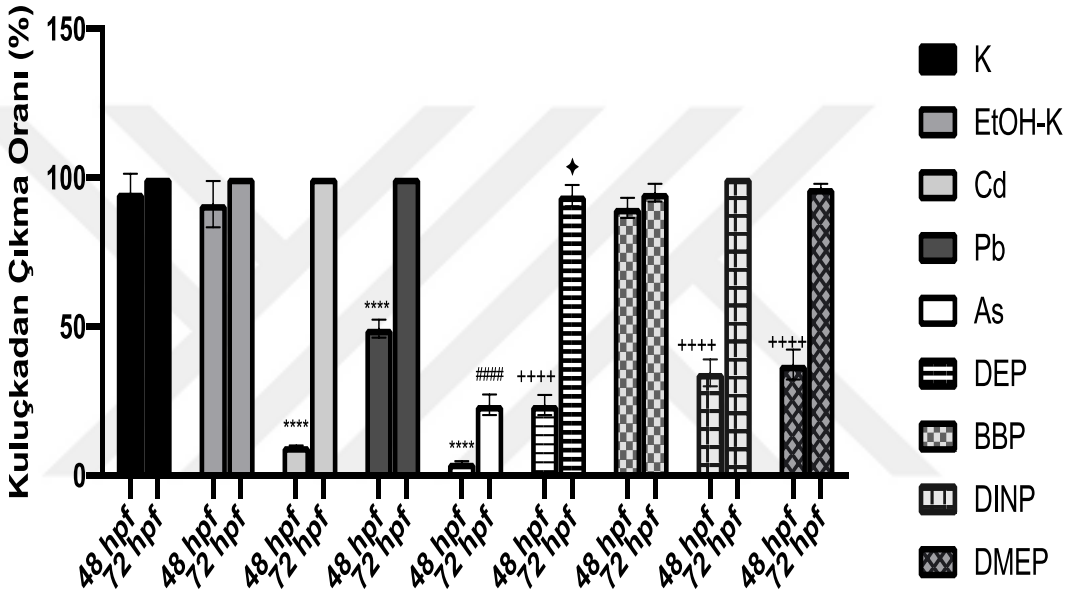


Şekil 4. 3: Grupların 24 hpf, 48 hpf ve 72 hpf mortalite oranları

******** p<0,0001 K Grubundan farklı; ****** p<0,01 K Grubundan farklı; $^{++++}$ p<0,0001 EtOH-K Grubundan farklı; $^{++}$ p<0,01 EtOH-K Grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05 EtOH-K Grubundan farklı; K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.2.3. Kuluçkadan çıkma analizi sonuçları

48 hpf' de kuluçkadan çıkma oranları Cd, Pb, As, DEP, DINP ve DMEP gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. 72 hpf' de kuluçkadan çıkma oranları ise As ve DEP gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (Şekil 4.4).



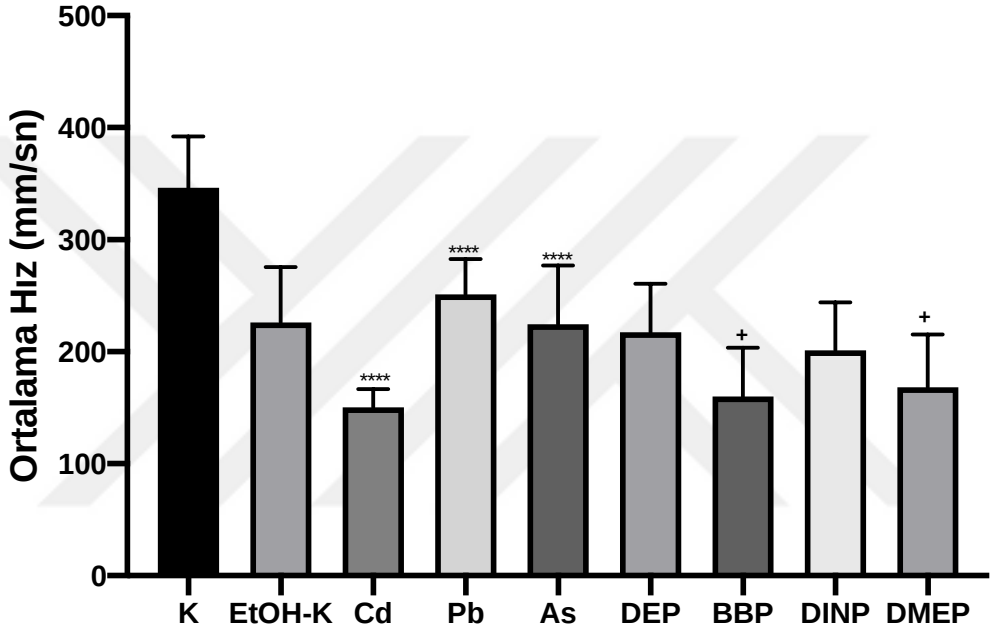
Şekil 4. 4: Grupların 48 hpf ve 72 hpf kuluçkadan çıkma oranları

******** p<0,0001 K Grubu 48 hpf'den farklı; #### p<0,0001 K Grubu 72 hpf'den farklı; ++++ p<0,0001 EtOH-K Grubu 48 hpf'den farklı; ✦ p<0,05 EtOH-K Grubu 72 hpf'den farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.2.4. Davranış Analizleri

4.2.4.1. Zebra Balığı Embriyolarının Maruziyet Sonrası Ortalama Hızları

Zebra balığı embriyolarında maruziyet sonrası ortalam hız kontrol grubuna kıyasla Cd, Pb ve As gruplarında anlamlı derecede azalmıştır. EtOH-K grubuna kıyasla BBP ve DMEP gruplarında ortalama hızda anlamlı derecede azalma görülmüştür (Şekil 4. 5).

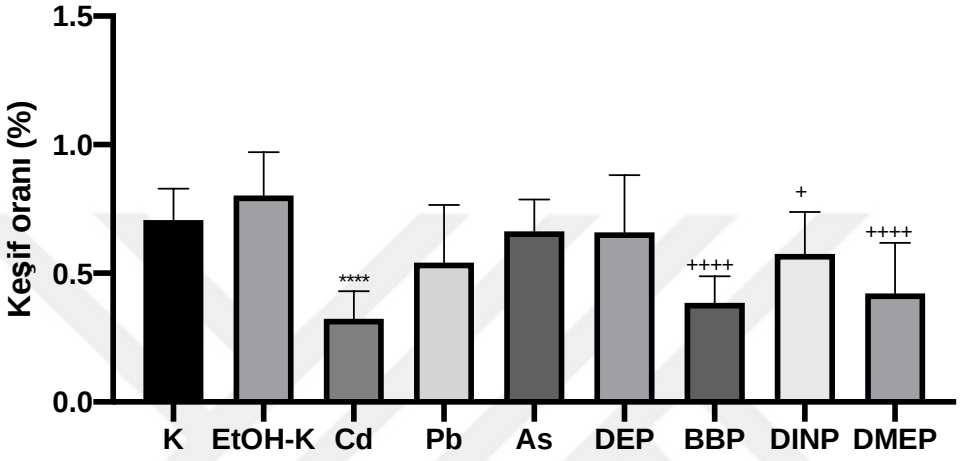


Şekil 4. 5: Grupların ortalama hız (mm/sn) karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi ****p<0,0001 Kontrol Grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05 EtOH-Kontrol Grubundan farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.2.4.2. Zebrabalığı Embriyolarının Maruziyet Sonrası Keşif Oranı

Zebrabalığı embriyolarında maruziyet sonrası yapılan davranış testlerinde kontrol ile kıyaslandığında Cd grubunda keşif oranında anlamlı derecede azalma görülmüştür. EtOH-K grubu ile kıyaslandığında BBP ve DMEP gruplarının keşif oranında anlamlı derecede artış görülmüştür (Şekil 4. 6).



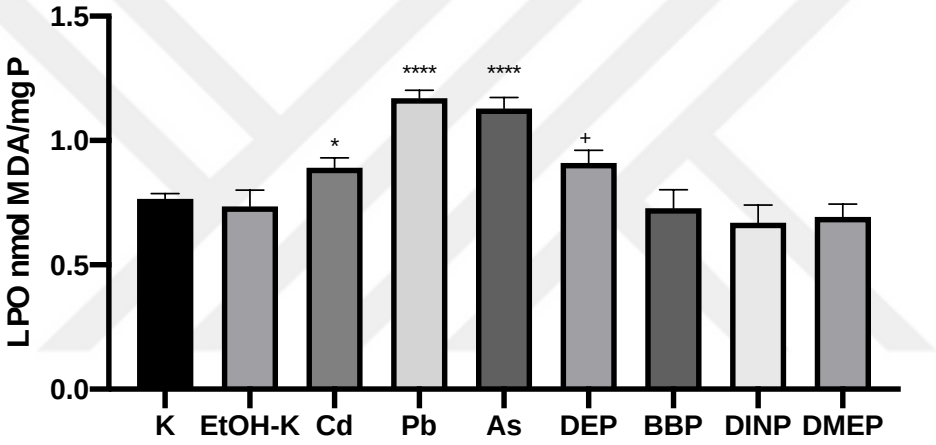
Şekil 4. 6: Grupların keşif oranları (%) karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi ****p<0,0001 Kontrol Grubundan farklı; $^{++++}$ p<0,0001 EtOH-Kontrol Grubundan farklı; $^{+}$ p<0,05 EtOH-Kontrol Grubundan farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.3. Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları

4.3.1. Lipit peroksidasyon analizi sonuçları

Grupların lipit peroksidasyon (LPO) değerleri karşılaştırılması Şekil 4.7'de verilmiştir. Buna göre LPO değerleri kadmiyum, kurşun ve arsenik uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir (sırasıyla $p<0,05$; $p<0,0001$; $p<0,0001$). Fitalatlardan ise sadece DEP uygulanan grupta LPO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0,05$).



