

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2021-YL-032

**TİTANYUM DİOKSİT'İN (TiO₂) ERGİN *LABIDOCHROMIS*
CAERULEUS (FRYER, 1956) TÜRÜNE GENOTOKSİK
ETKİLERİ: MİKRONÜKLEUS TESTİ**

BİLGEHAN BULUT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Serdar KOCA

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF19018 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN, 2021

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda mesleki tecrübesi ile beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Serdar KOCA'ya, çalışmamın etik ilkelere uygun olarak ilerlemesinde uzmanlık desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yücel BAŞIMOĞLU KOCA'ya, çalışmalarımızın her aşamasına katılan ve destekleyen ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans öğrencisi Miral DEMİR'e, istatistiksel analiz başta olmak üzere çalışmamızın şekillenmesinde emeği geçen ADÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü doktora öğrencisi değerli arkadaşlarım Ramazan BAŞARAN'a ve Sinem DAL'a, tez çalışmamın bilimsel süreçlere uygunluğunun incelenmesi ve son şeklinin verilmesinde önerilerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU, Doç. Dr. Tülay ÇELİK ve Doç. Dr. Özlem Sultan ASLANTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yaptığım süreç boyunca en az benim kadar özveride bulunarak sorumluluğumu ve heyecanımı paylaşan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, çalışmalarına sabırla tahammül eden değerli eşim Teknoloji ve Tasarım Dersi Öğretmeni Sevgi BULUT'a sonsuz minnettarım.

“Titanyum dioksit'in (TiO_2) Ergin *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956) Türüne Genotoksik Etkileri: Mikronükleus Testi” adlı yüksek lisans tez çalışmamız Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ADÜ BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEF19018). Tez çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 23.10.2018 tarih ve 64583101/2018/115 karar numaralı izni ile yürütülmüştür.

Bilgehan BULUT

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Labidochromis caeruleus</i> 'un (Fryer, 1956) Genel Özellikleri	3
2.2. Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanopartikülü (NP)	5
2.3. Genotoksisite Testleri	8
2.4. Mikronükleus (MN) Testi	10
2.4.1. <i>In vivo</i> Mikronükleus (MN) Test Protokolü	12
2.4.2. Mikronükleus (MN) Değerlendirme Kriterleri	13
2.4.3. Morfolojik Nükleus Düzensizlikleri	15
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Etik Prosedür	16
3.2. Laboratuvar ve Ekipman	16
3.3. Canlı Materyal Temini, Bakımı ve Gruplandırılması	16
3.4. TiO ₂ Nanopartikülünün Hazırlanması	18

3.5. Balıkların TiO ₂ ile Muamele Edilmesi	19
3.6. Balıkların Feda Edilmesi, Preparatların Hazırlanması.....	20
3.7. Mikroskop İncelemesi.....	22
3.8. İstatistiksel Analiz.....	22
4. BULGULAR	23
4.1. Mikronükleus (MN) Verileri	23
4.1.1. Mikronükleus (MN) Frekanslarının Değerlendirilmesi	23
4.1.2. Solungaç ve Kuyruk Örneklerinin Mikronükleus (MN) Frekanslarının Karşılaştırılması	25
4.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Verileri	26
4.2.1. Binükleus (BN) Frekanslarının Değerlendirilmesi	26
4.2.2. Çentikli Nükleus (ÇN) Frekanslarının Değerlendirilmesi	28
4.2.3. Tomurcuklu Nükleus (TN) Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	29
4.2.4. Loblu Nükleus (LN) Frekanslarının Değerlendirilmesi	30
4.2.5. Solungaç ve Kuyruk Örneklerinin Morfolojik Nükleus Düzensizlik Frekanslarının Karşılaştırılması	33
4.3. Genotoksik Hasarın Genel Değerlendirmesi	34
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR.....	51
EKLER	61
BİLİMSEL ETİK BEYANI	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : santigrat derece

α : alfa

μ : mikro

±: artı, eksi

***** : istatistiksel anlamlı farklılık düzeyi, $P<0.05$

****** : istatistiksel anlamlı farklılık düzeyi, $P<0.01$

******* : istatistiksel anlamlı farklılık düzeyi, $P<0.001$

mg/kg : miligram/kilogram

mg/L : miligram/litre

$\mu\text{g/ml}$: mikrogram/mililitre

μm : mikrometre

ng : nanogram

nm : nanometre

vd. : ve diğerleri

NP : nanopartikül

MN : mikronükleus

EMS : etil metan sülfonat

DNA : deoksiribonükleik asit

S : solungaç

K : kuyruk

BN : binükleus

ÇN : çentikli nükleus

TN : tomurcuklu nükleus

LN : loblu nükleus

UV : ultraviyole

CFU : Colony Forming Units (Koloni Oluşturan Birim), bir numunedeki canlı bakteri veya mantar sayısını ifade eden birim

CHO-K1: Çin Hamsteri yumurtalık hücreleri

SCE (KKD) : sister chromatid exchange (kardeş kromatid değişimi)

EPA : United States Environmental Protection Agency (ABD Çevre Koruma Kurumu)

OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Titanyum (Ti) elementinin kimyasal yapısı	5
Şekil 2. TiO ₂ nanopartikülünün anataz (a), rutil (b) ve brokit (c) yapısı	6
Şekil 3. Genotoksik etki mekanizması ve sonuçları.....	9
Şekil 4. Mikronükleus içeren hücrenin oluşum safhaları.....	14
Şekil 5. Mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizliklerinin şematik görünümü	15
Şekil 6. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde mikronükleus (MN) frekanslarının değişimi	23
Şekil 7. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde binükleus (BN) frekanslarının değişimi.....	27
Şekil 8. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde çentikli nükleus (ÇN) frekanslarının değişimi	28
Şekil 9. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde tomurcuklu nükleus (TN) frekanslarının değişimi.....	29
Şekil 10. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde loblu nükleus (LN) frekanslarının değişimi.....	30
Şekil 11. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde toplam genotoksik hasar frekanslarının değişimi.....	35
Şekil 12. 24 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması	36
Şekil 13. 48 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması	37
Şekil 14. 96 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması	37

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. <i>L. caeruleus</i> ergin erkek ve dişi bireyleri	3
Resim 2. Malawi Gölü haritası	4
Resim 3. TiO ₂ 'in transmisyon elektron mikroskobu ve makroskobik görüntüsü.....	6
Resim 4. Laboratuvar koşullarında barındırılan ergin <i>L. caeruleus</i> bireyleri	17
Resim 5. TiO ₂ çözeltisine sonikasyon işlemi uygulanması	19
Resim 6. TiO ₂ ile muamele edilen <i>L. caeruleus</i> bireyleri.....	20
Resim 7. TiO ₂ ile muamele edilen <i>L. caeruleus</i> 'tan alınan örneklerle hazırlanan yayma preparat.....	21
Resim 8. <i>L. caeruleus</i> 'un kan örneklerinde mikronükleus (MN) oluşumu (40X; 25 mg/L, 24 s.).....	25
Resim 9. <i>L. caeruleus</i> 'un kan örneklerinde binükleus (BN) oluşumu (40X; 50 mg/L, 24 s.).....	31
Resim 10. <i>L. caeruleus</i> 'un kan örneklerinde çentikli nükleus (ÇN) oluşumu (40X; 25 mg/L, 96 s.)	31
Resim 11. <i>L. caeruleus</i> 'un kan örneklerinde tomurcuklu nükleus (TN) oluşumu (40X; 50 mg/L, 48 s.)	32
Resim 12. <i>L. caeruleus</i> 'un kan örneklerinde loblu nükleus (LN) oluşumu (40X; 100 mg/L, 96 s.)	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Deney Planı.....	18
Çizelge 2. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde mikronükleus (MN) frekansları	23
Çizelge 3. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde binükleus (BN) frekansları.....	27
Çizelge 4. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde çentikli nükleus (ÇN) frekansları.....	28
Çizelge 5. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde tomurcuklu nükleus (TN) frekansları.....	29
Çizelge 6. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde loblu nükleus (LN) frekansları.....	30
Çizelge 7. <i>L. caeruleus</i> bireylerinde toplam genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması.....	35

ÖZET

TİTANYUM DİOKSİT'İN (TiO₂) ERGİN *LABIDochROMIS CAERULEUS* (FRYER, 1956) TÜRÜNE GENOTOKSİK ETKİLERİ: MİKRONÜKLEUS TESTİ

Bulut, B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.

Amaç: Bu çalışmada; titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülünün, laboratuvar araştırmalarında en çok kullanılan balık türlerinden biri olan *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956) türü üzerine olası genotoksik etkilerinin mikronükleus testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: 28 erkek ve 27 dişiden oluşan *L. caeruleus*'un ergin bireyleri 24 saat, 48 saat ve 96 saatlik periyotlarla 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda TiO₂ ile muamele edilmiştir. Negatif kontrolde dinlendirilmiş su, pozitif kontrolde ise 5 mg/L EMS (Etil Metan Sülfonat) kullanılmıştır. Uygulama sürelerinin sonunda solungaç ve kuyruk kanından alınan örneklerle preparat hazırlanmıştır. Mikroskop incelemesinde solungaç ve kuyruk örneklerinin her biri için 3000'er adet olmak üzere balık başına toplam 6000 hücre sayılmıştır. Elde edilen veriler SPSS Statistics-22 istatistik programında analiz edilmiş ve karşılaştırma yapılmıştır.

Bulgular: Mikronükleus (MN) frekansı analizi sonucunda; tüm deney gruplarında MN frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği fakat bu artışın tüm gruplarda anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Kuyruk örneklerinin MN frekanslarının, solungaç örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Morfolojik nükleus düzensizlikleri analizine göre; solungaç ve kuyruk örneklerinin tamamında binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus ve loblu nükleus frekansları negatif kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Toplam genotoksik hasar frekanslarının tüm gruplarda negatif kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: TiO₂ ile muamele edilen deney gruplarında MN frekansları bakımından konsantrasyon-süre etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, uygulama süresindeki artışın MN frekanslarında artışa yol açtığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Labidochromis caeruleus*, Mikronükleus, Morfolojik Nükleus Düzensizlikleri, Nanopartikül, Titanyum dioksit.

ABSTRACT

GENOTOXIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE (TiO₂) TO ADULT *LABIDOCHROMIS CAERULEUS* (FRYER, 1956) TYPE: MICRONUCLEUS TEST

Bulut, B. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Program, Master/Doctorate Thesis, Aydın, 2021.

Objective: In this study it was aimed to investigate the possible genotoxic effects of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956), which is one of the most used fish species in laboratory research, by micronucleus test.

Material and Methods: Adult individuals of *L. caeruleus*, consisting of 28 males and 27 females, were treated with TiO₂ at concentrations of 25 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L for 24 hour, 48 hour and 96 hour periods. Rested water was used in the negative control and 5 mg/L EMS (Ethyl Methane Sulphonate) was used in the positive control. At the end of the application periods preparats were prepared with samples taken from gill and tail blood. In microscopic examination, a total of 6000 cells per fish were counted, 3000 for each of the gill and tail samples. The data obtained were analyzed in the SPSS Statistics-22 statistical program and compared.

Results: As a result of micronuclei (MN) frequency analysis; It was determined that MN frequencies increased in all experimental groups compared to the negative control group, but this increase was not significant in all groups. It was determined that MN frequencies of tail samples were higher than gill samples. According to the analysis of morphological nucleus irregularities; According to the analysis of morphological nucleus irregularities; binucleus, notched nucleus, budded nucleus and lobed nucleus frequencies increased in all gill and tail samples compared to the negative control group. It was determined that the total genotoxic damage frequencies increased significantly in all groups compared to the negative control group.

Conclusion: It was determined that the concentration-time interaction was statistically significant in terms of MN frequencies in the experimental groups treated with TiO₂, and the increase in the application time caused an increase in the MN frequencies.

Key Words: *Labidochromis caeruleus*, Micronucleus, Morphological Nucleus Irregularities, Nanoparticle, Titanium dioxide.

1. GİRİŞ

Nanopartiküller (NP), 100 nm veya daha az boyutta tasarlanmış olan yapılardır. Yaklaşık 1-100 nm boyutlarındaki maddelerin araştırılması ve kontrolü olarak tanımlanan nanoteknoloji, tüm dünyada dinamik olarak gelişen bir bilim ve sanayi alanıdır. NP'lerin olağanüstü potansiyelleri, dünya çapında nanoteknoloji araştırma ve geliştirme yatırımlarında ciddi bir artışa neden olmuştur (Asztemborska vd., 2018).

NP'ler doğal yollarla oluşabildiği gibi yapay olarak da üretilebilirler. Doğal yollarla oluşma şekilleri; toz fırtınaları, orman yangınları, volkanik aktivite, okyanuslardaki buharlaşmadır (Zorlu, 2016). NP'lerin küçük kütleleri ve geniş yüzey alanları, en karakteristik iki özelliğidir. Bu özellikler, NP'lerin kimyasal reaktivitesinin yanı sıra mekanik, optik, elektriksel ve manyetik özelliklerini de etkilemektedir (Mital ve Manoj, 2011). Bu da NP'leri birçok tıbbi ve biyolojik çalışmada kullanıma uygun hale getirmektedir (Salata, 2004).

NP'ler ticari olarak temin edilebilen birçok üründe mevcuttur. Özellikle, çeşitli boyaların ve dolgu maddelerinin üretimi, kozmetik ürünlerinin üretimi, seramik üretimi, fotokatalitik su ve atık su arıtımının yapılması, gazların filtrelenmesi ve diğer birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır (Mital ve Manoj, 2011). Titanyum dioksit (TiO_2), silikon dioksit (SiO_2), çinko oksit (ZnO), demir oksit (Fe_3O_4), alüminyum oksit (Al_2O_3) NP'leri, en çok kullanılan NP'lerdir (Salata, 2004).

Yapılan araştırmalar sonucunda ZnO NP'lerinin, üstün UV engelleme özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2006). Boya, pigment, kauçuk, seramik, güneş kremi, kişisel bakım ürünleri, metalurji katkıları ve gıda katkı maddelerinin üretimi gibi endüstriyel alanların yanında tıbbi teşhis alanında en yaygın kullanılan NP'lerden biridir (Fan ve Lu, 2005).

Nano boyutlu alüminyum içeren Al_2O_3 çoğunlukla endüstriyel, evsel ve tıbbi ürünlerin üretiminde kullanılır. Enerji sistemlerinde kompozit yakıt olarak tercih edildiği gibi ağır silahlarda kurşun primerlerine alternatif olarak kullanılmaktadır (Colvin, 2003).