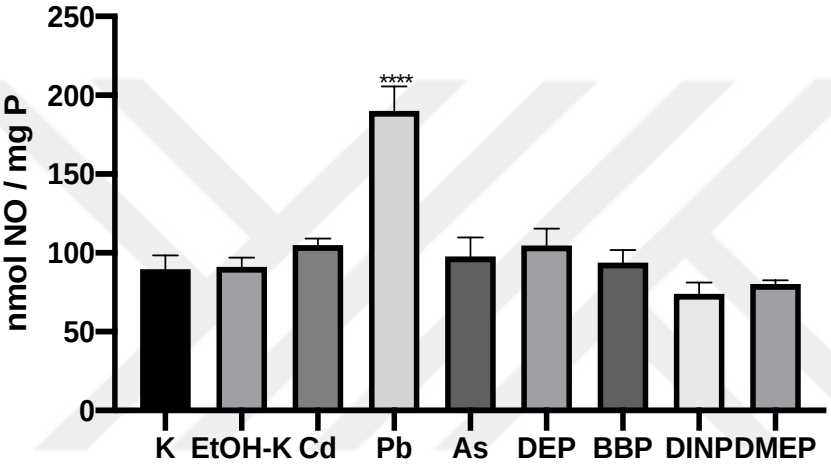
Şekil 4. 7: Grupların lipit peroksidasyon (LPO) değerleri karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n = 3, grup başına 100 embriyo). Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi.*$p<0,05$ Kontrol Grubundan farklı; ****$p<0,0001$ Kontrol Grubundan farklı; $^{+}$ EtOH-Kontrol Grubundan farklı

K K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.3.2.Nitrik oksit sonuçları

Grupların nitrik oksit (NO) değerleri karşılaştırılması Şekil 4.8'de verilmiştir. Buna göre NO değerleri sedece kurşun uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0,0001$). Diğer gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

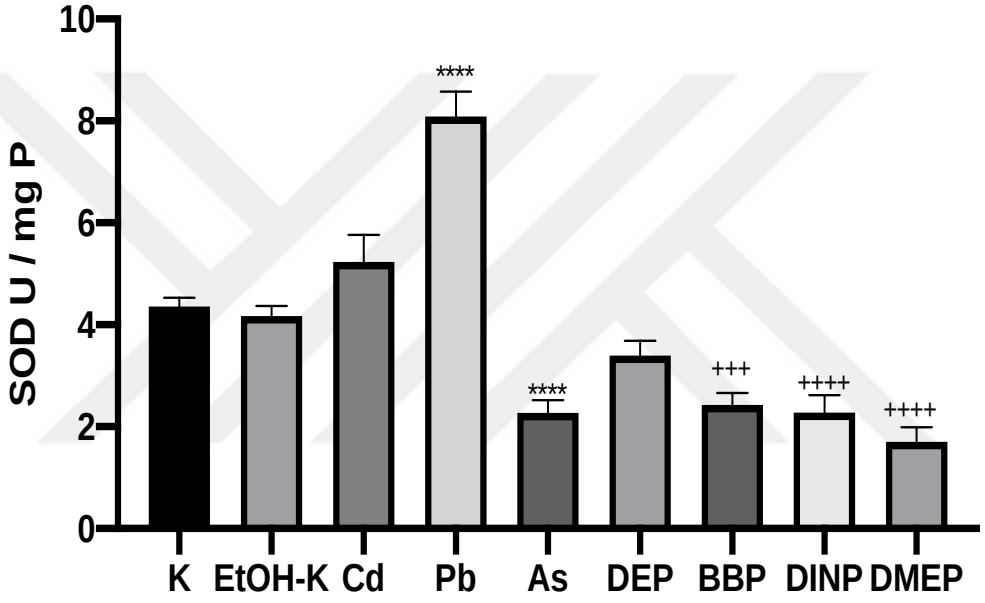


Şekil 4. 8: Grupların nitrik oksit (NO) değerleri karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n = 3, grup başına 100 embriyo).Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi***$p<0,001$ Kontrol Grubundan farklı; $^{+}$EtOH-Kontrol Grubundan farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.3.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi sonuçları

Grupların süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi karşılaştırılması Şekil 4.9'da verilmiştir. Buna göre SOD aktivitesi kurşun uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış gösterirken ($p<0,0001$) arsenik uygulanan grupta azalmıştır ($p<0,0001$). Fitalat gruplarında ise BBP, DINP ve DMEP gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,0001$; $p<0,0001$) DEP uygulanan grupta anlamlı fark belirlenmemiştir.

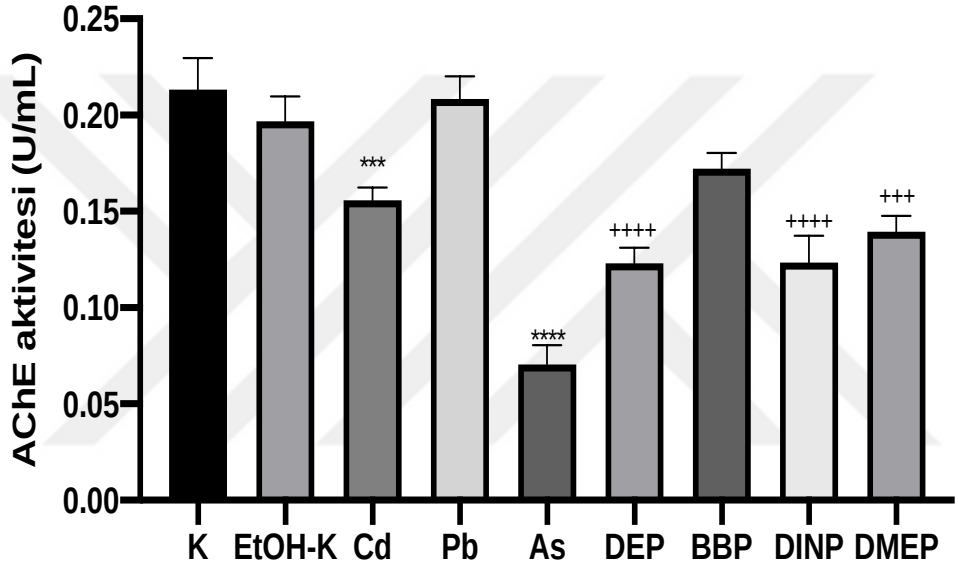


Şekil 4. 9: Grupların süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesi karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n = 3, grup başına 100 embriyo).Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi ****$p<0,0001$ Kontrol Grubundan farklı; $^{++++}$ $p<0,0001$ EtOH-Kontrol Grubundan farklı; $^{+++}$ $p<0,001$ EtOH-Kontrol Grubundan farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.3.4.Asetilkolin esteraz aktivitesi sonuçları

Grupların asetilkolin esteraz (AChE) aktivitesi karşılaştırılması Şekil 4.10'da verilmiştir. Buna göre AChE aktivitesi kadmiyum uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,001$). Fitalat uygulanan gruplarda ise DEP, DINP ve DMEP gruplarında AChE aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (sırasıyla $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p<0,001$) BBP uygulanan grupta anlamlı fark belirlenmemiştir.



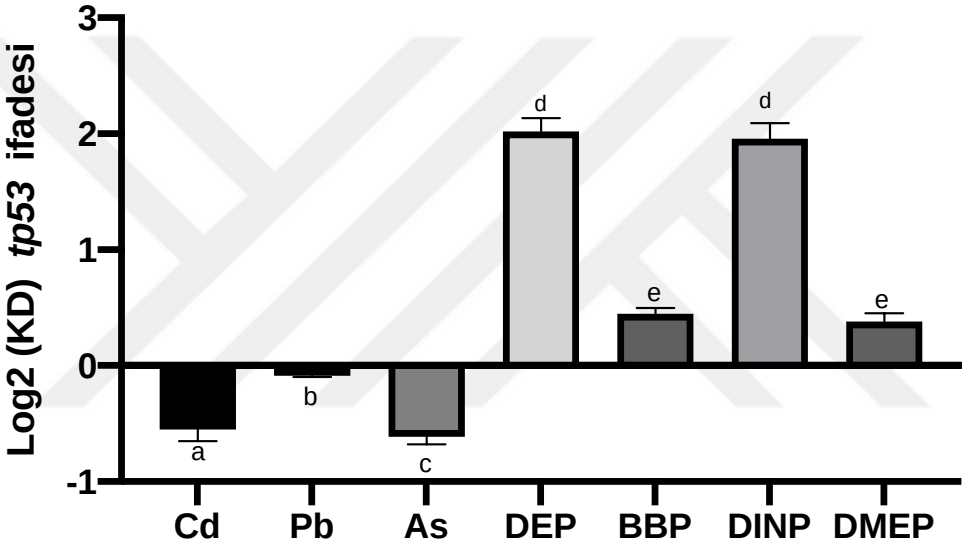
Şekil 4. 10: Grupların asetil kolin esteraz (AChE) aktivitesi karşılaştırması