Fe_3O_4 NP'lerinin tıpta tümör tedavisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç ve gen transferi, makro moleküllerin ve hücrelerin işaretlenmesi gibi uygulamalarda kullanılması ile ilgili kapsamlı araştırmalar bulunmaktadır (Salata, 2004).

SiO₂; beton, çimento, seramik ve pencere camı üretilmesinde kullanılmaktadır. Beton ve çimentonun dayanıklılığının arttırılması, yangına karşı dayanıklı ve alev geçirmeyen yapı malzemelerinin üretilmesi, pencere camlarında yansımının sağlanması gibi özellikler SiO₂ ile sağlanmaktadır (Turunç, 2019). Bunun dışında tıp ve biyoteknoloji alanında kanser tedavisi, enzim immobilizasyonu gibi işlemlerde kullanılmakla birlikte biyobelirteç olarak da tercih edilmektedir (Venkatesan vd., 2005; Qhobosheane vd., 2001).

TiO₂; boya, çimento, güneş koruyucuları, kozmetik ürünleri, otomobil boyaları, katalizörler, ultraviyole koruma cihazları ve bataryaların üretiminde kullanılır (Asztemborska, 2018). TiO₂, UV ışını maruziyetine karşı yüksek refraktif indeksine sahiptir. Bu nedenle birçok güneş kremi, UV ışınlarını daha büyük parçacık yapısına sahip kimyasallardan daha verimli yansıtan ve dağıtan TiO₂ nanopartikülü içerir. Çok sayıda ve çok çeşitli kullanım alanına sahip olmasından dolayı ticari potansiyeli oldukça yüksektir (Paull vd., 2003).

Öte yandan NP'ler, çevrede yüksek tutulum göstermeleri nedeniyle besin zincirine dahil olarak canlıları olumsuz etkileyebilir (Meschini vd., 2010). NP'ler reaktivite, iletkenlik ve optik hassasiyetleri gibi öne çıkan özellikleri nedeniyle, etkileşime girdikleri biyolojik sistemlerde toksik etki gösterebilirler (Donaldson vd., 2002). NP içeren ürünler, kanalizasyon yoluyla atık sulara ya da su arıtma işlemleri esnasında biyosolütlerle çevreye karışabilirler (Weir vd., 2012). NP'lerin birçoğunun sucul ortamlara bu şekilde karıştığı ve besin zinciri yoluyla biyoakümülyasyona uğradığı varsayılmaktadır (Guzman vd., 2006; Nowack ve Bucheli, 2007; Kaegi vd., 2008).

İnsanların bilinçli veya bilinçsiz olarak ağız, solunum, deri ve damar içi enjeksiyon gibi çeşitli yollarla NP'lere maruz kalması muhtemeldir. NP'ler en çok gastrointestinal yolla insan vücuduna alınır (Saman vd., 2013).

NP'lerin geniş kullanım alanına sahip olmaları ve diğer endüstriyel malzemelerden ayrılan özellikleri dikkate alındığında, yararlarının yanında birçok zararlarının olabileceği anlaşılmaktadır. Biyolojik sistemler üzerindeki olası potansiyel sitotoksik ve genotoksik etkileri sebebiyle NP'lerin daha çok araştırılması ve araştırmalarda güncel yöntemler kullanılması önemlidir.

Çalışmamızda; TiO₂ nanopartikülünün *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956) türü üzerine olası genotoksik etkilerinin mikronükleus testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Labidochromis caeruleus*'un (Fryer, 1956) Genel Özellikleri



Resim 1. *Labidochromis caeruleus* ergin erkek ve dişi bireyleri (Anonim 1)

Labidochromis caeruleus'un sistematikteki yeri (Schmitter-Soto, 2007);

Alem : Animalia

Şube : Chordata

Sınıf : Actinopterygii

Takım : Perciformes

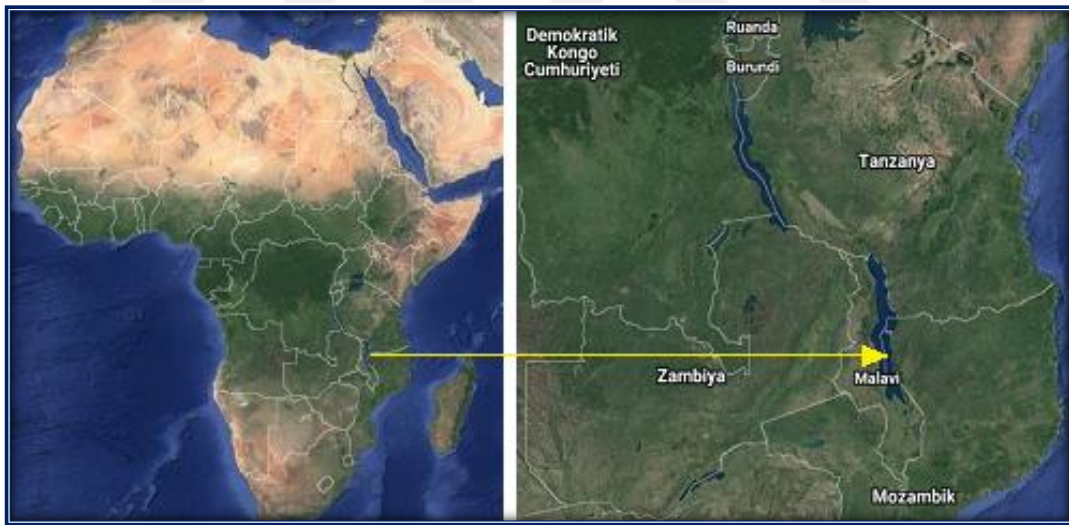
Aile : Cichlidae

Cins : *Labidochromis*

Tür : *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956)

Ülkemizde “sarı prenses” olarak bilinen *Labidochromis caeruleus*, 1956 yılında Fryer tarafından adlandırılmıştır. Tropikal tatlı su akvaryum balığı türlerinden olan *L. caeruleus*; Chordata şubesi, Actinopterygii sınıfı, Perciformes takımı, Cichlidae (Çiklitler) familyasında yer alır (Küçük vd., 2018). Çiklitler tek sırt yüzgeçlidir ve yan çizgileri genellikle 2 kısımlıdır. Boyları genelde 5-30 cm arasındadır ve maksimum 80 cm boya ulaşabilirler (Saygı, 2009). Süslü ve çok renkli olmalarının yanında zarif yüzgeç yapıları sebebiyle akvaryum balığı yetiştiricilerinin favori türleri arasındadır. Kolay üremeleri ve yavrularının hızlı gelişmesi, diğer tercih edilme nedenidir (Bulguroğlu, 2014).

Cichlidae familyasındaki türler arasında *L. caeruleus*, araştırmalarda en çok çalışılan türlerdendir (Doğan Etyemez vd., 2013). Orijini Afrika olup, Malawi Gölünde yaşayan endemik bir türdür. Genellikle sığ ve kayalık sularda yaşar. Tercih ettiği su sıcaklığı 23-26 °C’dir (Bulguroğlu, 2014). Doğal yaşam alanı olan Malavi Gölü, Afrika’nın güneyinde olup su sıcaklığı 24-28°C’dir. Ortalama derinliği 292 m, maksimum derinliği 785 m’dir (Guildford vd., 2000).



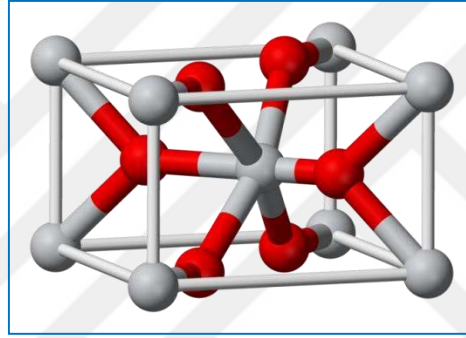
Resim 2. Malawi Gölü haritası (Anonim 2)

L. caeruleus omnivor (hepçil) beslenme özelliğine sahiptir. Temel besin grubunu algler, küçük eklem bacaklılar ve kabuklular oluşturur. Akvaryumda kuru karma yeme ilave olarak canlı yem ve dondurulmuş yemle besleme uygulanabilir (Bulguroğlu, 2014).

L. caeruleus, yumurtalarını ağızda kuluçkalar ve belirli bir büyüklüğe erişene kadar yavrularını ağızlarında saklar. Dişiler, bu özelliklerinden dolayı kuluçka döneminde aç kalır. Bu nedenle, yumurtlama öncesinde ve sonrasında iyi beslenmeleri büyük önem taşır (Qaranjiki, 2017).

2.2. Titanyum Dioksit (TiO₂) Nanopartikülü

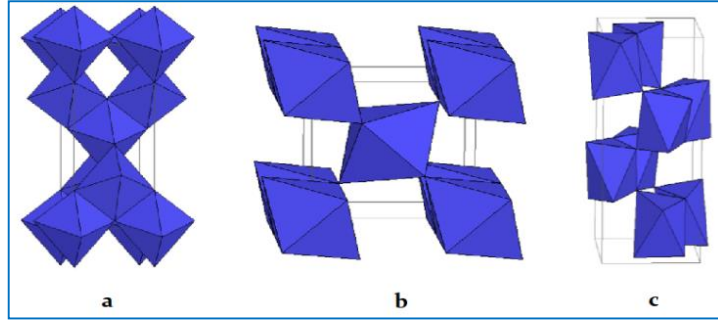
Titanyum; kimyasal sembolü “Ti” olan 22 atom numaralı elementtir. Hafif, güçlü, parlak grimsi, korozyona karşı dirençli bir geçiş metalidir. Titanyum, 1791'de William Gregor tarafından İngiltere'de keşfedilmiş, Martin Heinrich Klaproth tarafından Yunan mitolojisindeki Titan'a atfen “Titanyum” olarak isimlendirilmiştir. 1950'li yıllardan itibaren Kroll yöntemiyle ticari amaçla üretilmeye başlanmıştır (Kart, 2016).



Şekil1. Titanyum (Ti) elementinin kimyasal yapısı (Mouminsta, 2017)

Titanyum, geniş bir yayılım alanına sahiptir ve miktar bakımından doğada bulunan elementler arasında dokuzuncu sıradadır. Yer kabuğundaki ortalama yoğunluğu 4400 mg/kg'dır. Yer kabuğunu oluşturan elementler içinde miktar bakımından %0,6'lık bir orana sahiptir (Zorlu, 2016).

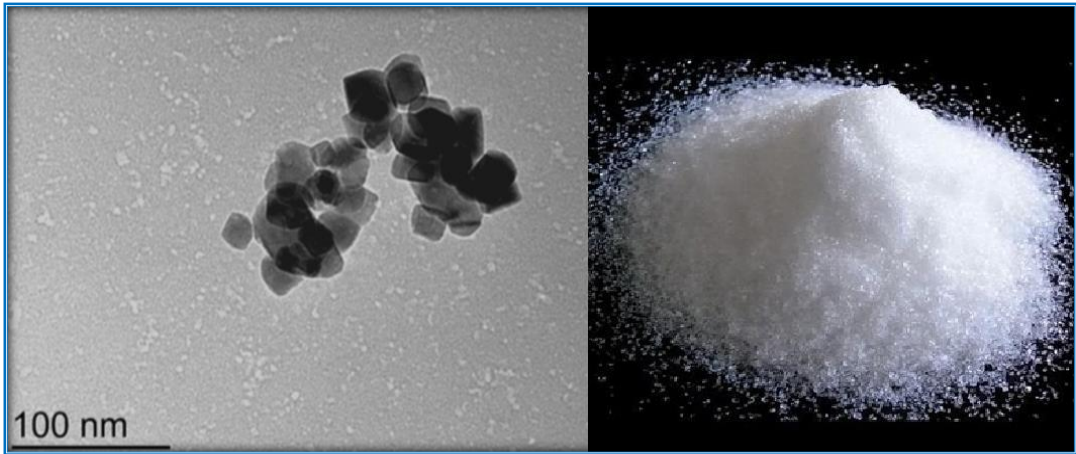
Titanyum dioksit (TiO₂); oksijenle tepkimeye girmiş titanyum elementidir. Parlak beyaz renkli, toz şeklinde, kokusuz bir maddedir ve yanıcı değildir. Ticari formu E171 kodu ile bilinir (Mouminsta, 2017). Anataz, rutil ve brokit olmak üzere üç farklı yapıya sahiptir (Akıcı, 2017). TiO₂'in karanlık ortamda kimyasal aktivitesi stabildir. UV ışık altında aktif hale gelir ve kimyasal reaksiyon gerçekleşir. Güneş ışığına maruz kalan TiO₂ içerikli boyaların dökülmesi ve kumaşların bozulması, kimyasal reaksiyon gerçekleştiğine işarettir (Kılıç, 2018).



Şekil 2. TiO_2 nanopartikülünün anataz (a), rutil (b) ve brokit (c) yapısı (Akıcı, 2017)

TiO_2 ; kristal yapısı, elektron yapısı vb. özellikleri sebebiyle heterojen kataliz işlemlerinde, hidrojen ve elektrik enerjisi üretiminde, boya ve kozmetik ürünlerinde, güneş kremlerinde, atık suların saflaştırılması ve temizlenmesi gibi bazı çevresel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yakaboylu, 2011).

TiO_2 'in 2005 yılında küresel üretimi 2000 tondur (Asztemborska vd., 2018). 2010 yılında ise üretim miktarı %150 artarak yıllık 5000 tona ulaşmıştır. Bu miktarın 2025 yılına kadar artması beklenmektedir (Meschini vd., 2010). TiO_2 , Türkiye'de ticari satışı mümkün olan bir üründür. Ağırlıklı olarak yapı/inşaat işlemlerinde (satın almanın %50'si) ve sanayi boyaalarının üretiminde (satın almanın %30'u) kullanılır. Otomotiv ve mobilya boyaalarında ise daha az tercih edilmektedir (Anonim 3).



Resim3. TiO_2 'in transmisyon elektron mikroskobu 300.000X görüntüsü (solda) (Disner vd., 2017), makroskobik görüntüsü (sağda) (Anonim 4)

Yeni teknolojilerde sıkça kullanılmalarına rağmen nanopartiküllerin sağlık ve çevre üzerindeki muhtemel toksik etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Kim vd., 2006).

Chen vd. (2006), TiO_2 NP'lerinin *Danio rerio*'da 1.0-7.0 mg/L konsantrasyonlarda büyüme inhibisyonuna ve karaciğer ağırlık oranında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

Nurkiewicz vd. (2008), sıçanlarla yaptığı çalışmada, inhalasyon yoluyla 24 saat süreyle verilen yaklaşık 21 nm'lik ve 1 μm 'lik TiO_2 NP'nün omuz kası arterlerinde fonksiyon bozukluğuna sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Farelere TiO_2 ve Fe_2O_3 nanopartiküllerinin enjekte edilmesinin; beyinde, testislerde ve akciğerde Fe_2O_3 birikimine sebep olduğu, yavrularda kan bariyeri yoluyla testislerin TiO_2 'e maruz kaldığı bildirilmiştir (Kückelhaus vd., 2003; Garcia vd., 2005; Kim vd., 2006; Takeda vd., 2009).

Liu vd. (2009), 0,5 mg/kg, 5 mg/kg ve 50 mg/kg ve sırasıyla 5, 21 ve 50 nm TiO_2 NP'lerini kullanarak fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, 7 gün sonunda 5 nm'lik TiO_2 NP'nün daha yüksek pulmoner toksisiteye sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Trouiller vd. (2009), çalışmalarında farelerin içme suyuna karıştırarak kullandıkları 21 nm'lik TiO_2 NP'nün önemli oranda inflamasyonlara neden olduğunu ve TiO_2 'nin genotoksik bir nanopartikül olduğunu bildirmişlerdir.

Zhu vd. (2009), Çin hamsteri ovaryum (CHO-K1) hücrelerini 10-20 nm anataz, 50-60 nm anataz ve 50-60 nm rutil TiO_2 'in 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına maruz bırakmışlardır. TiO_2 'in sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışma sonucunda CHO-K1 hücrelerinin sitoplazmasında TiO_2 gözlemlediklerini, LC_{50} değerlerine 10-20 nm anataz formunda 150 $\mu\text{g/ml}$ 'de, 50-60 nm anataz formunda 175 $\mu\text{g/ml}$ 'de, 50-60 nm rutil formunda ise 190 $\mu\text{g/ml}$ 'de ulaşıldığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlara göre TiO_2 'in toksik etkisinin, nanopartiküllerin boyutu ve türü ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

Di Virgilio vd. (2010), 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ ve 25 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 ve Al_2O_3 ile muamele ettikleri CHO-K1 hücre hattında; TiO_2 'in 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$, Al_2O_3 'in 0,5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda MN frekanslarını önemli ölçüde arttırdığını, 1-5 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 ile muamele edilen hücrelerde SCE frekanslarının yüksek olduğunu, metafaz yokluğunun sitotoksisiteyi kanıtladığını, 1-25 $\mu\text{g/mL}$ Al_2O_3 konsantrasyonu aralığında SCE indüksiyonu elde edilmediğini bildirmişlerdir.

Rossi vd. (2010), 10 mg/m³ SiO₂ kaplı, 40 nm'lik rutil TiO₂ NP'nün etkisini inceledikleri çalışmada; akciğer dokusundaki tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve kemokin (CXC) ligand 1 (CXCL 1) gibi genlerin ekspresyonlarının arttığını fakat bu etkinin TiO₂ ve SiO₂ nanopartiküllerinin hangisinden kaynaklandığını tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Yazdi vd. (2010), TiO₂ NP'nün farelerde interlökin reseptör 1 (IL-1R) ve interlökin 1 alfa (IL-1 α) genlerini baskıladığını, akciğer inflamasyonlarına sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Jugan vd. (2012), 12 nm ve 140 nm'lik TiO₂'in insan alveolar bazal epitel hücrelerinin (A549) DNA'larında tek zincir kırıklarına ve oksidatif lezyonlara sebep olduğunu ve oksidatif stres oluştuğunu bildirmişlerdir.

Saquib vd. (2012), insan amnion epitel hücrelerinde 30,6 nm'lik rutil tip TiO₂'in sitotoksik ve genotoksik hasara sebep olduğunu bildirmişlerdir.

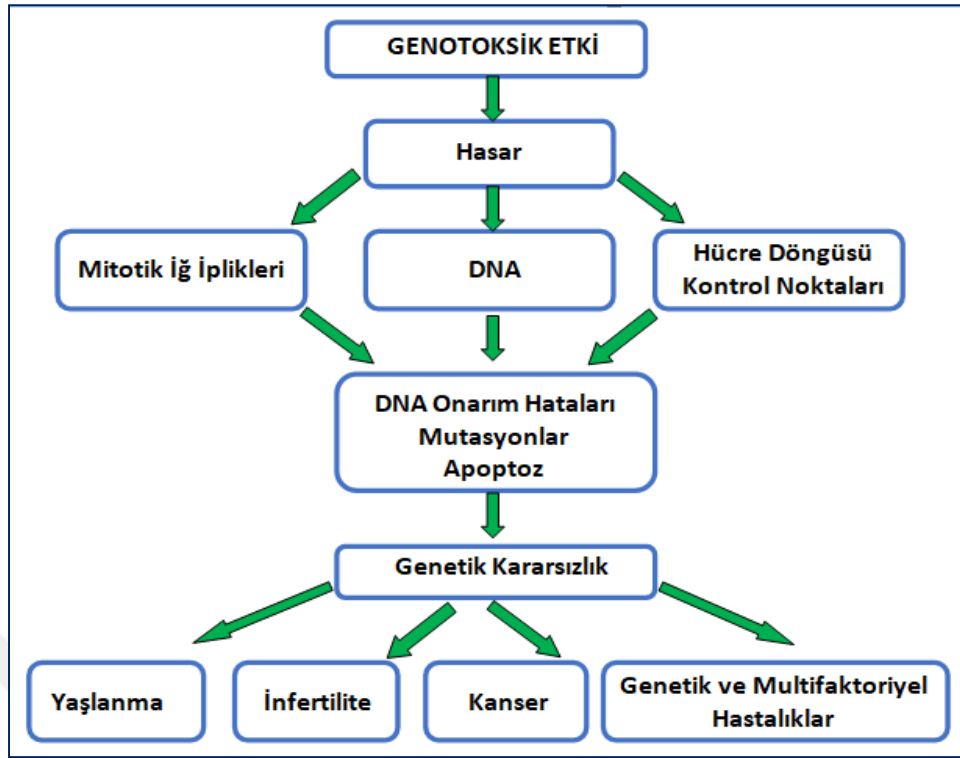
Shi vd. (2013), yaklaşık 4 hafta kadar süren sub-akut toksisite çalışmalarında, TiO₂ NP'nün akut çalışmalarda olduğu gibi toksik etkilerini rapor etmişlerdir.

2.3. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite veya genetik toksisite; nükleus (çekirdek), kromozom veya DNA'nın yapısında meydana gelen DNA kırıkları, DNA eklentileri, gen mutasyonları, kromozom anomalileri, klastojenite, anöploidi gibi hasarları ifade etmektedir (Kutoğlu, 2017). Genotoksisiteye neden olan maddeler ise "genotoksik maddeler" olarak tanımlanır. İlaçlar, temizlik ve kozmetik maddeleri, pestisitler, besin katkı maddeleri ve canlıların maruz kalabileceği diğer kimyasal maddeler genotoksik potansiyele sahiptirler (Özkara ve Akyıl, 2015). Genetik toksikoloji; kimyasal ajanların ve radyasyonun kalıtsal materyaller, DNA ve hücreler üzerindeki toksik etkilerini inceler (Kutoğlu, 2017). Genotoksik maddeler etkilerini temel olarak iki yolla göstermektedirler;

Doğrudan veya dolaylı olarak DNA üzerinde hasar meydana getirebilirler,

Hücrede süregelen onarım mekanizmalarında bozulmalara sebep olarak, kendiliğinden meydana gelen DNA hasarı frekansını yükseltebilirler (Könen, 2007).



Şekil 3. Genotoksik etki mekanizması ve sonuçları (Yıldız ve Önen, 2016)

Genotoksik hasar sebebiyle sonraki nesillerin mutasyona uğrama ihtimali, insanlarda büyük endişelere yol açmaktadır. Bu endişeye sebep olan mutajenler, EPA (United States Environmental Protection Agency-ABD Çevre Koruma Kurumu) Pestisit ve Toksik Maddeler Ofisi Test Şemalarına ve OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development-Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) Uluslararası Uyumlaştırılmış Test Rehberine de yansımış olup, insanlarda kalıtsal mutasyonlara yol açma potansiyellerine göre sınıflandırılmıştır (Kutoğlu, 2017).

Hızlı endüstrileşme ve sanayileşmeyle birlikte artan çevre kirliliği, canlıların daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmasına, beraberinde toksik, mutajenik, karsinojenik, teratojenik ve benzeri etkiler ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Demirel ve Zamani, 2002). Böylece, fiziksel ve kimyasal ajanların etkisiyle doku hasarı, hücre yaşlanması, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoriyel hastalıklara yakalanma oranı hızla yükselmektedir. Bu durum, genotoksisite çalışmalarına nitelik ve nicelik bakımından daha fazla önem verilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır (Sezginer ve Dane, 2016).

Genotoksisite çalışmaları ilk olarak Hermann Joseph Muller tarafından yapılmıştır. Muller, yirminci yüzyılın başlarında *Drosophila melanogaster* (meyve sineği) kromozomlarının yapısı ve genetik mutasyonlar üzerinde çalışmıştır. 1926 ve 1927'de, organizmanın, yüksek enerjili bir radyasyon şekli olan x-ışınlarına maruz kalmasının, özellikle yumurta ve sperm genomunda değişiklik yapan genetik mutasyonlara neden olabileceğini gösteren üç deney yapmıştır. Deneylerinde *Drosophila melanogaster*'i x ışınlarına maruz bırakmış, çiftleştirmiş ve yavrulardaki mutasyonların sayısını gözlemlemiştir. Muller 1927'de, "Genin Yapay Transmutasyonu" ve "Genik Modifikasyon Problemi" konusundaki deney sonuçlarını açıklamıştır. Bu araştırması ile Nobel Fizyoloji/Tıp Ödülünü almıştır (Gleason, 2017).

İlerleyen dönemlerde genotoksik karsinojenlerin tespit edilmesi için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Genotoksisite testleri; kimyasal maddelerin kromozomal anomalilere, mutasyonlara, DNA hasarlarına sebep olup olmadığını tespit etmek ve etki mekanizmalarını araştırmak amacıyla uygulanmaktadır. En çok kullanılan genotoksisite testleri; Comet (kuyuklu yıldız) Testi, Bakteriyel (*Salmonella typhimurium*) Geri Mutasyon Testi (AMES), Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi, Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) İleri Mutasyon Testi, Mikronükleus (MN) Testi, Kromozom Anormalliği (KA) Testi, Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testidir (SMART) (Yüzbaşıoğlu vd., 2014).

Genotoksisite test yöntemlerinde aranan ideal özellikler; uygulamanın kolay olması, genotoksik hasarın belirlenmesinde etkin olması, hızlı ve güvenilir sonuç vermesi, ekonomik olması ve analiz için az sayıda örnek gerektirmesidir (Könen, 2007).

2.4. Mikronükleus (MN) Testi

Mikronükleus (MN), hücre bölünmesi esnasında kromozom fragmentinin veya kromozomların ortamda serbest kalmasıyla oluşan, ana çekirdeğe dâhil olmayan, nükleoplazma ile sarılı yapıdır (Yıldız ve Önen, 2016). MN, genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kromozomal hasarlardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından kaynaklanmaktadır.

Kromozom kırıkları mitoz ve mayozda hücre siklusunun G1, S ve G2 evrelerinde oluşabilir. Yapısal olarak, kromozomlarda iki tip kırık gerçekleşebilir. Bunlar; kromozom kırıkları ve kromatid kırıkları şeklindedir. Fiziksel veya kimyasal ajanın bu kırık tiplerinden hangisine sebep olacağı, hücre siklusunun hangi fazında etkili olduğu ile ilgilidir. Fiziksel veya

kimyasal ajan, mitozun G0 ya da G1 fazında etki ediyorsa kromozom tipi kırıklara, S ya da G2 fazında etki ediyorsa kromatid tipi kırıklara neden olur. Kromozom kırıkları, G1 fazında yalnız bir kromatidde bir kırık meydana getirir ve bu kırık S fazı boyunca devam ederse, metafazdan sonra her iki kromatidde de kırık oluşur ve kromozom tipi kırığa sebep olur. Bu kırık tekrar birleşmezse, delesyonlu bir kromozom ve asentrik bir fragment meydana gelir. Kromozom kırılması sonucu oluşan asentrik fragmentler metafazda M kontrol noktasında onarılabılır veya anafazda mikronükleus oluşumuna sebep olabilir (Üstüner, 2011).

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların sebep olduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin (Özkara ve Akyıl, 2015) ve somatik hücrelerde genomik kararsızlığın dolaylı göstergesi olarak kabul edilmektedir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Araştırmaların birçoğu, kanser ve genomik düzensizlik şeklinde karakterize edilen çeşitli hastalıklara maruz kalan insanlarda, MN frekansının önemli düzeyde yüksek olduğunu ortaya koymaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

MN, ilk kez Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde tespit edilmiş, Joly tarafından bugünkü ismiyle adlandırılmıştır (Yıldız ve Önen, 2016). Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği olarak da tanımlanmaktadır (Üstüner, 2011). MN Testi; 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde kullanılmış (Demirel ve Zamani, 2002), 1951 yılında Thoday tarafından *Vicia faba*'da uygulanmıştır. Boller ve Schmid 1970'te, Heddle 1973'te kemik iliği eritrositlerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerini tespit etmek için MN oluşumlarını gözlemlemişlerdir (Özkan, 2009). MN testi, 1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla yapılan genetik hasarın tespiti çalışmalarında güvenilir bir yöntem haline gelmiştir (Sezginer ve Dane, 2016). Genotoksisite potansiyeli tespit edilmek istenen maddelerin karsinogenik ve mutajenik etkileri arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testlerinden biridir (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011). Uygulama kolaylığı, fazla sayıda hücre sayılabilmesi ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sebebiyle de araştırmalarda tercih edilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002). Mavournin ve arkadaşları, kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla 1990 yılına kadar yapılan MN çalışmalarının sonuçlarını derleyerek, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-Toks Programına dâhil etmişlerdir (Demirel ve Zamani, 2002).