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n = 3, grup başına 100 embriyo).Tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA (faktör: uygulanan ajanlar) ile gruplar arası fark belirlendi ve sonrasında Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar değerlendirildi***$p<0,001$ Kontrol Grubundan farklı; ****$p<0,0001$ Kontrol Grubundan farklı; $^{++++}p<0,0001$ EtOH-Kontrol Grubundan farklı; $^{+++}p<0,001$ EtOH-Kontrol Grubundan farklı. K: Kontrol; EtOH-K: Etanol Kontrol; DEP: Dietil fitalat; BBP: Butil benzil fitalat; DINP: Diizononil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.4. Gen İfadesi Sonuçları

4.4.1. Tp53 gen ifadesi analizi

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen *tp53* ifadeleri Şekil 4.11 ‘de verilmiştir. Buna göre, Cd, Pb ve As gruplarında *tp53* ifadeleri kontrol grubuna göre azalırken, DEP, BBP, DINP ve DMEP gruplarından artmıştır. En belirgin artış DEP ve DINP gruplarında belirlenmiştir.

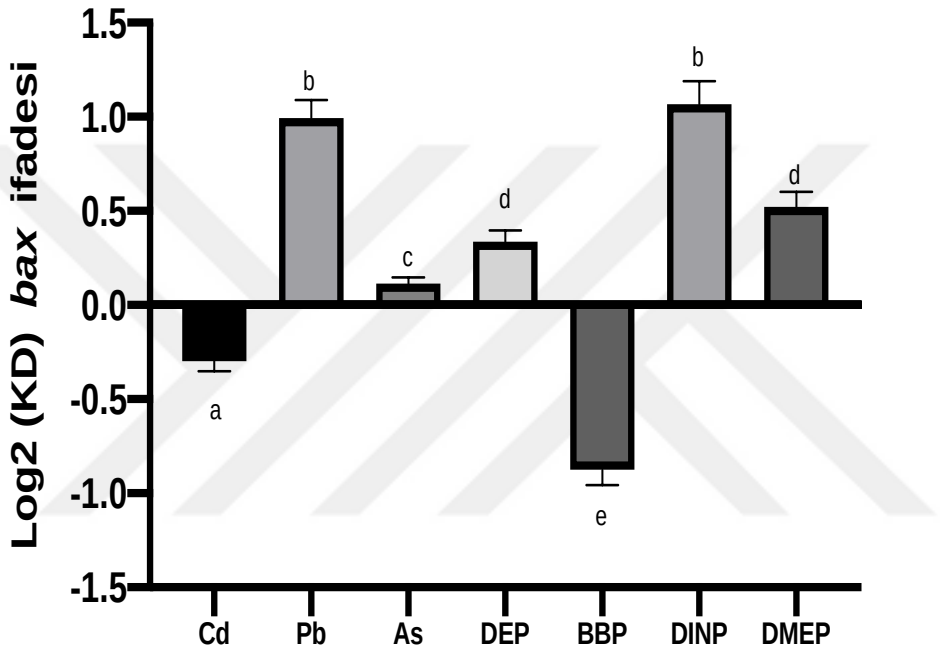


Şekil 4. 11: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log2 ölçeğinde ifade edilen tp53 kat değişiklikleri grafiği

Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. $^{a-e}$ $P < 0,05$ Farklı semboller kat değişim ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklı grupları temsil etmektedir. DEP: Dietil fitalat; BBP: butil benzil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; DINP: diizononil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.4.2. Bax gen ifadesi analizi

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen *bax* ifadeleri Şekil 4.12 ‘de verilmiştir. Buna göre, Cd ve BBP gruplarında *bax* ifadeleri kontrol grubuna göre azalırken, DEP, DINP ve DMEP gruplarından artmıştır. En belirgin artış Pb ve DINP gruplarında belirlenmiştir.

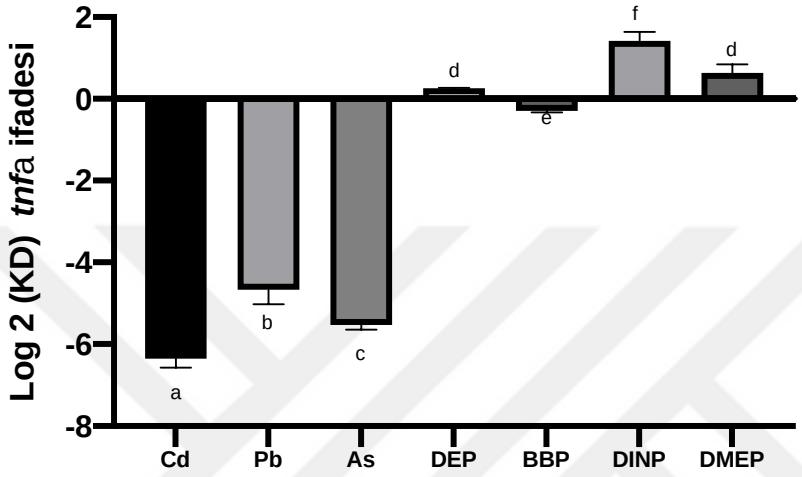


Şekil 4. 12: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen bax kat değişiklikleri grafiği

Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. $^{a-e}$ $P < 0,05$ Farklı semboller kat değişim ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklı grupları temsil etmektedir. DEP: Dietil fitalat; BBP: butil benzil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; DINP: diizononil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.4.3. Tnf α gen ifadesi analizi

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen *tnf* α ifadeleri Şekil 4.13 'te verilmiştir. Buna göre, Cd, Pb, As ve BBP gruplarında *tnf* α ifadeleri kontrol grubuna göre azalırken, DEP, DINP ve DMEP gruplarında artmıştır.

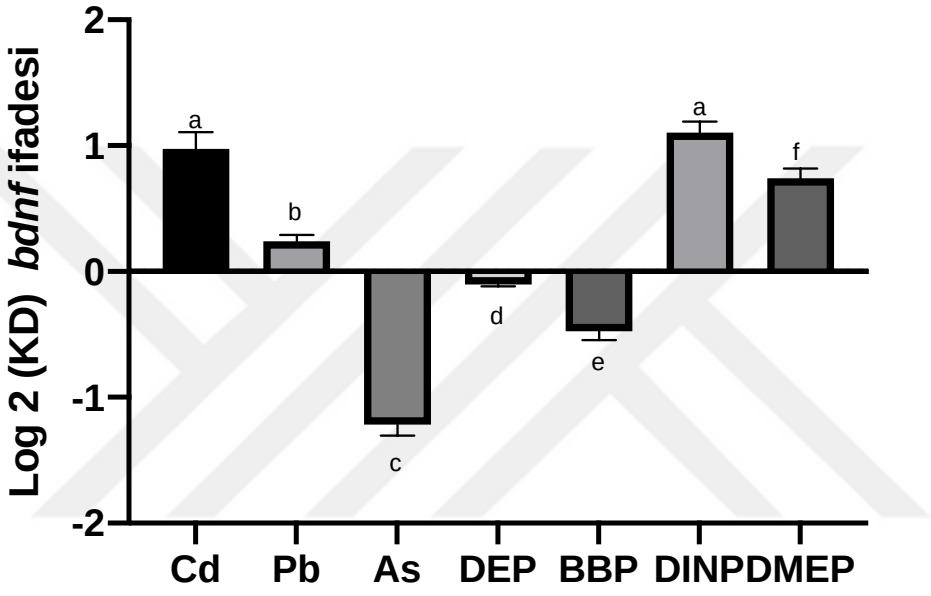


Şekil 4. 13: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen tnf α kat değişiklikleri grafiği

Deneyler üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. $^{a-e}$ $P < 0,05$ Farklı semboller kat değişim ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklı grupları temsil etmektedir. DEP: Dietil fitalat; BBP: butil benzil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; DINP: diizononil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

4.4.4. Bdnf gen ifadesi analizi

Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen *bdnf* ifadeleri Şekil 4.14 'te verilmiştir. Buna göre, Cd, Pb, DINP ve DMEP gruplarında *bdnf* ifadeleri kontrol grubuna göre artarken, As, DEP ve BBP gruplarında azalmıştır. En belirgin artış Cd ve DINP gruplarında, en belirgin azalma ise As grubunda görülmüştür.



Şekil 4. 14: Grupların gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR ile ölçülen ve Log 2 ölçeğinde ifade edilen bdnf kat değişiklikleri grafiği

Deneyleri üçer tekrarlı yapılmış olup housekeeping gen olarak beta aktin kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. $^{a-e}$ $P < 0,05$ Farklı semboller kat değişim ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklı grupları temsil etmektedir. DEP: Dietil fitalat; BBP: butil benzil fitalat; DMEP: Dimetoksietil fitalat; DINP: diizononil fitalat; Cd: Kadmiyum; As: Arsenik; Pb: Kurşun

5. Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızın sonuçlarında göre 14 gün 37^{o}C ‘de bekletilen kumaş örneklerinden tere belirgin olarak geçen fitalatlardan DEP, BBP, DMEP ve DINP ile ağır metallerden Cd, As ve Pb maruziyetlerinin zebra balığı embriyolarında gelişimsel parametreler, biyokimyasal hasar parametreleri ile apoptoz ve inflamasyon ile ilişkili genlerin ifadelerinde farklılığa neden olduğu görülmüştür.