OECD raporlarında MN testinin memelilerde *in vivo* ve *in vitro* uygulanma protokolleri açıklanmıştır. Buna göre; memeli *in vivo* MN testi, test kimyasalının eritrosit kromozomlarında sebep olduğu hasarı tespit etmek ve hasara neden olan maddeleri tanımlamak için kullanılır (OECD TG 474, 2014). *In vitro* MN testi, hücre bölünmesinde anafaz aşamasında asentrik kromozomların bir bölümünden veya tamamından kaynaklanan MN oluşumunun saptanması için kullanılan genotoksisite testidir. *In vitro* MN testi, kromozomal hasar potansiyelini araştırmak için kapsamlı bilgi sağlayan temel bir yöntemdir. Çünkü bu test yöntemiyle hem bölünme esnasında hem de sonrasında hücrenin maruz kaldığı anojen ve klastojenler tespit edilebilir (OECD TG 487, 2014).

MN testi çevresel etkenlerden kaynaklanan genotoksik hasarın belirlenmesinde de büyük öneme sahiptir. Endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu oluşan çeşitli toksik kimyasallar, sucul ortamlardaki kirliliği artırmaktadır. Bu kimyasallar, yalnızca doğrudan maruz kalan organizmalara değil, bunlarla beslenen insanlara ve diğer organizmalara da zarar verebilir, genetik materyallerinde hasar oluşturabilir (Özkan vd., 2011).

Kimyasalların genotoksik ve antigenotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi için yapılan MN ve nükleer anomali testlerinde balıklar yoğun olarak kullanılmakta ve tercih edilmektedir. Bunun sebebi, balıkların toksik maddelere genellikle yüksek omurgalılara benzer şekilde tepki vermeleridir (Ali vd., 2008; Könen Adıgüzel ve Çavaş, 2017).

2.4.1. *In vivo* Mikronükleus (MN) Test Protokolü

In vivo MN testinde kullanılacak kontrol ve deney grupları, rastgele seçilen sağlıklı hayvanlardan oluşturulur. Hayvanlar, önceden belirlenmiş konsantrasyonlardaki test maddesine maruz bırakılır. Muameleden sonra hayvanlara etik prosedüre uygun olarak ötenazi uygulanır ve kan örnekleri alınır. Maruz kalma süresinin sonu ile kan elde etme arasında mümkün olduğunca az zaman geçmesi gerekir. Preparatlar hazırlanır ve kurutulur. Fikse edildikten sonra tekrar kurutulur. Giemsa boyama yapılır ve tekrar kurutulur, entellan ile kapatılır. Pozitif ve negatif kontroller dâhil tüm lamalar mikroskopik analizden önce kodlanır. Mikroskop kullanılarak hücreler görüntülenir. Hayvan başına en az 4000 eritrosit sayılır ve elde edilen veriler analiz edilir (OECD TG 474, 2014).

2.4.2. Mikronükleus (MN) Değerlendirme Kriterleri

Hazırlanan preparatlarda yer yer bulunabilen boya partikülleri, doku parçaları veya diğer bazı kirleticiler, mikroskop incelemesi esnasında MN ile karıştırılabilmektedir. Bu ve benzeri hataların en aza indirilebilmesi için MN sayımlarında genel olarak standardize edilmiş kriterlere uyulması gerekmektedir.

Bu kriterler şöyle sıralanabilir;

Mikronükleus, ana nükleusun $1/3$ 'ünden daha küçük olmalıdır,

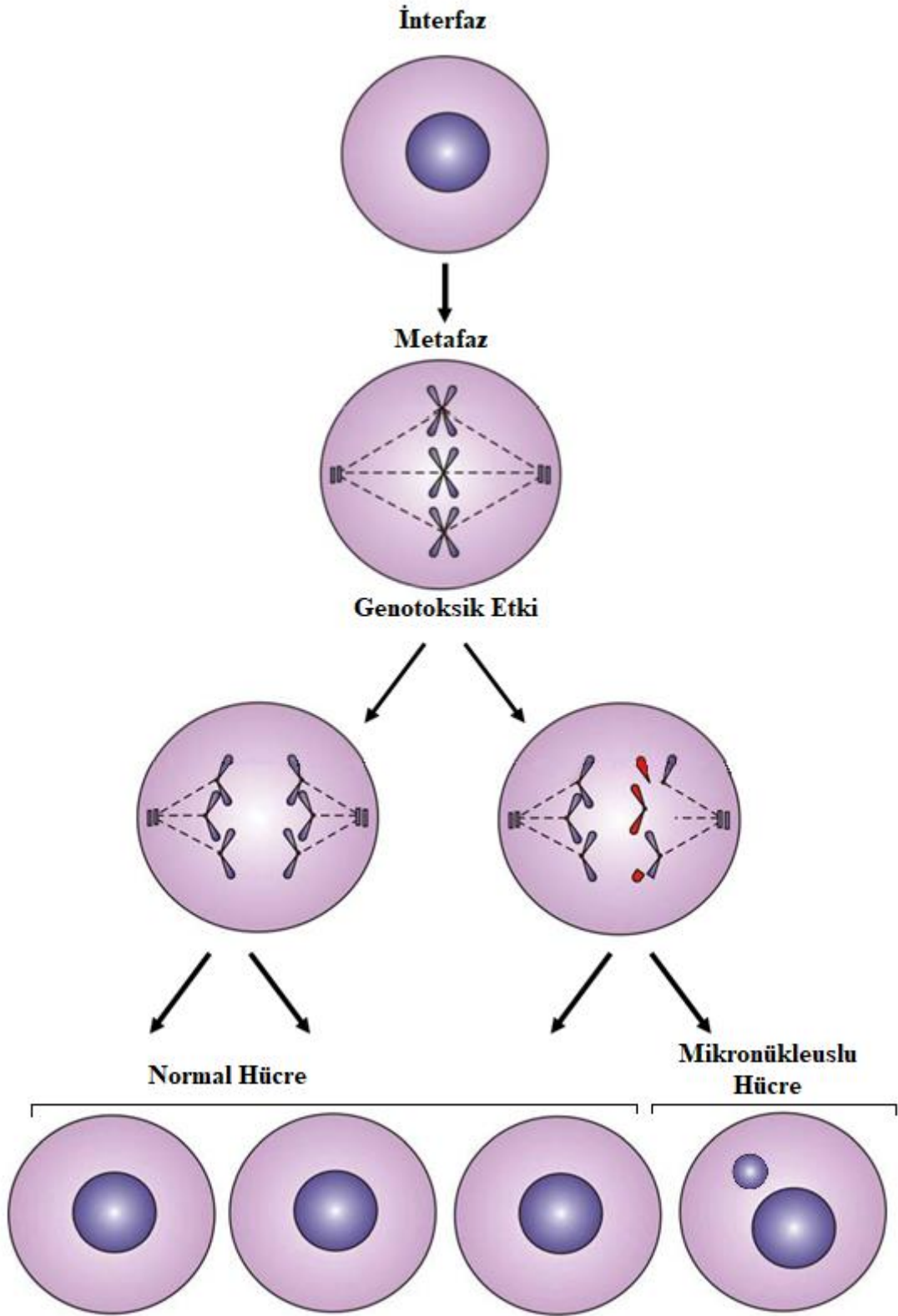
Mikronükleus, ana nükleus ile aynı boyama tonuna sahip olmalıdır,

Mikronükleus, ana nükleus ile aynı mikroskopik refleyi vermelidir,

Mikronükleus, nükleusa yakın olmalı fakat yapışık olmamalıdır,

Mikronükleus içeren hücre, diğer hücrelerden ayrı bulunmalıdır (Kutoğlu, 2017).

Mikroskop incelemesinde MN, mitoz bölünme esnasında klastojenik etki veya anojenik hatalara bağlı olarak kromozomlardan kopan fragmentlerin ve ana nükleusa dâhil olamayan, sitoplazma içerisinde ana nükleus yanında gözlenen küçük nükleus yapısı şeklinde görülür (Könen, 2007).



Şekil 4. Mikronükleus içeren hücrenin oluşum safhaları (Könen, 2007)

2.4.3. Morfolojik Nükleus Düzensizlikleri

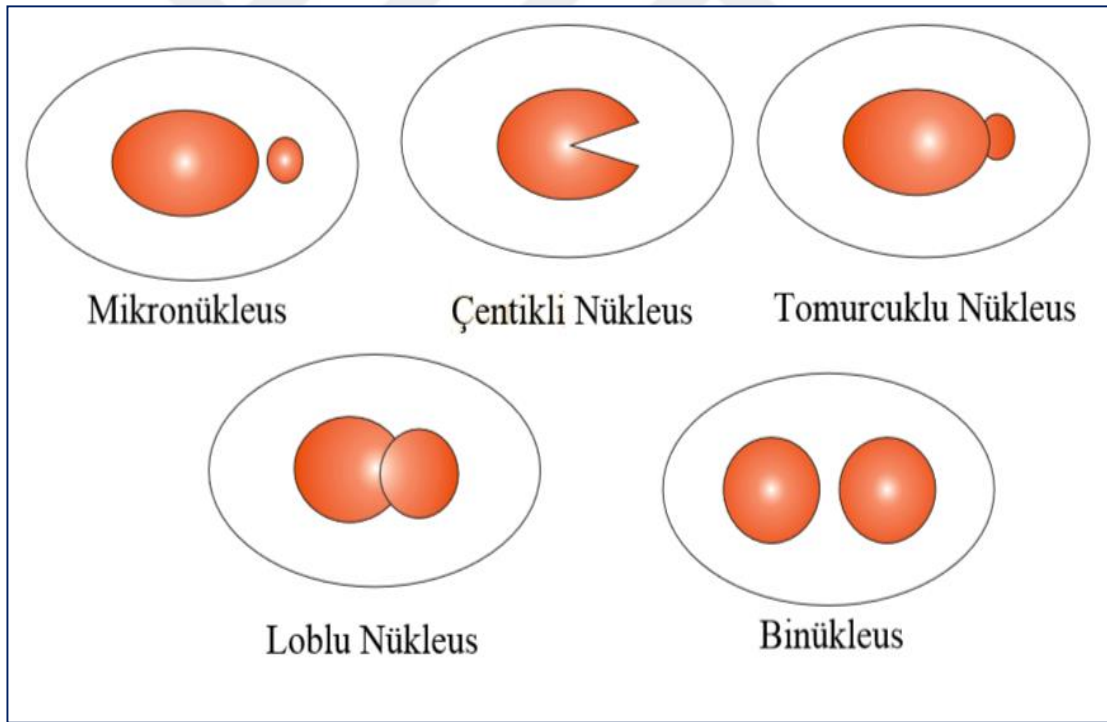
Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco vd.'ne (1990) göre; binükleus, çentikli nükleus, tomurcuklu nükleus ve loblu nükleus olmak üzere başlıca dört grup altında değerlendirilmiştir.

Binükleus (binucleus): Bir hücrenin iki adet nükleus içermesidir.

Çentikli nükleus (notched nucleus): Nükleus zarından içeri doğru çentik şeklinde oluşur, kromatin içermez.

Tomurcuklu nükleus (budded nucleus): Nükleus zarından dışarı doğru çıkıntılar şeklinde oluşur, tomurcuk şeklindedir, kromatin içerir.

Loblu nükleus (lobed nucleus): Tomurcuklara göre daha büyük olan loblar şeklinde görülür, kromatin içerir (Kutoğlu, 2017).



Şekil 5. Mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizliklerinin şematik görünümü (Könen, 2007)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Etik Prosedür

Balıkların bakımı ve beslenmesi ile ilgili prosedür; OECD Guideline for Testing of Chemicals/Fish, Acute Toxicity” Test Kılavuzuna (OECD 203, 1992) ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Kararına (ADÜ HADYEK, 64583101/2018/115) uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Canlı hayvan üzerinde uygulanan deney prosedürü; OECD Guideline for Testing of Chemicals/Fish, Acute Toxicity Test Kılavuzuna (OECD 203, 1992), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Kararına (ADÜ HADYEK, 64583101/2018/115) ve The Principles of Humane Experimental Technique’de (Russel ve Burch, 1959) yayınlanan 3R (Replacement: yerine koyma; Reduction: azaltma; Refinement: iyileştirme) ilkelerine (Kirk, 2018) uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Laboratuvar ve Ekipman

Araştırmamız, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarı ve Histoloji/Embriyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Deney hayvanlarının bakımı, beslenmesi, kimyasal ile muamele edilmesi, hayvanların feda edilmesi ve kan örneklerinin alınması işlemleri Genetik Laboratuvarında; muamele edilecek kimyasalın hazırlanması, yayma preparat hazırlanması, mikroskop incelemesi ve fotoğraflama işlemleri Histoloji/Embriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Canlı Materyal Temini, Bakımı ve Gruplandırılması

Araştırmamızda kullandığımız *L. caeruleus* (Fryer, 1956) türü balıklar, ADÜ Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümünden temin edilmiş, ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarında yetiştirilmiştir.

Laboratuvar, balıkların yaşam koşullarına uygun olarak düzenlenmiştir. Balıklar 30x50x80 cm ebatlarında 120 L kapasiteli ve 30x50x100 cm ebatlarında 150 L kapasiteli cam akvaryumlarda yetiştirilmiş, 23.0°C’de (± 2.0), 14:10 saat aydınlık/karanlık rejimine tabi tutulmuştur. Laboratuvar havalandırılmış, suyun buharlaşmaması için akvaryumların üzeri özel kapaklarla kapatılmıştır. Yetiştirme esnasında akvaryum su miktarının, toplam su kapasitesinin %90’ının altına düşmemesine dikkat edilmiştir. 5-7 günlük periyotlarla akvaryumlar

temizlenmiş ve su ilavesi yapılmış, 12 saatlik periyotlarla su sıcaklığı ölçülmüş, balıkların yem tüketim miktarı gözlenmiş ve sağlık takipleri yapılmıştır. Balıklar, türlerine ve yaşamsal evrelerine uygun olarak ticari çiklet balık yetiştiricilerinden temin edilen yemle 12 saatte bir kez beslenmiştir.



Resim 4. Laboratuvar koşullarında barındırılan ergin *L. caeruleus* bireyleri

Balıkların, deneyde kullanılacak akvaryumlara alıştırılması için TiO_2 muamelesinden 14 gün önce negatif ve pozitif kontrol grubu için 2, deney grupları için 3 adet olmak üzere, her biri 40x35x20 cm ebatlarında 28 L kapasiteli toplam 5 adet akvaryum hazırlanmış, balıklar bu akvaryumlarda 20 L suda barındırılmıştır. Deney gruplarının (üç farklı konsantrasyon ve üç farklı süre) her biri için 5'er adet, negatif kontrol için 5 adet ve pozitif kontrol için 5 adet olmak üzere, 28 erkek ve 27 dişiden oluşan toplam 55 balık seçilmiştir. Her grupta yaklaşık sayıda erkek ve dişi (3 erkek 2 dişi veya 2 erkek 3 dişi) olacak şekilde gruplara rastgele dağılım yapılmıştır. Deneyde, aynı dönemde kuluçkadan çıkan, sağlıklı, ergin dişi ve erkek bireyler kullanılmış, kuluçkada olduğu tespit edilen dişiler kullanılmamıştır. Balıkların ağırlık ve uzunlukları ölçülmüştür. Balıkların ağırlığı 5,83-7,10 gr (ortalama: 6,55 gr), uzunluğu 6,57-8,51 cm (ortalama: 7,38 cm) olarak tespit edilmiştir. Balıkların yetiştirilmesi için uygun yaşam koşullarının sağlanması, deneyde kullanılacak balık sayısının belirlenmesi, dişi ve erkek birey dağılımının dengelenmesi, balıkların seçimi ve gruplara atanması, deney akvaryumlarına

alıştırılması ve benzeri işlemler, bu çalışmada belirtilen etik prosedüre uygun olarak yapılmıştır (3.1. Etik Prosedür).

3.4. TiO₂ Nanopartikülünün Hazırlanması

Araştırmamızda kullandığımız TiO₂ NP'ü, Sigma Aldrich firmasından (CAS Number: 1317-70-0) temin edilmiştir. Molekül ağırlığı 79,87 g/mol, nanopartikül boyutu 25 nm'dir ve anataz formundadır.

Deney gruplarında kullanılan NP konsantrasyonu ve uygulama süreleri OECD'nin TG 474 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2014) ve 203 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, Fish, Acute Toxicity Test, 1992) numaralı kılavuzları ile önceki araştırmalarda tavsiye edilen oranlara uygun olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol grubunda dinlendirilmiş su kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubunda; memeli hayvan deneylerinde yoğun olarak kullanılan, birkaç balık türünde klastojenik, mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etki gösterdiği bilinen (Könen Adıgüzel ve Çavaş, 2017) Etil Metan Sülfonat (EMS) kullanılmıştır.

Çizelge 1. Deney Planı

	Kimyasal	Konsantrasyon	Uygulama Süresi		
Negatif Kontrol Grubu	-	-	24 saat		
Pozitif Kontrol Grubu	EMS	5 mg/L	24 saat		
Deney Grupları	TiO ₂	25 mg/L	24 saat	48 saat	96 saat
		50 mg/L	24 saat	48 saat	96 saat
		100 mg/L	24 saat	48 saat	96 saat

TiO₂ hassas terazide tartılarak, 1 litre dinlendirilmiş suda 7 gr TiO₂ içerecek şekilde stok çözelti hazırlanmıştır (7 gr/L). Stok çözelti konsantrasyonu şu şekilde hesaplanmıştır: Deney esnasında balıkların barındırıldığı akvaryumlardaki su miktarı 20 L'dir. NP uygulaması için başlangıçta ihtiyaç duyulan TiO₂ miktarı; 100 mg/L konsantrasyonun sağlanması için 2 gr (20x100 mg/L), 50 mg/L konsantrasyonun sağlanması için 1 gr (20x0,5 mg/L) ve 25 mg/L konsantrasyonun sağlanması için 0,5 gr'dır (20x25 mg/L). Deney sürecinde, ilk uygulamadan sonra 24 saatte bir kez olmak üzere toplam 2 kez (24 saat ve 48 saat sonunda) NP konsantrasyonu değişmeyecek şekilde akvaryum sularının yarısı (10 L) yenileneceği için her bir yenilemede, başlangıçta ihtiyaç duyulan miktarın yarısı kadar NP gerekmektedir. Buna göre deney sürecinde 100 mg/L konsantrasyon için 4 gr (2+1+1 gr), 50 mg/L konsantrasyon için 2

gr (1+0,5+0,5 gr), 25 mg/L konsantrasyon için 1 gr (0,5+0,25+0,25 gr) olmak üzere toplam 7 gr TiO_2 kullanılmıştır. Stok çözeltiden, seyreltme yöntemiyle 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde çözelti elde edilmiştir. Akvaryum sularına eklemekten önce TiO_2 çözeltilerine 30'ar dakika sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubuna uygulanmak üzere 5 mg/L EMS konsantrasyonunu sağlayacak şekilde 100 mg/L (20x5 mg/L) EMS hazırlanmıştır.



Resim 5. TiO_2 çözeltisine sonikasyon işlemi uygulanması

3.5. Balıkların TiO_2 ile Muamele Edilmesi

TiO_2 ile 24, 48 ve 96 saat, EMS ile 24 saat muamele edilecek grupların bulunduğu 20 L su içeren akvaryumların her birinden 1 L su boşaltılmıştır. Deney gruplarının bulunduğu akvaryumlarda 100 mg/L, 50 mg/L ve 25 mg/L TiO_2 konsantrasyonlarının sağlanması için stok çözeltiden önceden hazırlanmış olan sırasıyla 2 gr/L, 1 gr/L ve 0,5 gr/L TiO_2 içeren çözelti eklenmiştir. Pozitif kontrol grubunun bulunduğu akvaryumdan 1 L su boşaltılarak, 5 mg/L EMS konsantrasyonunun sağlanması için 100 mg/L EMS içeren 1 litre çözelti eklenmiştir.

24 saat sonunda, akvaryum sularının %50'si TiO_2 konsantrasyonu değişmeyecek şekilde değiştirilmiş su ile yenilenmiştir. Akvaryum suyu yenileme işlemi şu şekilde yapılmıştır: TiO_2 'in akvaryum zeminine çökme ihtimaline karşı, balıklara zarar vermeyecek şekilde akvaryum suyu homojen hale getirilmiş, ardından 10 L su boşaltılmıştır. 20 L suda 100 mg/L,

50 mg/L ve 25 mg/L TiO_2 konsantrasyonunun sağlanması için başlangıçta eklenen konsantrasyonun (sırasıyla 2 gr/L, 1 gr/L ve 0,5 gr/L) yarısı kadar (sırasıyla 1g/L, 0,5 gr/L ve 0,25 gr/L) TiO_2 içeren 1 L çözelti akvaryumlara ilave edilmiştir. 9 litre dinlendirilmiş su eklenerek toplam su miktarı 20 L'ye tamamlanmıştır. 48 saat sonundaki yenilemede, bu işlemler tekrar edilmiştir. 12 saatte bir kez hayvanlarda ölüm, hastalık belirtisi, davranış değişikliği, yem alım miktarı gözlenmiş, su sıcaklığında değişim olup olmadığı kontrol edilmiştir. Herhangi bir anormallik gözlenmemiştir.



Resim 6. TiO_2 ile muamele edilen *L. caeruleus* bireyleri

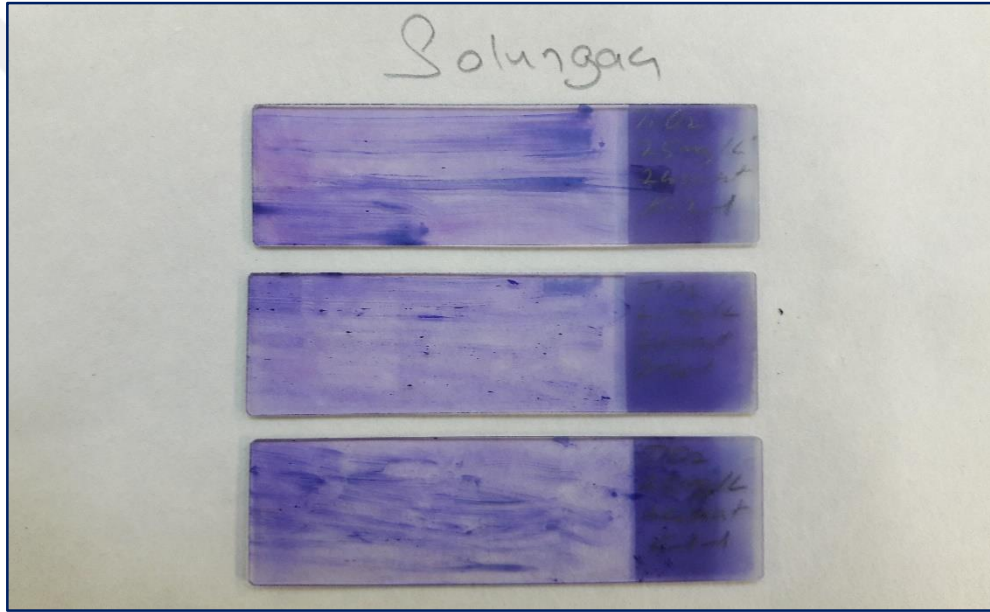
3.6. Balıkların Feda Edilmesi, Preparatların Hazırlanması

Canlı hayvan üzerindeki prosedür, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına sahip olan uzman (Prof. Dr. Yücel Koca, Sertifika No: 2010/000192) tarafından gerçekleştirilmiştir. 24, 48 ve 96 saatlik periyotların sonunda hayvanlara etik kurallara uygun olarak ötenazi (fiziksel travma ile ani ölüm) uygulanmıştır.

Çalışmanın sonuçları bakımından dişi ve erkek bireyler arasında ayırım yapılmamıştır. 24 saatlik sürenin sonunda, negatif ve pozitif kontrol grubu ile 3 farklı konsantrasyonda TiO_2 içeren akvaryumlardan yaklaşık sayıda erkek ve dişi (3 erkek, 2 dişi veya 2 erkek, 3 dişi) olacak şekilde, 5'er balığın her biri file yardımıyla çıkarılmış, temiz bir zemin üzerine alınmış ve ötenazi uygulanmıştır. Balıkların acı çekmemesi için tek seferde fiziksel travma ile ani ölüm sağlanmıştır. Solunum problemi nedeniyle zarar görmemeleri için prosedür işlemleri ara

verilmeden uygulanmıştır. Bir deney hayvanına ötenazi uygulanırken diğer hayvanların normal barınma koşulları devam ettirilmiştir. Deney sonuçlarının güvenilirliği bakımından herhangi bir yatıştırıcı kullanılmamıştır.

Yayma preparat prosedürüne uygun olarak, solungaç ve kuyruk kanından alınan örneklerin her biri için 2'şer adet olmak üzere balık başına toplam 4 adet yayma preparat hazırlanmıştır. Yayma preparat prosedürü şu şekilde uygulanmıştır: Ötenazi işleminin uygulanmasının ardından, ara vermeden kan örnekleri preparatlara alınarak oda sıcaklığında hava ile kurutulmuştur. Preparat numarası, konsantrasyon ve süre bilgisini içerecek şekilde kodlanmıştır. 20 dakika metanolde fiske edilmiş ve kurutulmuştur. Ardından 20 dakika Giemsa (%10) boyama yapılmış, distile su ile yıkanmış, aynı şartlarda tekrar kurutulmuştur.



Resim 7. TiO_2 ile muamele edilen *L. caeruleus*'tan alınan örneklerle hazırlanan yayma preparat

48 ve 96 saat sonunda TiO_2 ile muamele edilen diğer deney gruplarında, prosedüre uygun olarak aynı işlemler tekrar edilmiş ve preparat hazırlanmıştır. 24 saat sonunda 25 adet, 48 saat sonunda 15 adet, 96 saat sonunda 15 adet olmak üzere toplamda 55 balığa ötenazi işlemi uygulanmıştır. Solungaç ve kuyruk örneklerinden 110'ar adet olmak üzere toplam 220 yayma preparat hazırlanmıştır. Ötenazi uygulanan hayvanlar, fakülte bahçesinde uygun bir alana gömülerek doğaya dönüşümleri sağlanmıştır.

3.7. Mikroskop İncelemesi

Mikroskop incelemesi; ADÜ FEF Histoloji/Embriyoloji Laboratuvarında bulunan Olympus BX 51 mikroskop kullanılarak yapılmıştır. Her gruptaki 5'er balığın her birinin solungaç ve kuyruk örneklerinden hazırlanan 2'şer adet yayma preparat mikroskopta incelenmiştir. 2 preparatın herhangi birinin veya her ikisinin incelenmesinde, 3000 hücreye ulaşıldığında inceleme ve sayım işlemi tamamlanmıştır. Böylece her balıkta solungaç örneklerinden 3000 adet ve kuyruk örneklerinden 3000 adet olmak üzere balık başına toplam 6000 hücre sayılmıştır. Her balığın solungaç ve kuyruk örneklerindeki 3000'er adet hücrenin incelenmesinden elde edilen hücre sayım sonuçları ile mikronükleus (MN), binükleus (BN), çetikli nükleus (ÇN), tomurcuklu nükleus (TN) ve loblu nükleus (LN) sayıları ayrı ayrı kaydedilmiştir. Mikroskopik görüntüler, Olympus E-330 dijital kamera ile fotoğraflanmıştır.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS Statistics Base 22.0 programı kullanılmıştır. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve deney gruplarında bulunan 5'er balığın her birinin solungaç ve kuyruk örneklerinin mikroskop incelemesinden elde edilen MN, BN, ÇN, TN ve LN sayılarının her birinin grup olarak ortalamaları (%) belirlenmiş, Kolmogorov-Smirnov testi sonucunda verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir ($P>0.05$). Normal dağılım gösteren verileri grup olarak değerlendirmek, konsantrasyon ve süre arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla parametrik testlerden biri olan Independent Samples t Test yapılmıştır. Solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekansları ile morfolojik nükleus düzensizlik (BN, ÇN, TN, LN) frekansları ayrı ayrı analiz edilmiştir.