PAH grubunda ise sıcaklığı ve süreyi arttırmamıza rağmen yapay ter çözeltisine anlamlı bir geçiş gözlemlenmemiştir. Naftalin maddesi için elde edilen 0,08 mg/L sonuç sadece bir çalışmada kayda geçmiş, tekrarlanabilir sonuç gözlemlenememiştir. Analiz metodunun daha geliştirilmesi veya kullanılan analiz cihazının GCMS yerine daha düşük limitlere inebilen GCMSMS gibi tandem bir sistem ile değiştirilmesi durumunda bu geçişin de gözlemlenebileceği düşünülmektedir.

Kadmiyum arsenik, kurşun, civa ve kromun yanı sıra, fizyolojik bir işlevi olmayan ve genellikle toksik olarak kabul edilen ağır bir metaldir. Geçtiğimiz yüzyılda kadmiyuma maruz kalmanın birçok farklı formu gösterilmiştir. Kadmiyum birçok insan faaliyetinin sonucu olarak çevrede mevcuttur. Kadmiyum kirliliğinin sabit kaynakları endüstride korozif reaktif olarak uygulanması ve PVC ürünlerinde ve pillerde stabilizatör olarak kullanılmasını içerir. Ayrıca kirlenmiş toprakların bulunduğu alanlarda, ev tozu potansiyel bir maruziyet yoludur (97).

Plazma ve idrar gibi Cd maruziyet belirteçleri ile koroner kalp hastalığı, inme, periferik arter hastalığı ve lipit profilinde aterojenik değişiklikler arasında bir ilişki de gözlenmiştir (98). Apoptotik veya nekrotik olaylara yol açabilen sitotoksik etkilerine ek olarak kadmiyum, kanıtlanmış bir kanserojendir (Uluslararası Kanser Sınıflandırması Araştırmaları Ajansı, grup I) (IARC, 1997). Mesleki veya çevresel

kadmiyum maruziyeti akciğer, meme, prostat, pankreas, idrar, mesane ve nazofarenks kanserlerine neden olabilir. (99). Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, Ca^{2+} birikimi, kaspaz-3'ün yukarı regülasyonu, BCL-2'nin aşağı regülasyonu ve p-53 eksikliği, Cd ile indüklenen apoptoza yol açar. Çalışmamızda Cd maruziyeti zebra balığı embriyolarında LPO değerlerini arttırdı, AChE aktivitesi, tp53, Tnf-α bax ifadelerini azalttı, bdnf ifadesini ise arttırmıştır. P53, pro-apoptotik işlevi olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. İnsan kanserlerinin % 50'den fazlası p53 geninde işlev kaybı mutasyonları taşıdığından, p53'ün klasik tip tümör baskılayıcılarından biri olduğu düşünülmektedir (100). Bax (Bcl2 ile ilişkili X proteini), p53'e erken yanıt veren bir gendir. Bax ya normal olarak sitoplazmada dağılır ya da mitokondriyal membran ile gevşek bir şekilde ilişki halindedir. Apoptozun uyarılması üzerine, bax konformasyonel değişikliğe uğramaya ve ardından dış mitokondriyal membran geçirgenliğine ve sitokrom c'nin mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitozole salınmasına neden olan zara bağlanan homo-oligomerlerin oluşumuna neden olur (Green 2006). Çalışmamızda Cd ile azalan *tp53* ve *bax* ifadeleri P53'ün tümör baskılayıcı etkilerinin inhibisyonunu işaret ederek Cd' nin kanserojen etkileri bildiren önceki çalışmalarla uyum sağlamaktadır.

Çevresel kirleticiler, oksidatif stres ile ilişkili toksisiteyi tetikleyebilir. Oksijen toksisitesi, organizmalarda metabolik dönüşüm sırasında üretilen sitotoksik reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu zararlı bir etkidir. Normal koşullar altında, organizmaların antioksidan savunma sistemi ROS' u ortadan kaldırabilir ve karmaşık biyolojik makromolekülleri ROS saldırısından koruyabilir. Bununla birlikte, kirleticiler tarafından indüklenen ROS seviyeleri, antioksidan temizleme kapasitesini aştığında savunma sistemi dengesi bozulur, bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivitesi zayıflar. Oksidatif stres lipid peroksidasyonuna (artmış malondialdehit

(MDA) seviyesi), zincir kırılmasına, hücre hasarına, ölüme veya kanserleşmeye neden olabilmektedir. Antioksidan savunma sistemleri, çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan ajanlardan oluşur (örneğin, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST)) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar) (101).

Çalışmamızda Cd maruziyeti ile LPO artmıştır. Cd' nin membran lipitlerinin peroksidasyonunu arttırıp hücrelerin antioksidan sistemini değiştirerek farklı dokularda oksidatif hasara neden olabildiği gösterilmiştir. Hücre zarındaki peroksidatif hasar, metal iyonlarının hücre organelleri ile etkileşimi nedeniyle hücresel bileşenlerde hasara neden olabilmektedir. Sarkar ve ark. (1995) ratlarda Cd (0.4 mg / kg vücut ağırlığı, ip) uygulaması ile enjeksiyondan sonraki 3 saat içinde kalpte lipit peroksidasyonunu önemli ölçüde artarken, böbrek ve karaciğerdeki artmış Cd intoksikasyonundan 6 ila 12 saat sonra görüldüğünü bildirmiştir (102).

Arsenik (As), doğada yaygın olarak dağılan ve endüstriyel süreçlerle ve tarımsal uygulamalar yoluyla çevreye salınan bir kirleticidir (103). As maruziyetinin, piruvat dehidrojenaz ve α-ketoglutarat dehidrojenaz gibi enzim aktivitelerini, hücre sinyalizasyonunu ve DNA onarımını etkileyebildiği, çok kısa maruziyet sürelerinden sonra bile memeli hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (104).

Çalışmamızda As maruziyeti zebra balığı embriyolarında LPO değerlerinde anlamlı derecede bir artışa neden olmuştur. Ventura-Lima ve ark., (2008) 48 saat boyunca As'ye maruz bırakılan zebra balıkları yüzgeçlerinde artmış GSH düzeyleri bulmuşlar ve bu artan GSH düzeylerine bağlı olarak ROS ve LPO' da artış olmadığını bildirmişlerdir (105). Çalışmamızda As uygulaması sonucu bir antioksidan olan SOD

enziminin aktivitesi azalmış olarak bulunmuştur. Azalan SOD aktivitesine bağlı olarak LPO düzeylerinin artması muhtemeldir.

Önceki çalışmalar, tümör oluşumunun hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki bir dengesizlikten kaynaklandığını bildirmiştir. Apoptoz indüksiyonu, kanser tedavileri için potansiyel bir hedeftir. Apoptoz, sırasıyla ölüm reseptörlerini ve mitokondriyi içeren dışsal ve içsel apoptoz yolları sırasında, aspartata özgü sistein proteazları olan çeşitli kaspaz türleri tarafından indüklenir. Ekstrinsik yol, sonraki kaspaz-8 aktivasyonundan önce ilişkili ligandları, yani tnf ve Fasligand (FasL) ile bağlanan ölüm reseptörlerinden, örneğin tümör nekroz faktörü reseptörü ve Fas'tan başlatılır. İntrinsik yol, sitozolde sitokrom c salınımına ve ardından bölünmüş kaspaz-9 ile kombine edildiğinde apoptozomun oluşumuna yol açan mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklanır. Bu iki kaspaz kaskadı, sonunda kaspaz-3 aktivasyonunu ve ardından membran kabarcıklanması, hücre ayrılması ve kromozomal DNA parçalanması dâhil olmak üzere hücresel morfolojik değişiklikleri tetikler (106).

Çalışmamızda As' ye maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında *tp53* ve *tnf* α ifadeleri azalmıştır. Bulgularımızdan farklı olarak arsenik bileşiklerinin *in vitro* apoptozu indüklediğini gösterilmiştir. Bu gözlemler, özellikle sodyum arsenitin daha yüksek potensi, testis kanseri olan hastaların sonucunu iyileştirmek için arsenik bileşiklerinin potansiyel anti-tümörijenik terapötik uygulamaya sahip olabileceğini öne sürülmüştür. Arsenik trioksitin kültürlenmiş miyelomda ve yumurtalık kanseri hücrelerinde kaspaz-9 aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklediği de bildirmiştir (107). Ayrıca, arsenik trioksit, Fas /FasL yolu aracılığıyla insan keratinositlerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (108).

Endüstride, kimyasal özellikleri ve ekonomik değerleri nedeniyle yoğun bir şekilde kurşun ve kurşun türevli bileşikler kullanılmaktadır. Kurşun uygulaması, 1970'de yılda

beş milyon tondan 2016'da yaklaşık 11 milyon tona hızla artmıştır. Bununla birlikte, kurşun, evler, atık yönetimi ve kanalizasyon arıtma tesisleri dâhil olmak üzere kentsel kaynaklardan doğrudan su kaynaklarına karışabilir (109).