Toplam genotoksik hasarın analiz edilmesi için negatif kontrol, pozitif kontrol ve deney gruplarının solungaç ve kuyruk örneklerinin incelenmesi sonucunda her bir grupta elde edilen MN, BN, ÇN, TN ve LN verileri toplanmış ($MN+BN+ÇN+TN+LN$), toplam genotoksik hasar verilerinin grup olarak ortalamaları (%) hesaplanmıştır. Kolmogorov-Smirnov testi sonucunda toplam genotoksik hasar frekanslarının normal dağılım gösterdiği ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Verilerin grup olarak değerlendirilmesi için Independent Samples t Test yapılarak toplam genotoksik hasar frekansları analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikronükleus (MN) Verileri

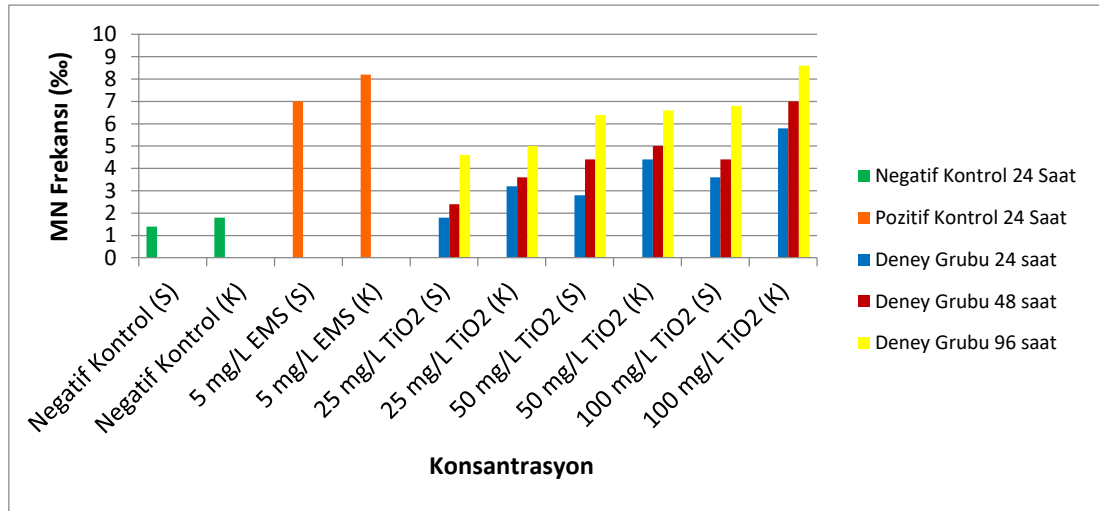
4.1.1. Mikronükleus (MN) Frekanslarının Değerlendirilmesi

Araştırmamızda; negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu ve TiO₂'in 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarına 24, 48 ve 96 saatlik periyotlarla maruz bırakılan *L. caeruleus* bireylerinin solungaç ve kuyruk örneklerinin incelenmesinden elde edilen veriler analiz edilmiş, ortalama MN frekansları (‰, Ortalama $\pm$ S.H.) belirlenmiştir (Çizelge 2). Ayrıca MN frekanslarının değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir (Şekil 6).

Çizelge 2. *L. caeruleus* bireylerinde mikronükleus (MN) frekansları (‰, Ortalama $\pm$ S.H.)

Konsantrasyon	MN S-K	Uygulama Süresi		
		24 Saat		
Negatif Kontrol	S	1,40 $\pm$ 1,14		
	K	1,80 $\pm$ 0,84		
5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	7,00 $\pm$ 1,58***		
	K	8,20 $\pm$ 1,92***		
Konsantrasyon	MN S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat
25 mg/L TiO ₂	S	1,80 $\pm$ 1,48	2,40 $\pm$ 1,14	4,60 $\pm$ 1,14**
	K	3,20 $\pm$ 1,92	3,60 $\pm$ 1,34*	5,00 $\pm$ 1,00**
50 mg/L TiO ₂	S	2,80 $\pm$ 2,17	4,40 $\pm$ 1,82*	6,40 $\pm$ 1,14***
	K	4,40 $\pm$ 2,30*	5,00 $\pm$ 1,00**	6,60 $\pm$ 1,34***
100 mg/L TiO ₂	S	3,60 $\pm$ 1,14*	4,40 $\pm$ 2,07*	6,80 $\pm$ 1,30***
	K	5,80 $\pm$ 2,59*	7,00 $\pm$ 2,12**	8,60 $\pm$ 1,14***

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; TiO₂: Titanyum dioksit; EMS: Etil metan sülfonat; MN: Mikronükleus; S: Solungaç; K: Kuyruk



Şekil 6. *L. caeruleus* bireylerinde mikronükleus (MN) frekanslarının değişimi (‰)

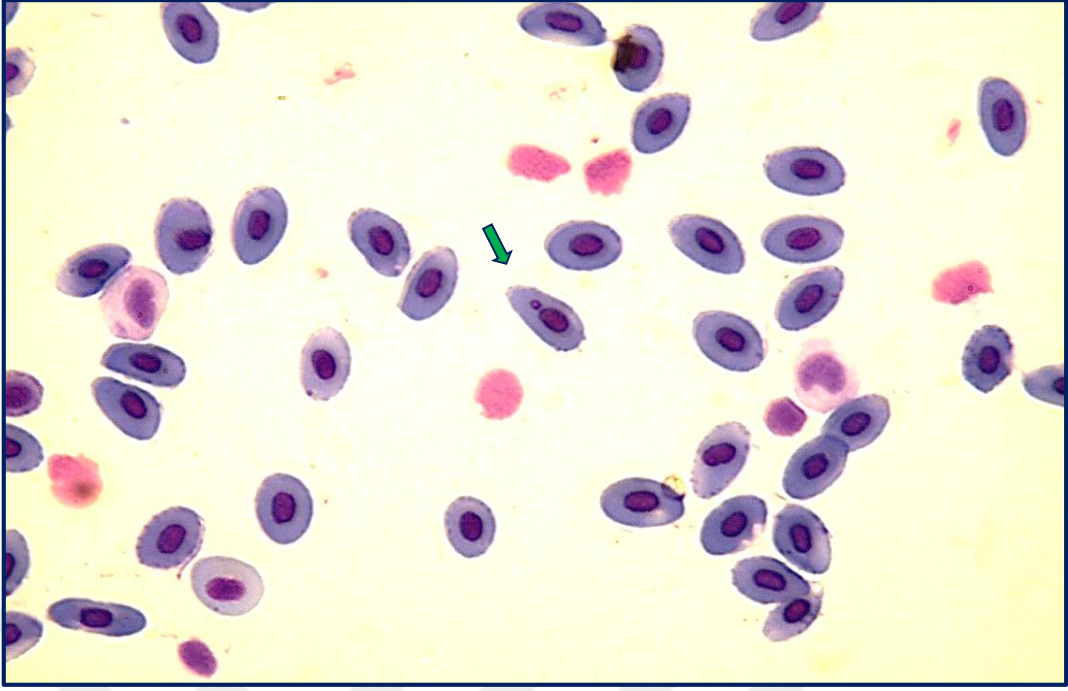
24 saat süreyle 5 mg/L EMS uygulanan pozitif kontrol grubunda solungaç ($7,00 \pm 1,58$) ve kuyruk ($8,20 \pm 1,92$) örneklerinin MN frekansları, negatif kontrol grubunun solungaç ($1,40 \pm 1,14$) ve kuyruk örneklerine ($1,80 \pm 0,84$) oranla anlamlı artış göstermiştir ($P < 0.001$).

Deney gruplarının tamamında solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekansları, negatif kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Fakat bu artışın, grupların tamamında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Solungaç örneklerinin MN frekansı analizinden elde edilen sonuçlara göre; 25 mg/L konsantrasyonda 24 ve 48 saat sonunda MN frekanslarında negatif kontrole oranla bir artış gerçekleşse de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P > 0.05$), yalnızca 96 saat sonunda anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.01$). 50 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda anlamlı bir artış olmamış, 48 saat ($P < 0.05$) ve 96 saat ($P < 0.001$) sonunda anlamlı artış olmuştur. 100 mg/L konsantrasyonda 24, 48 ve 96 saatlik periyotların tamamında farklı düzeylerde de olsa negatif kontrole oranla anlamlı artış olmuştur (24 saat: $P < 0.05$; 48 saat: $P < 0.05$; 96 saat: $P < 0.001$). Buna göre solungaç örneklerinde en yüksek anlamlılık düzeyine sahip MN frekansı 50 mg/L ($6,40 \pm 1,14$) ve 100 mg/L ($6,80 \pm 1,30$) konsantrasyonda 96 saat sonunda ortaya çıkmıştır ($P < 0.001$).

Kuyruk örneklerinin MN frekansı analizine göre; 25 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda anlamlı artış olmamış, 48 saat ($P < 0.05$) ve 96 saat ($P < 0.01$) sonunda anlamlı artış olmuştur. 50 mg/L ve 100 mg/L'lik konsantrasyonlarda 24, 48, 96 saatlik periyodların tamamında negatif kontrole oranla anlamlı artış gerçekleşmiştir. Buna göre kuyruk örneklerinde en yüksek anlamlılık düzeyine sahip MN frekansı 50 mg/L ($6,60 \pm 1,34$) ve 100 mg/L ($8,60 \pm 1,14$) konsantrasyonda 96 saat sonunda ortaya çıkmıştır ($P < 0.001$).

TiO₂ ile muamele edilen deney gruplarında MN frekansları bakımından konsantrasyon-süre etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, uygulama süresindeki artışın MN frekanslarında artışa yol açtığı görülmüştür. Solungaç örneklerinde en düşük MN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda görülürken ($1,80 \pm 1,48$), en yüksek MN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda görülmüştür ($6,80 \pm 1,30$). Benzer şekilde kuyruk örneklerinde en düşük MN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda görülürken ($3,20 \pm 1,92$), en yüksek MN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda görülmüştür ($8,60 \pm 1,14$). *L. caeruleus*'un kan örneklerinde MN oluşumu Resim 8'de gösterilmiştir.



Resim 8. *L. caeruleus*'un kan örneklerinde mikronükleus (MN) oluşumu (40X; 25 mg/L, 24 s.)

4.1.2. Solungaç ve Kuyruk Örneklerinin Mikronükleus (MN) Frekanslarının Karşılaştırılması

Mikronükleus frekansları analizi sonucuna göre; tüm gruplarda kuyruk örneklerinin MN frekansı, solungaç örneklerinin MN frekansından yüksektir. Solungaç ve kuyruk örneklerinin en düşük MN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda ortaya çıkmıştır. Bu grupta solungaç örneklerinin en düşük MN frekansı $1,80 \pm 1,48$ iken kuyruk örneklerinin en düşük MN frekansı $3,20 \pm 1,92$ 'dir. Solungaç ve kuyruk örneklerinin en yüksek MN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda görülmüştür. Solungaç örneklerinin en yüksek MN frekansı $6,80 \pm 1,30$ iken kuyruk örneklerinin en yüksek MN frekansı $8,60 \pm 1,14$ 'tür.

25 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinin MN frekansları negatif kontrole oranla 96 saat sonunda anlamlı artış gösterirken, kuyruk örneklerinin MN frekansı 48 ve 96 saat sonunda anlamlı artış göstermiştir.

50 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinin MN frekansı 48 ve 96 saatte sonunda anlamlı artış gösterirken, kuyruk örneklerinin MN frekansları tüm periyotlarda anlamlı artış göstermiştir.

25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonlarda kuyruk örneklerinin MN frekanslarında, solungaç örneklerine kıyasla daha erken zaman periyotlarında anlamlı artış olmuştur.

100 mg/L konsantrasyonda 24, 48 ve 96 saatlik periyotların tamamında solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekansları anlamlı artış göstermiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde; sonuçlarımız, tüm deney gruplarındaki MN frekansının negatif kontrole kıyasla artış gösterdiğini, kuyruk örneklerinin MN frekanslarının, solungaç örneklerinin MN frekansına göre tüm gruplarda daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. 96 saatlik periyotta 25 mg/L ($P<0.01$), 50 mg/L ($P<0.001$), 100 mg/L ($P<0.001$) konsantrasyonlar ile 24 saatlik periyotta 100 mg/L ($P<0.05$) konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekanslarının anlamlılık düzeyleri benzerlik göstermektedir. Diğer gruplarda kuyruk örneklerinin MN frekansları, solungaç örneklerinin MN frekanslarına göre daha yüksek anlamlılık düzeyine sahiptir (Çizelge 2).

4.2. Morfolojik Nükleus Düzensizlik Verileri

24, 48 ve 96 saatlik sürelerde TiO_2 'in 25mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonlarına maruz bırakılan *L. caeruleus* bireylerinin solungaç ve kuyruk örneklerinin incelemesi sonucu yapılan morfolojik nükleus düzensizlikleri analizi Çizelge 3, 4, 5 ve 6'da verilmiştir. Ayrıca morfolojik nükleus düzensizlik frekanslarının değişimi Şekil 7, 8, 9 ve 10'da grafiksel olarak gösterilmiştir.

24 saat süreyle 5 mg/L EMS uygulanan pozitif kontrol grubunda, solungaç ve kuyruk örneklerinin binükleus (BN), çentikli nükleus (ÇN), tomurcuklu nükleus (TN) ve loblu nükleus (LN) frekanslarında negatif kontrol grubunun solungaç ve kuyruk örneklerine oranla anlamlı artış gerçekleşmiştir ($P<0.001$).

4.2.1. Binükleus (BN) Frekanslarının Değerlendirmesi

Solungaç örneklerinin incelenmesinden elde edilen verilere göre; 25 mg/L ve 50 mg/L konsantrasyonda 48 ve 96 saatte BN frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı artış gerçekleşmiştir. 100 mg/L konsantrasyonda ise 24, 48 ve 96 saatlik periyotların tamamında negatif kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gerçekleşmiştir. Solungaç örneklerinde BN frekanslarının en yüksek anlamlılık düzeyi, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda ortaya çıkmıştır ($P<0.001$).

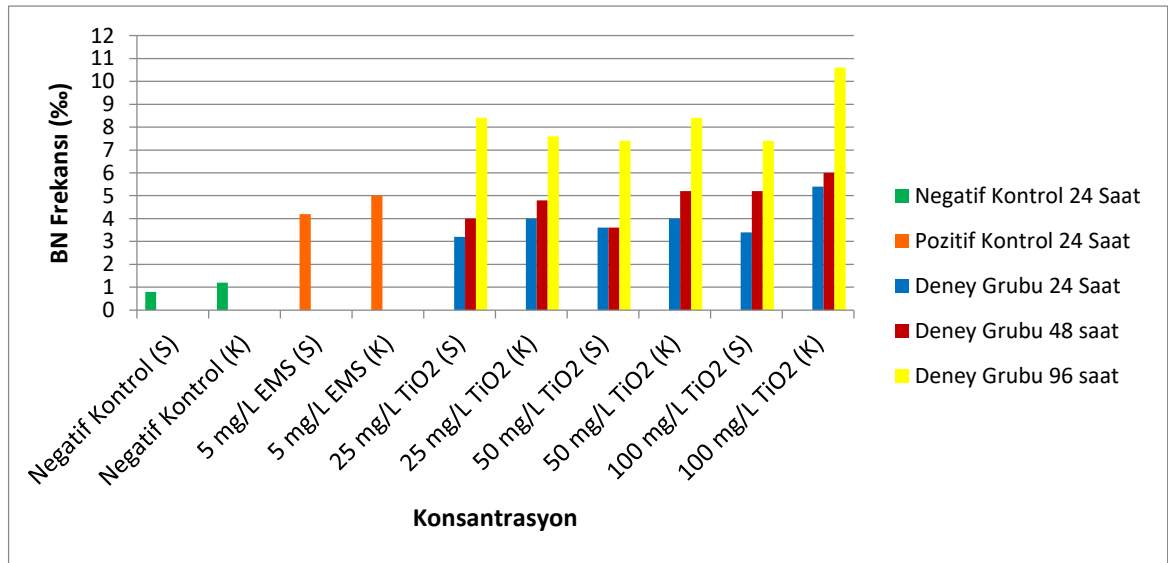
Kuyruk örneklerinin inceleme sonuçlarına göre; 25 mg/L konsantrasyonda 24 saat hariç olmak üzere ($P>0.05$), diğer tüm grupların BN frekanslarında negatif kontrole oranla anlamlı artış olmuştur. Buna göre kuyruk örneklerinin en yüksek BN frekansları 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda ortaya çıkmıştır ($P<0.001$).

BN verilerine göre en düşük BN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saatte ($3,20\pm2,28$) solungaç örneklerinde, en yüksek BN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saatte ($10,60\pm1,67$) kuyruk örneklerinde ortaya çıkmıştır (Çizelge 3). *L. caeruleus*'un kan örneklerinde BN oluşumu Resim 9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3. *L. caeruleus* bireylerinde binükleus (BN) frekansları (%), Ortalama $\pm$ S.H.)

Morfolojik Nükleus Düzensizliği	Konsantrasyon	S-K	Uygulama Süresi			
			24 Saat			
BN	Negatif Kontrol	S	0,80 $\pm$ 0,84			
		K	1,20 $\pm$ 1,30			
	5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	4,20 $\pm$ 0,84***			
		K	5,00 $\pm$ 0,71***			
	Konsantrasyon	S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat	
	25 mg/L TiO ₂	S	3,20 $\pm$ 2,28	4,00 $\pm$ 2,45*	8,40 $\pm$ 2,97**	
		K	4,00 $\pm$ 3,16	4,80 $\pm$ 2,28*	7,60 $\pm$ 2,97**	
	50 mg/L TiO ₂	S	3,60 $\pm$ 2,61	3,60 $\pm$ 1,67*	7,40 $\pm$ 2,07***	
		K	4,00 $\pm$ 2,00*	5,20 $\pm$ 2,28**	8,40 $\pm$ 1,82***	
	100 mg/L TiO ₂	S	3,40 $\pm$ 1,52*	5,20 $\pm$ 3,35*	7,40 $\pm$ 1,14***	
		K	5,40 $\pm$ 2,30**	6,00 $\pm$ 1,58**	10,60 $\pm$ 1,67***	

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, TiO₂: Titanyum dioksit, EMS: Etil metan sülfonat, S: Solungaç, K: Kuyruk, BN: Binükleus



Şekil 7. *L. caeruleus* bireylerinde binükleus (BN) frekanslarının değişimi (%)

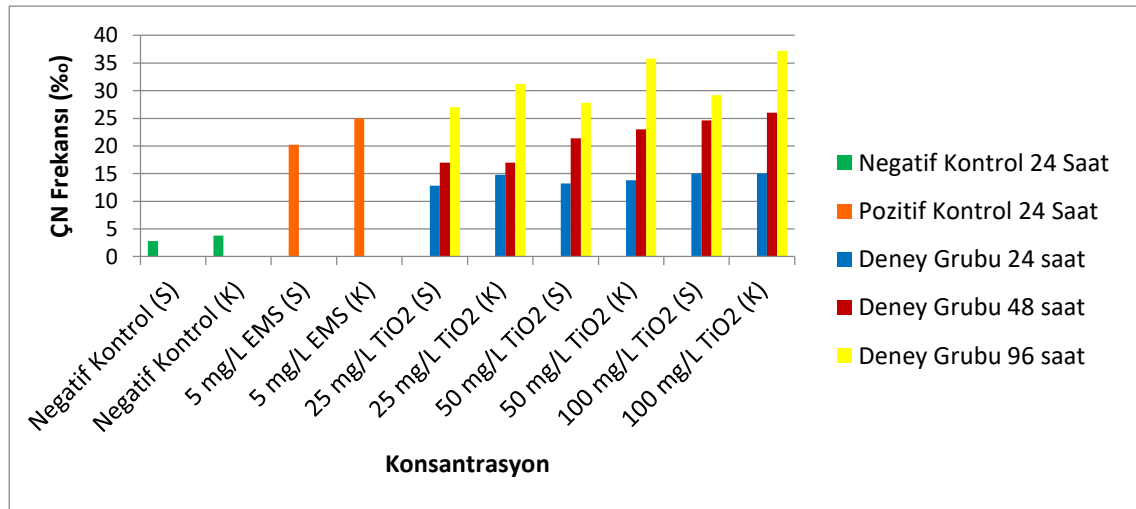
4.2.2. Çentikli Nükleus (ÇN) Frekanslarının Değerlendirmesi

Solungaç ve kuyruk örneklerinin ÇN frekansları, tüm konsantrasyon ve sürelerde negatif kontrole oranla anlamlı artış göstermiştir. Tüm deney gruplarında, en yüksek düzeyde anlamlı fark oluşmuştur ($P<0.001$). En düşük ÇN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saatte ($12,80\pm1,30$) solungaç örneklerinde, en yüksek ÇN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saatte ($37,20\pm1,64$) kuyruk örneklerinde ortaya çıkmıştır (Çizelge 4). *L. caeruleus*'un kan örneklerinde ÇN oluşumu Resim 10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4. *L. caeruleus* bireylerinde çentikli nükleus (ÇN) frekansları (‰, Ortalama $\pm$ S.H.)

Morfolojik Nükleus Düzensizliği	Konsantrasyon	S-K	Uygulama Süresi		
			24 Saat		
ÇN	Negatif Kontrol	S	2,80 $\pm$ 1,48		
		K	3,80 $\pm$ 1,79		
	5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	20,20 $\pm$ 3,11***		
		K	25,00 $\pm$ 1,58***		
	Konsantrasyon	S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat
	25 mg/L TiO ₂	S	12,80 $\pm$ 1,30***	17,00 $\pm$ 1,58***	27,00 $\pm$ 1,23***
		K	14,80 $\pm$ 2,95***	17,00 $\pm$ 0,71***	31,20 $\pm$ 2,49***
	50 mg/L TiO ₂	S	13,20 $\pm$ 0,84***	21,40 $\pm$ 1,14***	27,80 $\pm$ 1,30***
		K	13,80 $\pm$ 1,49***	23,00 $\pm$ 1,58***	35,80 $\pm$ 1,48***
	100 mg/L TiO ₂	S	15,00 $\pm$ 3,00***	24,60 $\pm$ 2,07***	29,20 $\pm$ 1,79***
		K	15,00 $\pm$ 1,00***	26,00 $\pm$ 2,45***	37,20 $\pm$ 1,64***

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, TiO₂: Titanyum dioksit, EMS: Etil metan sülfonat, S: Solungaç, K: Kuyruk, ÇN: Çentikli nükleus



Şekil 8. *L. caeruleus* bireylerinde çentikli nükleus (ÇN) frekanslarının değişimi (‰)

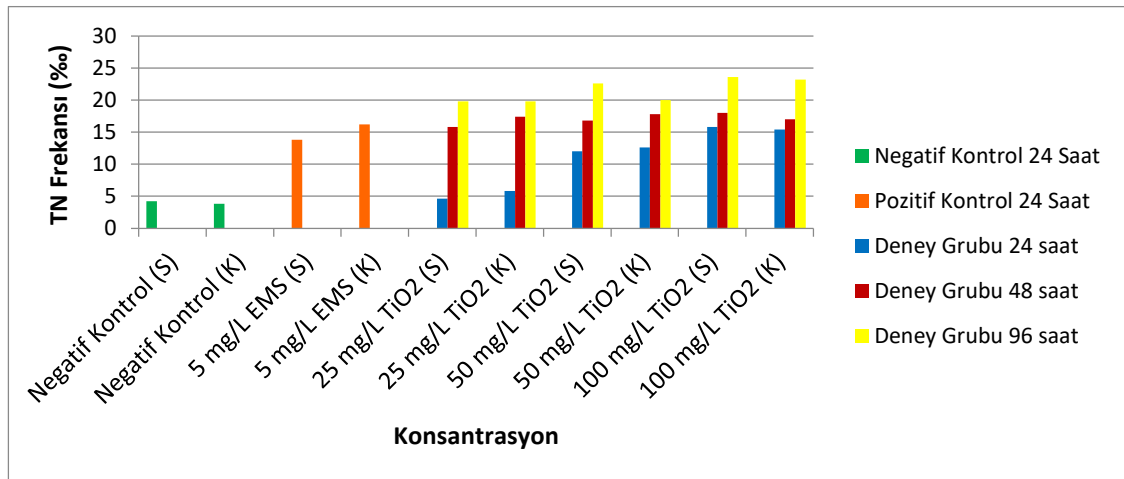
4.2.3. Tomurcuklu Nükleus (TN) Frekanslarının Değerlendirmesi

Solungaç ve kuyruk örneklerinin TN frekansları, 25 mg/L konsantrasyonda ve 24 saat hariç olmak üzere diğer tüm konsantrasyon ve sürelerde negatif kontrole oranla anlamlı artış göstermiştir. 50 mg/L konsantrasyonda ve 24 saatlik sürede solungaç örneklerinin TN frekansları ($P<0.01$), anlamlılık düzeyi bakımından diğer gruplardan ($P<0.001$) ayrılmaktadır. En düşük ve en yüksek TN frekansları sırasıyla 25 mg/L konsantrasyonda 24 saatte ($4,60\pm3,21$) ve 100 mg/L konsantrasyonda 96 saatte ($23,60\pm1,82$) solungaç örneklerinde ortaya çıkmıştır (Çizelge 5). *L. caeruleus*'un kan örneklerinde TN oluşumu Resim 10'da gösterilmiştir.

Çizelge 5. *L. caeruleus* bireylerinde tomurcuklu nükleus (TN) frekansları (‰, Ortalama $\pm$ S.H.)

Morfolojik Nükleus Düzensizliği	Konsantrasyon	S-K	Uygulama Süresi		
			24 Saat		
TN	Negatif Kontrol	S	4,20 $\pm$ 1,92		
		K	3,80 $\pm$ 1,48		
	5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	13,80 $\pm$ 1,79***		
		K	16,20 $\pm$ 1,92***		
	Konsantrasyon	S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat
	25 mg/L TiO ₂	S	4,60 $\pm$ 3,21	15,80 $\pm$ 0,84***	19,80 $\pm$ 2,17***
		K	5,80 $\pm$ 3,96	17,40 $\pm$ 2,30***	19,80 $\pm$ 1,92***
	50 mg/L TiO ₂	S	12,00 $\pm$ 4,53**	16,80 $\pm$ 1,30***	22,60 $\pm$ 1,14***
		K	12,60 $\pm$ 1,67***	17,80 $\pm$ 1,30***	20,00 $\pm$ 1,58***
	100 mg/L TiO ₂	S	15,80 $\pm$ 1,64***	18,00 $\pm$ 1,58***	23,60 $\pm$ 1,82***
		K	15,40 $\pm$ 1,67***	17,00 $\pm$ 1,87***	23,20 $\pm$ 1,48***

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, TiO₂: Titanyum dioksit, EMS: Etil metan sülfonat, S: Solungaç, K: Kuyruk, TN: Tomurcuklu nükleus



Şekil 9. *L. caeruleus* bireylerinde tomurcuklu nükleus (TN) frekanslarının değişimi (‰)

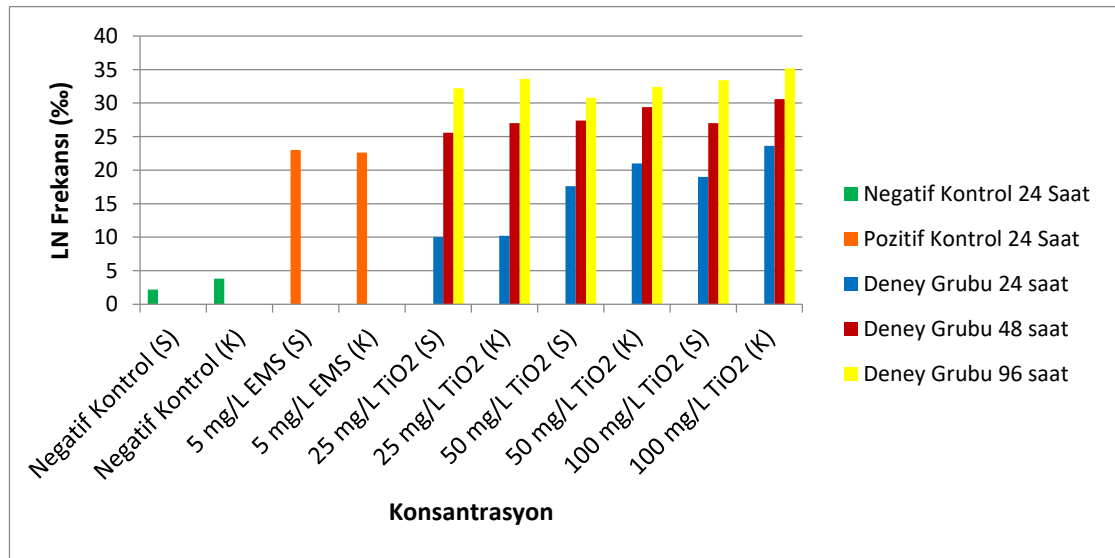
4.2.4. Loblu Nükleus (LN) Frekanslarının Değerlendirmesi

Negatif kontrole kıyasla deney gruplarının tamamında, solungaç ve kuyruk örneklerinin LN frekanslarında anlamlı artış görülmüştür. 25 mg/L konsantrasyonda ve 24 saatlik sürede solungaç ve kuyruk örneklerinin LN frekansları ($P<0.01$), anlamlılık düzeyi bakımından diğer gruplardan ($P<0.001$) ayrılmaktadır. En düşük LN frekansı 25 mg/L konsantrasyonda 24 saatte ($10,00\pm3,39$) solungaç örneklerinde, en yüksek LN frekansı 100 mg/L konsantrasyonda 96 saatte ($35,20\pm1,92$) kuyruk örneklerinde ortaya çıkmıştır (Çizelge 6). *L. caeruleus*'un kan örneklerinde LN oluşumu Resim 12'de gösterilmiştir.