Zebra balığı (*Danio rerio*) kullanımının kemirgen modellerine göre kolay bakım, üreme, hızlı gelişme ve eksternal gelişim gibi çeşitli avantajları vardır, bu da onları insan hastalıkları, gelişimsel ve toksikolojik çalışmalar için pratik ve kullanışlı bir hayvan modeli haline getirir. Zebra balığı embriyosunda yapılmış bazı çalışmalarda, kurşuna maruz kalmanın erken embriyonik aşamalarda nörotoksik etkileri gösterilmiştir ve sinir sisteminin gelişiminde bazı değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Kurşuna döllenmeden 12-72 saat sonra (hpf) maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında, nöral ventrikül oluşumunda, arka beyin dallanma motor nöronlarında ve nöral vaskülatürde değişiklikler ve artmış apoptoz gözlenmiştir (110). Gelişim sırasında düşük seviyeli kurşun maruziyeti, zebra balıklarında embriyonel toksisiteye, davranış bozukluklarına ve öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olmuştur (111). Kurşuna kronik maruziyet, embriyonik kurşuna maruz kalmanın nesiller arası etkilerini göstermiş, kronik maruziyette en az üç nesil boyunca devam eden öğrenme eksiklikleri belirlenmiştir (112). Bu bulgulara uygun olarak çalışmamızda da proapoptotik faktörlerden bir olan *bax* ifadesinde en belirgin artışlardan biri Pb grubunda belirlenmiştir. Ayrıca Pb grubunda LPO ve NO değerleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır.

Fitalik asit esterleri, endüstriyel polimerlerin plastisitesini iyileştirmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Birden fazla ticari üründe ve her yerde kullanılmaları, insanlara ve çevreye kapsamlı bir şekilde yayılmalarına neden olur. Tai-Long Pan ve arkadaşları (2014) bazı fitalat türlerinin deri tarafından emilerek dokularda birikebildiğini göstermişlerdir (113).

Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında LPO değerleri fitalatlardan sadece DEP uygulanan grupta artmıştır. Fitalatlar gruplarında SOD aktivitesi BBP, DINP ve DMEP gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken DEP uygulanan grupta anlamlı fark belirlenmemiştir. AChE aktivitesi DEP, DINP ve DMEP gruplarında azalırken BBP uygulanan grupta anlamlı fark belirlenmemiştir. *tp53* ifadeleri DEP, BBP, DINP ve DMEP gruplarından artmıştır. En belirgin artış DEP ve DINP gruplarında belirlenmiştir. *bax* ifadeleri BBP grubunda azalırken, DEP, DINP ve DMEP gruplarında artmıştır. En belirgin artış DINP gruplarında belirlenmiştir. *Tnf-α* ifadesi DEP, DINP ve DMEP gruplarından artmıştır. Bdnf ifadesi DINP ve DMEP gruplarında artarken, DEP ve BBP gruplarında azalmıştır. En belirgin artış DINP grubunda olmuştur. Mankidy ve ark. (2013), DEHP, DEP, DBP ve BBP ın neden olabileceği sitotoksisite, endokrin bozucu etkileri, aril hidrokarbon reseptörleri (AhR) aracılı etkileri, lipid peroksidasyonu ve ksenobiyotik metabolizma enzimlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerini balık embriyolarında incelenmiştir (114). Bu çalışma sonucunda oksidatif stres, DEHP ve DEP durumunda kritik toksisite mekanizması olarak tanımlanırken, DBP ve BBP' nin faz 1 enzimleri tarafından verimli bir şekilde uzaklaştırılması daha az toksisite ile sonuçlanmıştır. DEHP ve DEP, transaktivasyon çalışmalarında estradiolü (E (2)) taklit etmemiş, ancak 10 mg/L'lik konsantrasyonlarda seks steroid hormonlarının sentezi etkilenmiştir. 10 mg BBP/L'ye maruz kalma, östrojen reseptörünün (ER) zayıf transaktivasyonuyla sonuçlanmıştır. Tüm fitalatlar, aril hidrokarbon reseptörünün (AhR) agonistleri olarak zayıf potansiyel sergilemiştir. İncelenen 4 fitalatın etki sırası; DEHP> DEP> BBP > DBP olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda DEP maruziyeti LPO değerlerinde ve *tp53* ifadesinde belirgin bir artışa neden olmuştur. DEP, plastikler ve kişisel bakım ürünleri dâhil olmak üzere ticari olarak temin edilebilen birçok üründe yaygın olarak kullanılmaktadır. DEP, esnekliğin korunmasına yardımcı olmak için plastik polimerlere plastikleştirici olarak eklenir. Plastik filmler, kauçuk, bant, diş fırçaları, otomotiv parçaları, alet sapları ve oyuncaklar gibi çeşitli ürünlerde kullanılmıştır. Plastiklere ek olarak, DEP çok çeşitli kişisel bakım ürünlerinde (ör. Kozmetikler, parfümler, saç spreyi, oje, sabun, deterjan ve losyonlar), endüstriyel malzemelerde ve tıbbi ürünlerde (örneğin, tabletler ve dental ölçü malzemelerindeki enterik kaplamalar) kullanılır. DEP' in genel olarak diğer fitalat türleri arasında yaygın olan antiandrojenik etki modunu paylaştığı bulunmamıştır, ancak DEP' in canlı sağlığı üzerinde çeşitli etkilerinin olduğuna dair sağlam kanıtlar bulunmaktadır (115).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada önemli sayıda eser elementin konsantrasyonları (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Sr, Ti, Tl, V ve Zn) Katalan (İspanya) pazarından çeşitli cilt temaslı kıyafetlerde (tişörtler, bluzlar, çoraplar, bebek pijamaları ve vücutlar) belirlenmiştir. Ayrıca bu elementlerin migrasyon oranlarını belirlemek için yapay ter ile migrasyon deneyleri yapılmıştır. Çinko pirition etiketli tişörtlerde yüksek seviyelerde Zn (186-5749 mg /kg) bulunurken, sırasıyla polyester ve siyah poliamid kumaşlarda yüksek konsantrasyonlarda Sb ve Cr bulunmuştur. Çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM), çeşitli giyim eşyalarında Ag ve Ti partiküllerinin ve agregalarının varlığını doğrulamıştır. İz elementlere deri yoluyla maruziyet hesaplanmış ve insan sağlığı riskleri değerlendirilmiştir. Antimon, polyester kıyafet giyen erkek ve kadın yetişkinler için en yüksek ortalama tehlike oranını göstermiş; incelenen öğelerden biri için (polyester tişört) “güvenlik sınırının üzerinde” olarak bildirilmiştir. Polyester

tekstilden Sb'ye maruz kalma, bu kıyafetleri sıklıkla ve uzun süre giyen alt nüfus gruplarında potansiyel sağlık riskleri oluşturmaktadır. Bu çalışmada yapay ter ile yapılan migrasyon deneylerinde, deri ile doğrudan temas halindeki kumaştan eser elementlerden bazılarının tere geçebildiği gösterilmiştir (116).

Pedersen ve Hartmann'ın yaptıkları analizlerde baskılı kumaşlarda fitalat varlığını gözlemlemişlerdir. Danimarka'da satışa sunulan yeleklerin baskılarında 1,4 mg/kg Slovakya da satılan "Tigger" önlüklerde 200 mg/kg fitalat içeriği tespit edilmiştir. Hollanda dan satın alınan "Donald Duck" baskılı t-shirtte de 170.036 mg/kg toplam fitalat içerdiği bulunmuştur. Bu çalışmalar, giysilerde kullanılan plastik baskı içerisinde PVC olabileceğini de göstermiştir. Belçika, Kanada, Norveç, Çin, İspanya ve ABD kaynaklı ürünlerdeki baskıların analizleri sonucunda da çok yüksek oranda 42.000 mg/kg ile 101.000 mg/kg fitalat içerirken, çalışmada analizlenen diğer 6 adet farklı baskı numunesinde ise 1000mg/kg'dan az toplam fitalat tespit ettikleri belirlenmiştir. Fitalat varlığı Almanya' da satın alınan yağmurlukta ise 320 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, tespit edilen kimyasalların türü ve miktarında farklılıklar görülmektedir. DEHP, benzil-butil fitalat (BBP), di-isononil fitalat (DINP) ve diheptil fitalat (DHP) bu çalışmada karşılaşılan fitalat çeşitleridir, ABD'den satın alınmış giysilerde tanımlanamayan fitalatlar da tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda 14 gün boyunca 37^0C yapay ter çözeltisinde bekletilen örneklerinden tere fitalat geçişi olduğu gözlemlenmiştir. Buna göre simli gri renkli poliüretan kumaştan 468,3 mg/L, siyah bağcık ucundan 201,7 mg/L açık mavi renkli düğmelerden 108,2 mg/L, siyah renkli baskılı kumaşlardan 351,9 mg/L ve 174,4 mg/L, siyah poliüretan suni deriden ise 213,7 mg/L tere fitalat geçişi gözlemlenmiştir.

Pedersen ve Hartmann yaptıkları çalışmada gene Belçika ve Slovakya'dan temin edilen ürünlerin baskılı kısımlarının yüksek miktarlarda fitalat içerdiğini bulmuşlardır.

Çalışmamız davranış analizleri açısından değerlendirildiğinde ise Cd, Pb, As'ye maruz bırakılan zebrabalığı embriyo gruplarının ortalama hızları ve keşif oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. Bu durum embriyolardaki nöronal gelişimin olumsuz yönde etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca hızdaki bu yavaşlama iskelet kas liflerinin organizasyonunda, kompozisyonunda ve fonksiyonundaki azalmayla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (117–119). Elde edilen veriler Capriello ve arkadaşlarının sonuçlarıyla da uyumludur (54).

Ortalama hız grafiği fitalatlar açısından değerlendirildiğinde ise BBP ve DMEP verilen embriyo gruplarında ortalama hız kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bununla birlikte keşif oranları da DEP grubu dışında tüm fitalat gruplarında kontrole göre anlamlı derecede düşmüştür. Tran ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları çalışmaya paralel olarak fitalatların zebrabalığı embriyolarında nörotoksik etkili olup nörojenezi bozduğu gösterilmiştir (120). Yazarlara göre bu etki primer nöronların hasarına ve santral sinir sistemi gelişimi ile etkili genlerin azalan ekspresyonlarına bağlıdır.

Tekstil ürünlerinde bulunan fitalatlar, kullanıcılarının bu ürünleri yıkamaları neticesinde doğayı tehdit eder hale gelmektedir. Atık sulara karışan fitalatlar atık su arıtma tesisleri veya kanalizasyon yoluyla akarsu, göl ya da denizlere deşarj edilerek doğaya salınmakta, buralarda yaşayan türlerin varlığını tehdit etmekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (2,121). Buna göre tekstil üreticisi ve firmalarının amacı öncelikle insan sağlığına ve doğa ile uyumlu ürünlerin üretimini sağlamak olmalıdır. Tekstil hammaddelerinde ve hazır giyim ürünlerinde terbiye aşamasında boyalar, ağır metaller ve kimyasallar kullanılır. Hazır giyim ürünlerinde kullanılan bu kimyasallar kıyafetlerin kullanıcı tarafından satın alınmasıyla birlikte önce tere sonrada tüketiciye göç etmektedir. Kanserojenik, alerjenik ve endokrin sistem üzerine etki edebilen bu

kimyasallar çevre, insan ve anne sağlığı açısından tehlike oluşturmakla birlikte en büyük zararı gelişim ve büyümenin en hızlı olduğu evre olan embriyonik dönemde vermektedir. Gelişmekte olan ve EBK'lara maruz kalan embriyoların yani insanda anne karnındaki fetüsün bu durumda ciddi bir biçimde ekilebileceği düşünülmektedir. Hazır giyim ve tekstil ürünlerinin insanlar tarafından ne kadar sıklıkla ve uzun süre kullanıldığını düşündüğümüzde bizi ve çocuklarımızı ne kadar büyük bir tehlikenin beklediğini anlamak çok da zor olmayacaktır. Dolayısıyla kullandığımız tekstil ürünleri ne olursa olsun insana zararı dokunmamalıdır. Yaptığımız çalışma bir adım öteye götürülerek insan fizyolojisi için spesifikasyon limit değerleri saptanmalıdır. Gerekirse bu kimyasallara alternatif doğa dostu, insan için toksik olmayan alternatifler kullanılmalıdır.

Yaptığımız çalışmada 7 ve 14 günlük sürelerde 37^0C ve 60^0C sıcaklıklarda çeşitli tekstil ürünlerinden endokrin bozucu kimyasalların yapay tere migrasyonu inceleyerek buradan elde ettiğimiz verileri kullanıp tere geçen ağır metal, fitalat ve polisiklik aromatik hidrokarbonları belirledikten sonra bu maddelerin zebra balığı embriyolarındaki toksik etkilerini inceledik, sağlık risklerini ortaya koymaya çalıştık ve önemli noktalara dikkat çekmeyi amaçladık. Elde ettiğiminiz verilerin konu ile alakalı yeni yönetmelik ve yasaların çıkmasına, tekstil firmalarına yapılan denetlemelerinin daha sıklaştırılmasına, kamuoyunu endokrin bozucuların zararlı etkileri ile ilgili aydınlatmaya ve bu kimyasalların tekstil ürünlerinde kullanımlarının sınırlandırılmasıyla ilgili yeni adli yaptırımların gündeme gelmesine katkı yapacağı inancını taşımaktayız.

6. Kaynakça

1. Akbay T. Biyokimyada Temel ve Özel Konular. In: Yarat Ayşen, Akbay T, Emekli-Alturfan E, editors. Biyokimyada Temel ve Özel Konular. 1st ed. İstanbul: Akademisyen kitabevi; 2019. 342–5.
2. Tutanç L, Cansız D, Emekli-Alturfan E, Ata Alturfan A, Üniversitesi-Cerrahpaşa İ, Bilimler Enstitüsü A, et al. Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları Endocrine Disrupting Chemicals and Their Use in Textile Industry. Experimed 2021; 11(2): 130-9
3. Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. J Hazard Mater. 2009;172(1):1–12.
4. Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod. 2001;16(5):972–8.
5. Wazir U, Mokbel K. Bisphenol A: A Concise Review of Literature and a Discussion of Health and Regulatory Implications. In Vivo. 2019;33(5):1421–3.
6. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet (London, England). 1993;341(8857):1392–6.
7. Giuliani A, Zuccarini M, Cichelli A, Khan H, Reale M. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(16):1–43.
8. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RHN ve ark. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. Hum Reprod [Internet]. 2015;30(4):963–72.
9. Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Tasks Ahead. Phthalates Cumul Risk Assess. 2008.
10. Piché CD, Sauvageau D, Vanlian M, Erythropel HC, Robaire B, Leask RL. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites on

steroidogenesis in MA-10 cells. Ecotoxicol Environ Saf. 2012;79:108–15.

11. Chen X, Zhou QH, Leng L, Chen X, Sun ZR, Tang NJ. Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1. Environ Toxicol Pharmacol. 2013;36(2):332–8.
12. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, Tsuboi T, Yoshioka E, Kanazawa A ve ark. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. Int J Hyg Environ Health. 2015; 218(5):461–70.
13. Fan Z, Lin L. Exposure Science: Contaminant Mixtures. Encycl Environ Heal. 2011;645–56.
14. Yubin L, Yilei Z, Ke L, Yinghong W, Lei W, Yubin L ve ark. Phthalates in Daily Clothes: Occurrence and Human Exposure. Asian J Ecotoxicol. 2020;(1):186–92.
15. Li M, Cui Y, Liu Z, Xue Y, Zhao R, Li Y ve ark. Sensitive and selective determination of butyl benzyl phthalate from environmental samples using an enzyme immunoassay. Sci Total Environ. 2019; 687:849–57.
16. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure. Int J Hyg Environ Health. 2007; 210(5):623–34.
17. Kang JC, Jee JH, Koo JG, Keum YH, Jo SG, Park KH. Anti-oxidative status and hepatic enzymes following acute administration of diethyl phthalate in olive flounder Paralichthys olivaceus, a marine culture fish. Ecotoxicol Environ Saf. 2010;73(6):1449–55.
18. Fromme H, Küchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. Water Res. 2002; 36(6):1429–38.
19. Azuma K, Jinno H. Toxicity of semivolatile organic compounds. Adv Toxic Constr Build Mater. 2022;33–54.
20. Api AM. Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients. Food Chem Toxicol. 2001;39(2):97–108.
21. Cheng LJ, Hung MJ, Cheng YI, Cheng TS. Calcium-mediated responses and glutamine synthetase expression in greater duckweed (Spirodela polyrhiza L.) under diethyl phthalate-induced stress. Aquat Toxicol. 2013;144–145:124–32.
22. Zhao F, Wei P, Wang J, Yu M, Zhang X, Tian H ve ark. Estrogenic effects associated with bisphenol a exposure in male zebrafish (Danio rerio) is

associated with changes of endogenous 17β-estradiol and gene specific DNA methylation levels. Gen Comp Endocrinol. 2017;252:27–35.

23. Barse A V., Chakrabarti T, Ghosh TK, Pal AK, Jadhao SB. Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of Cyprinus carpio to diethyl phthalate. Pestic Biochem Physiol. 2007;1(88):36–42.
24. Ghorpade N, Mehta V, Khare M, Sinkar P, Krishnan S, Rao CV. Toxicity study of diethyl phthalate on freshwater fish Cirrhina mrigala. Ecotoxicol Environ Saf. 2002;53(2):255–8.
25. Xu H, Shao X, Zhang Z, Zou Y, Wu X, Yang L. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. Ecotoxicol Environ Saf. 2013;93:39–44.
26. Zhang G. Effect of diethyl phthalate on biochemical indicators of carp liver tissue. 2015;34(1):21–7.
27. Kim SM, Yoo JA, Baek JM, Cho KH. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions. Toxicol In Vitro. 2015;30(1 Pt B):383–93.
28. Poopal RK, Ramesh M, Maruthappan V, Babu Rajendran R. Potential effects of low molecular weight phthalate esters (C 16 H 22 O 4 and C 12 H 14 O 4) on the freshwater fish Cyprinus carpio. Toxicol Res (Camb). 2017;6(4):505–20.
29. Obiezue, RN, Ikele, CB, Mgbenka BO, Okoye, IC, Attamah, GN, Uchendu, C ve ark. Toxicity study of diethyl phthalate on Clarias gariepinus fingerlings. African J Biotechnol. 2014;13(7):884–96.
30. Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, Langlois VS. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. Gen Comp Endocrinol. 2015;219:74–88.
31. Merel S, Regueiro J, Berntssen MHG, Hannisdal R, Ørnsrud R, Negreira N. Identification of ethoxyquin and its transformation products in salmon after controlled dietary exposure via fish feed. Food Chem. 2019;289:259–68.
32. Santangeli S, Maradonna F, Zanardini M, Notarstefano V, Gioacchini G, Forner-Piquer I ve ark. Effects of diisononyl phthalate on Danio rerio reproduction. Environ Pollut. 2017;231(Pt 1):1051–62.
33. Abb M, Heinrich T, Sorkau E, Lorenz W. Phthalates in house dust. Environ Int.

2009;35(6):965–70.

34. Valles EG, Laughter AR, Dunn CS, Cannelle S, Swanson CL, Cattley RC ve ark. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in responses to diisononyl phthalate. Toxicology. 2003;191(2–3):211–25.
35. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. Int J Androl. 2008;31(2):131–8.
36. Forner-Piquer I, Maradonna F, Gioacchini G, Santangeli S, Allara M, Piscitelli F ve ark. Dose-Specific Effects of Di-Isononyl Phthalate on the Endocannabinoid System and on Liver of Female Zebrafish. Endocrinology. 2017;158(10):3462–76.
37. Forner-Piquer I, Mylonas CC, Calduch-Giner J, Maradonna F, Gioacchini G, Allarà M ve ark. Endocrine disruptors in the diet of male Sparus aurata: Modulation of the endocannabinoid system at the hepatic and central level by Di-isononyl phthalate and Bisphenol A. Environ Int. 2018;119:54–65.
38. Gimeno P, Thomas S, Bousquet C, Maggio AF, Civade C, Brenier C ve ark. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014;949–950:99–108.
39. Bao J, Wang M, Ning X, Zhou Y, He Y, Yang J ve ark. Phthalate concentrations in personal care products and the cumulative exposure to female adults and infants in Shanghai. J Toxicol Environ Health A. 2015;78(5):325–41.
40. Liu H, Zhu S, Han W, Cai Y, Liu C. DMEP induces mitochondrial damage regulated by inhibiting Nrf2 and SIRT1/PGC-1α signaling pathways in HepG2 cells. Ecotoxicol Environ Saf. 2021;221:112449.
41. Itoh N, Naya T, Kanai Y, Kumon F, Amano K. Historical changes in the aquatic environment and input of polycyclic aromatic hydrocarbons over 1000 years in Lake Kitaura, Japan. Limnology. 2017;18(1):51–62.
42. Sun K, Song Y, Liu Z, Jing M, Wan J, Tang J ve ark. Toxicity assessment of Fluoranthene, Benz(a)anthracene and its mixed pollution in soil: Studies at the molecular and animal levels. Ecotoxicol Environ Saf. 2020;202.
43. Cao LM, Mu G, Chen WH. Polycyclic aromatic hydrocarbon: environmental sources, associations with altered lung function and potential mechanisms. Chin Med J (Engl). 2020;133(13):1603.

44. Giovanella P, Vieira GAL, Ramos Otero I V, Pais Pellizzer E, de Jesus Fontes B, Sette LD. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. J Hazard Mater. 2020;382:121024.
45. Lai X, Ning X an, Zhang Y, Li Y, Li R, Chen J ve ark. Treatment of simulated textile sludge using the Fenton/Cl− system: The roles of chlorine radicals and superoxide anions on PAHs removal. Environ Res. 2021;197:110997.
46. Cathey AL, Watkins DJ, Rosario ZY, Vélez Vega CM, Loch-Caruso R, Alshawabkeh AN ve ark. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure results in altered CRH, reproductive, and thyroid hormone concentrations during human pregnancy. Sci Total Environ. 2020];749.
47. Sucker K, Zschiesche W, Aziz M, Drews T, Hummel T, Raulf M ve ark. Naphthalene: irritative and inflammatory effects on the airways. 2021;94:889–99.
48. Pannu AK, Singla V. Naphthalene Toxicity in Clinical Practice. Curr Drug Metab. 2020;21(1):63–6.
49. Khpalwak W, Abdel-dayem SM, Sakugawa H. Individual and combined effects of fluoranthene, phenanthrene, mannitol and sulfuric acid on marigold (Calendula officinalis). Ecotoxicol Environ Saf. 2018;148:834–41.
50. Xie J, Han Q, Wei Z, Wang Y, Wang S, Chen M. Phenanthrene induces autism-like behavior by promoting oxidative stress and mTOR pathway activation. Toxicology. 2021;461.
51. Chen Y, Lian Y, Ma Y, Wu C, Zheng Y, Xie N. The expression and significance of tyrosine hydroxylase in the brain tissue of Parkinson's disease rats. Exp Ther Med. 2017;14(5):4813–6.
52. Vignet C, Trenkel VM, Vouillarmet A, Bricca G, Bégout ML, Cousin X. Changes in Brain Monoamines Underlie Behavioural Disruptions after Zebrafish Diet Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Environmental Mixtures. Int J Mol Sci 2017;18(3):560.
53. Slmonich SL, Hites RA. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Sci Technol. 1994;28(5):939–43.
54. Capriello T, Grimaldi MC, Cofone R, D'Aniello S, Ferrandino I. Effects of aluminium and cadmium on hatching and swimming ability in developing zebrafish. Chemosphere. 2019;222:243–9.

55. Ma JK, Saad Eldin WF, El-Ghareeb WR, Elhelaly AE, Khedr MHE, Li X ve ark. Effects of Pyrene on Human Liver HepG2 Cells: Cytotoxicity, Oxidative Stress, and Transcriptomic Changes in Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Inflammatory Markers with Protection Trial Using Lycopene. Biomed Res Int. 2019;2019.
56. Alturfan AA. Ağır Metaller. In: Ayşen Y, Akbay T, Emekli-Alturfan E, editors. Biyokimyada Temel ve Özel Konular. 1st ed. İstanbul: Akademisyen kitabevi; 2019. 55–64.
57. Bediako JK, Wei W, Yun YS. Sorptive Removal of Cadmium Ions from Solution Phases Using Textile Fiber Waste Coated with Carboxymethyl Cellulose. Adv Mater Res. 2015;1130:631–4.
58. Murphy D, Mathew A, James B, Hutchinson D. Could the inhalation of cadmium and other metals in addition to textile dust inhalation account for the observed increased risk of rheumatoid arthritis in textile workers? Ann Rheum Dis. 2016;75(5):e30–e30.
59. Tuzen M, Onal A, Soylak M. Determination of trace heavy metals in some textile products produced in Turkey. Bull Chem Soc Ethiop [Internet]. 2008;22(3):379–84.
60. Nakamura Y, Ohba KI, Suzuki K, Ohta H. Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. J Toxicol Sci. 2012;37(1):149–56.
61. Örün E. Giysiler ve çocuk sağlığı: Ne giysin? Nasıl yıkansın? Turgut Özal Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2015;(58): 43-49
62. Ünal İ, Emekli-Alturfan E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. Journal of Clinical Neuroscience. Churchill Livingstone; 2019;62. 1–6.
63. Beler M, Cansız D, Ünal İ, Üstündağ Ü V, Dandin E, Ak E ve ark. Bisphenol A reveals its obesogenic effects through disrupting glucose tolerance, oxidant-antioxidant balance, and modulating inflammatory cytokines and fibroblast growth factor in zebrafish. Toxicol Ind Health. 2022;38(1):19–28.
64. Ünal İ, Çalışkan-Ak E, Üstündağ Ü V., Ateş PS, Alturfan AA, Altinoz MA ve ark. Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. Int J Neurosci. 2019; 130(6):574-582

65. Cansız D, Ustundag UV, Unal I, Alturfan AA, Emekli-Alturfan E. Morphine attenuates neurotoxic effects of MPTP in zebrafish embryos by regulating oxidant/antioxidant balance and acetylcholinesterase activity. Drug Chem Toxicol [Internet]. 2021; 1-9.
66. Üstündağ FD, Ünal İ, Cansız D, Üstündağ ÜV, Subaşat HK, Alturfan AA ve ark. 3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos. Drug Chem Toxicol. 2020; 45(2):947-954.
67. Eğilmezer G, Üstündağ V, Ateş PS, Ünal, Üstündağ FD, Alturfan AA ve ark. Methylnitrosourea, dimethylbenzanthracene and benzoapyrene differentially affect redox pathways, apoptosis and immunity in zebrafish. Hum Exp Toxicol. 2020;39(7):920–9.
68. Üstündağ ÜV, Çalıskan-Ak E, Ateş PS, Ünal İ, Eğilmezer G, Yiğitbaşı T ve ark. White LED Light Exposure Inhibits the Development and Xanthophore Pigmentation of Zebrafish Embryo. Sci Rep. 2019;9(1):1–12.
69. Ünal İ, Emekli-Alturfan E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. J Clin Neurosci. 2019;62:1–6.
70. Levine AJ. Spontaneous and inherited TP53 genetic alterations. Oncogene. 2021;40(41):5975–83.
71. Fish EW, Tucker SK, Peterson RL, Eberhart JK, Parnell SE. Loss of tumor protein 53 protects against alcohol-induced facial malformations in mice and zebrafish. Alcohol Clin Exp Res. 2021;45(10):1965–79.
72. Reshma Raj S, Das DN, Mondal S, Ashokan M, Thota LN, Karuthadurai T ve ark. Expression analysis of pro-apoptotic BAX and anti-apoptotic BCL-2 genes in relation to lactation performance in Deoni and Holstein Friesian crossbred cows. Anim Biotechnol. 2022; 1-8.
73. Zhao WJ, Li X, Xu ZQ, Fang KM, Hong HC, Sun HJ ve ark. Environmentally relevant concentrations of arsenic induces apoptosis in the early life stage of zebrafish. Ecotoxicol Environ Saf. 2021;227:112883.
74. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I ve ark. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. J Invest Dermatol. 2001;117(2):333–40.
75. Subedi L, Lee SE, Madiha S, Gaire BP, Jin M, Yumnam S ve ark.

Phytochemicals against TNFα-Mediated Neuroinflammatory Diseases. Int J Mol Sci. 2020;21(3).

76. Fatma G, Ondokuz Y, Üniversitesi M, Fakültesi V, Dalı BA. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör. Atatürk Üniversitesi Vet Bilim Derg. 2015;10(2):120–9.
77. Sasi M, Vignoli B, Canossa M, Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. Pflugers Arch. 2017;469(5–6):593–610.
78. Colucci-D'amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(20):1–29.
79. Anand SK, Sahu MR, Mondal AC. Induction of oxidative stress and apoptosis in the injured brain: potential relevance to brain regeneration in zebrafish. Mol Biol Rep. 2021;48(6):5099–108.
80. ISO - ISO 105-E04:2013 - Textiles — Tests for colour fastness — Part E04: Colour fastness to perspiration.
81. EN 16711-1:2015 - Textiles - Determination of metal content - Part 1: Determination of metals using.
82. Standard Operating Procedure for Determination of Phthalates. 2018.
83. Friedrich-Henkel-Weg. GS Specification: Testing and assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the awarding of GS Marks - Specification pursuant to Article 21 (1) No. 3 of the Product Safety Act (ProdSG).
84. ISO - ISO 16190:2021 - Footwear — Critical substances potentially present in footwear and footwear components — Test method to quantitatively determine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in footwear materials.
85. Kim SM, Yoo JA, Baek JM, Cho KH. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions. Toxicol In Vitro. 2015;30(1 Pt B):383–93.
86. Zhang C, Yang X, He Z, Zhong Q, Guo J, Hu X jing ve ark. Influence of BBP exposure on nervous system and antioxidant system in zebrafish. Ecotoxicology. 2014;23(10):1854–7.
87. Lee H, Lee J, Choi K, Kim KT. Comparative analysis of endocrine disrupting effects of major phthalates in employed two cell lines (MVLN and H295R) and embryonic zebrafish assay. Environ Res. 2019;172:319–25.
88. Yin J, Wang AP, Li WF, Shi R, Jin HT, Wei JF. Sensitive biomarkers

identification for differentiating Cd and Pb induced toxicity on zebrafish embryos. Environ Toxicol Pharmacol. 2017;56:340–9.

89. Beaver LM, Truong L, Barton CL, Chase TT, Gonnerman GD, Wong C ve ark. Combinatorial effects of zinc deficiency and arsenic exposure on zebrafish (Danio rerio) development. PLoS One. 2017;12(8):e0183831.
90. Lee J, Freeman JL. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. Neurotoxicology. 2014;43:57–64.
91. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Foliphenol reagent. The Journal of biologicn phenol reagenLowry, O. H., RosebroughL, N., A., F., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin al chemistry. J Biol Chem. 1951;193(1):265–75.
92. Ledwoz;yw A, Michalak J, Stępień A, Kądziołka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin Chim Acta. 1986;155(3):275–83.
93. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide - Biol Chem. 2001;5(1):62–71.
94. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. Toxicol Appl Pharmacol. 1986;82(3):512–20.
95. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961;7(2):88–95.
96. Chen Y, Yu FH, Sharp EM, Beacham D, Scheuer T, Catterall WA. Functional properties and differential neuromodulation of Nav1.6 channels. Mol Cell Neurosci. 2008;38(4):607–15.
97. Hogervorst J, Plusquin M, Vangronsveld J, Nawrot T, Cuypers A, Van Hecke E ve ark. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. Environ Res. 2007 J;103(1):30–7.
98. International Agency for Research on Cancer. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass. Apresentado em IARC Work Gr Eval Carcinog Risks to Humans Beryllium, Lyon. 1993;444.

99. Mezynska M, Brzóska MM. Environmental exposure to cadmium-a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. Environ Sci Pollut Res Int. 2018;25(4):3211–32.
100. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. Cancers (Basel). 2011;3(1):994.
101. Miller LL, Wang F, Palace VP, Hontela A. Effects of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout. Aquat Toxicol. 2007;83(4):263–71.
102. Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. J Trace Elem Med Biol. 1995;9(3):144–9.
103. Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. Toxicology. 2005;211(1–2):26–35.
104. Schuliga M, Chouchane S, Snow ET. Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic. Toxicol Sci. 2002;70(2):183–92.
105. Ventura-Lima J, de Castro MR, Acosta D, Fattorini D, Regoli F, de Carvalho LM ve ark. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish Danio rerio (Cyprinidae). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2009;149(4):538–43.
106. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9(3):231–41.
107. Yuan Z, Wang F, Zhao Z, Zhao X, Qiu J, Nie C ve ark. BIM-mediated AKT phosphorylation is a key modulator of arsenic trioxide-induced apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cells. PLoS One. 2011;6(5).
108. Liao WT, Chang KL, Yu CL, Chen GS, Chang LW, Yu HS. Arsenic induces human keratinocyte apoptosis by the FAS/FAS ligand pathway, which correlates with alterations in nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activity. J Invest Dermatol. 2004;122(1):125–9.
109. Thi NHB, Thi NAN, Audira G, Siregar P, Liang ST, Huang JC ve ark. Chronic Exposure to Low Concentration Lead Chloride-Induced Anxiety and Loss of

Aggression and Memory in Zebrafish. Int J Mol Sci. 2020;21(5).

110. Roy NM, DeWolf S, Schutt A, Wright A, Steele L. Neural alterations from lead exposure in zebrafish. Neurotoxicol Teratol. 2014;46:40–8.
111. Chen J, Chen Y, Liu W, Bai C, Liu X, Liu K ve ark. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. Neurotoxicol Teratol. 2012;34(6):581–6.
112. Xu X, Weber D, Burge R, VanAmberg K. Neurobehavioral impairments produced by developmental lead exposure persisted for generations in zebrafish (Danio rerio). Neurotoxicology. 2016;52:176–85.
113. Pan TL, Wang PW, Aljuffali IA, Hung YY, Lin CF, Fang JY. Dermal toxicity elicited by phthalates: evaluation of skin absorption, immunohistology, and functional proteomics. Food Chem Toxicol. 2014;65:105–14.
114. Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP. Biological impact of phthalates. Toxicol Lett. 2013;217(1):50–8.
115. Weaver JA, Beverly BEJ, Keshava N, Mudipalli A, Arzuaga X, Cai C ve ark. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: A systematic review of animal toxicology studies. Environ Int. 2020;145.
116. Rovira J, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Trace elements in skin-contact clothes and migration to artificial sweat: Risk assessment of human dermal exposure. 2016;87(6):726–38.
117. Avallone B, Agnisola C, Cerciello R, Panzuto R, Simoniello P, Cretì P ve ark. Structural and functional changes in the zebrafish (Danio rerio) skeletal muscle after cadmium exposure. Cell Biol Toxicol. 2015;31(6):273.
118. Tu H, Fan C, Chen X, Liu J, Wang B, Huang Z, ve ark. Effects of cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2a expression in zebrafish. Environ Toxicol Chem. 2017;36(8):2147–54.
119. Zhang Y, Ma J, Shi L, Cao D, Quan X. Joint toxicity of cadmium and SDBS on Daphnia magna and Danio rerio. Ecotoxicology. 2016;25(10):1703–11.
120. Tran CM, Do TN, Kim KT. Comparative Analysis of Neurotoxicity of Six Phthalates in Zebrafish Embryos. Toxics. 2021;9(1):1–11.
121. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, Tsuboi T, Yoshioka E, Kanazawa A ve ark. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. Int J Hyg Environ Health. 2015;218(5):461–70.

7. Özgeçmiş

Levent Tutanç

E-Posta :

Eğitim

1999-2004 Gazi Üniversitesi (Kimya Mühendisliği)
2006-2009 İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (Yüksek Lisans)
2016-… İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (Doktora)

Yetenekler
Yabancı Dil: İngilizce
Bilgisayar becerileri; MS Office (Word, Excel, PowerPoint)

Hobiler
Basketbol
Yüzme