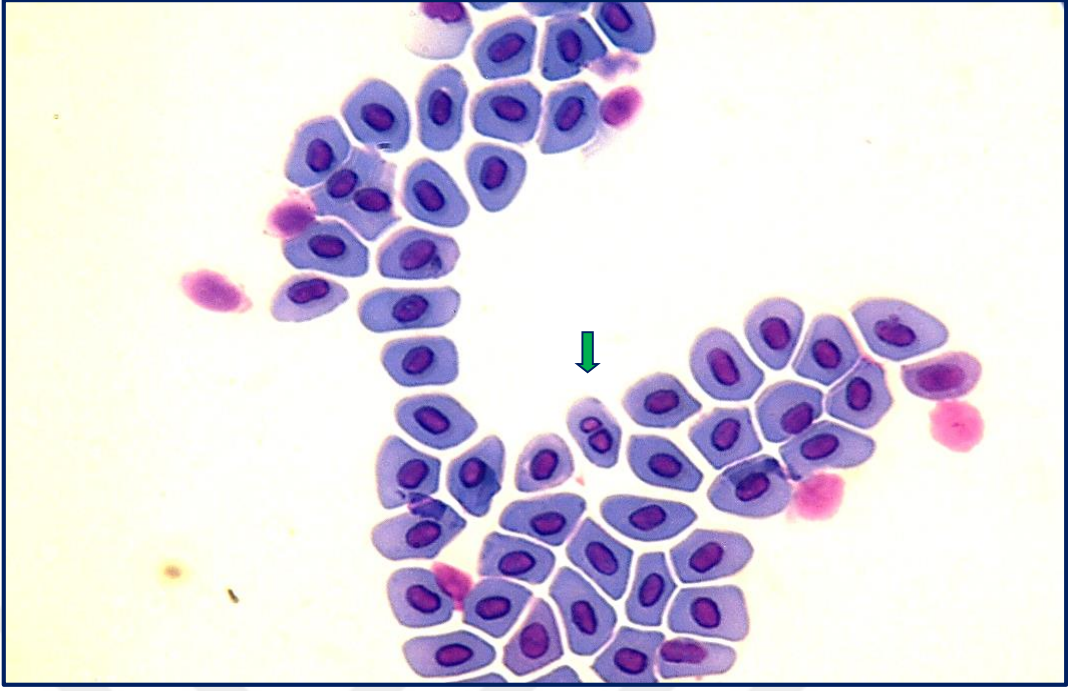
Çizelge 6. *L. caeruleus* bireylerinde loblu nükleus (LN) frekansları (%o, Ortalama $\pm$ S.H.)

Morfolojik Nükleus Düzensizliği	Konsantrasyon	S-K	Uygulama Süresi		
			24 Saat		
LN	Negatif Kontrol	S	2,20 $\pm$ 1,92		
		K	3,80 $\pm$ 2,17		
	5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	23,00 $\pm$ 2,92***		
		K	22,60 $\pm$ 1,52***		
	Konsantrasyon	S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat
	25 mg/L TiO ₂	S	10,00 $\pm$ 3,39**	25,60 $\pm$ 2,07***	32,20 $\pm$ 2,05***
		K	10,20 $\pm$ 3,49**	27,00 $\pm$ 1,58***	33,60 $\pm$ 1,52***
	50 mg/L TiO ₂	S	17,60 $\pm$ 4,28***	27,40 $\pm$ 2,61***	30,80 $\pm$ 1,30***
		K	21,00 $\pm$ 2,83***	29,40 $\pm$ 1,67***	32,40 $\pm$ 1,52***
	100 mg/L TiO ₂	S	19,00 $\pm$ 1,87***	27,00 $\pm$ 1,58***	33,40 $\pm$ 1,34***
		K	23,60 $\pm$ 1,52***	30,60 $\pm$ 2,07***	35,20 $\pm$ 1,92***

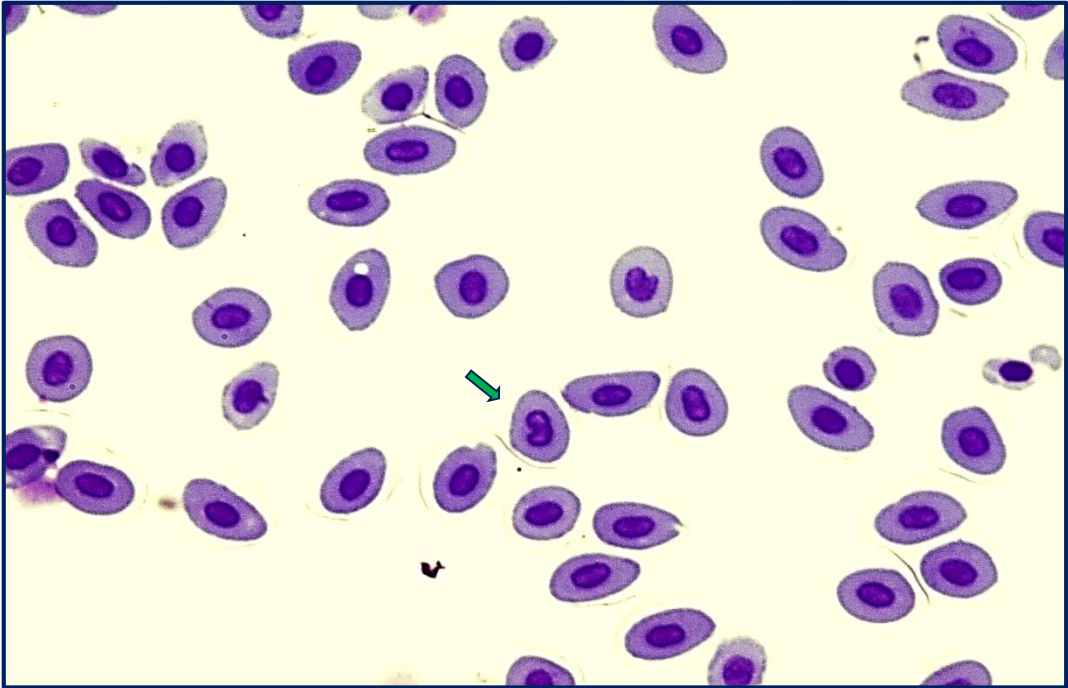
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, TiO₂: Titanyum dioksit, EMS: Etil metan sülfonat, S: Solungaç, K: Kuyruk, LN: Loblu nükleus



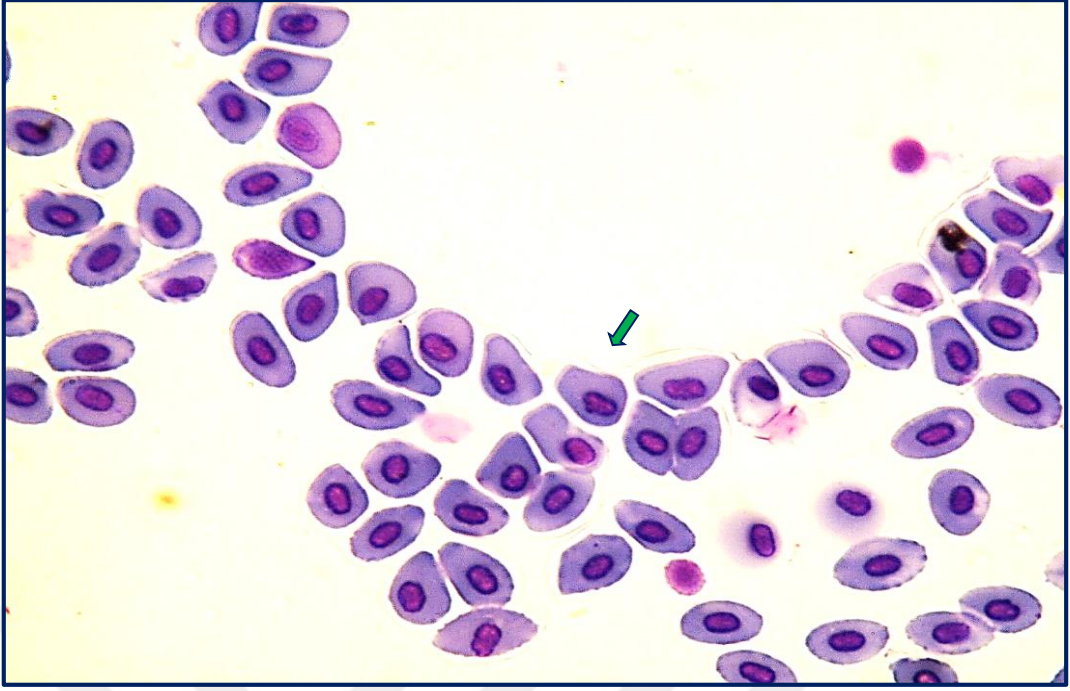
Şekil 10. *L. caeruleus* bireylerinde loblu nükleus (LN) frekanslarının değişimi (%)



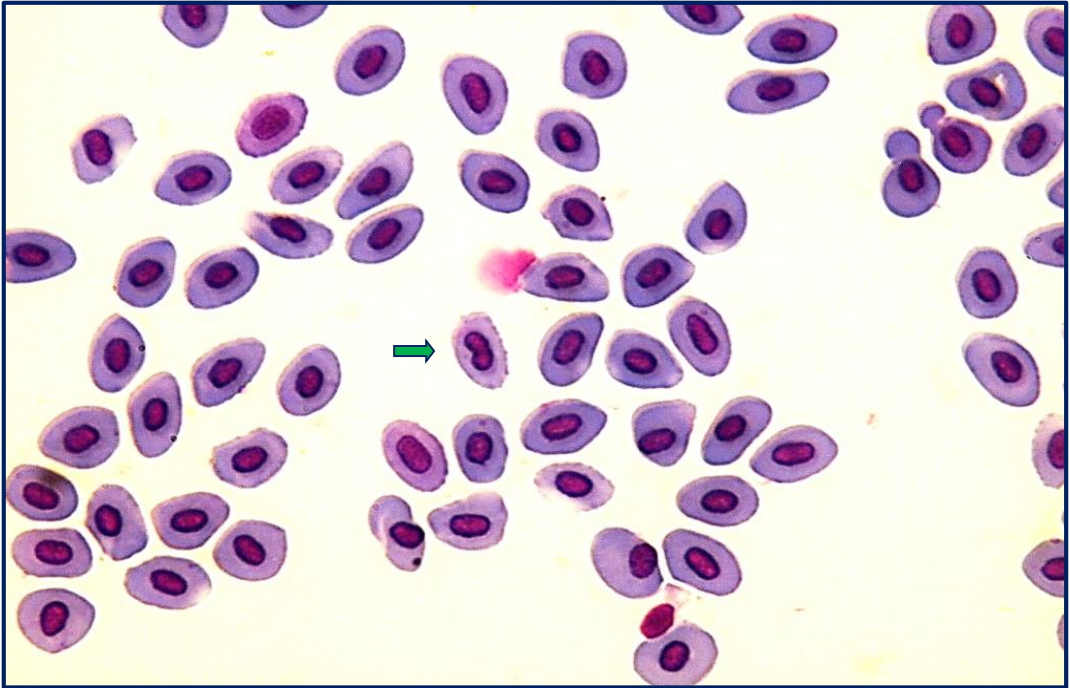
Resim 9. *L. caeruleus*'un kan örneklerinde binükleus (BN) oluşumu (40X; 50 mg/L, 24 s.)



Resim 10. *L. caeruleus*'un kan örneklerinde çentikli nükleus (ÇN) oluşumu (40X; 25 mg/L, 96 s.)



Resim 11. *L. caeruleus*'un kan örneklerinde tomurcuklu nükleus (TN) oluşumu (40X; 50 mg/L, 48 s.)



Resim 12. *L. caeruleus*'un kan örneklerinde loblu nükleus (LN) oluşumu (40X; 100 mg/L, 96 s.)

4.2.5. Solungaç ve Kuyruk Örneklerinin Morfolojik Nükleus Düzensizlik Frekanslarının Karşılaştırılması

Morfolojik nükleus düzensizlikleri analizi sonucuna göre; 25 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda solungaç örneklerinin BN frekansı ($8,40 \pm 2,97$), kuyruk örneklerinin BN frekansından ($7,60 \pm 2,97$) yüksektir. Bunun dışındaki tüm gruplarda kuyruk örneklerinin BN frekansı solungaç örneklerine kıyasla daha yüksektir.

25mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinin BN frekansları negatif kontrole oranla 48 saat sonunda anlamlı artış göstermiştir. Bu grupta solungaç ve kuyruk örneklerinin 48 saat ($P < 0.05$) ve 96 saat ($P < 0.01$) sonundaki anlamlılık düzeyi benzerlik göstermektedir.

50 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinin BN frekansları 48 saat sonunda anlamlı artış gösterirken ($P < 0.05$), kuyruk örneklerinin BN frekansı 24 saat sonunda anlamlı artış göstermiştir ($P < 0.05$). 50 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda solungaç ve kuyruk örneklerinin anlamlılık düzeyi benzerlik göstermektedir ($P < 0.01$).

100 mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinin BN frekansları, tüm konsantrasyon ve sürelerde negatif kontrole oranla anlamlı artış göstermiştir. Bununla beraber 24 saat ve 48 saatte kuyruk örneklerinin BN frekansları, solungaç örneklerine göre daha yüksek anlamlılık düzeyine sahipken, 96 saat sonunda benzerlik göstermektedir.

25 mg/L konsantrasyonda 24 saat sonunda solungaç ve kuyruk örneklerinin TN frekanslarında negatif kontrole göre anlamlı artış olmamıştır ($P > 0.05$). Bunun dışındaki tüm konsantrasyon ve sürelerde solungaç ve kuyruk örneklerinin ÇN, TN ve LN frekansları, negatif kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. 50 mg/L konsantrasyon ve 24 saat sonunda solungaç örneklerinin TN frekansı ile 25 mg/L konsantrasyon ve 24 saat sonunda solungaç ve kuyruk örneklerinin LN frekansı ($P < 0.01$), anlamlılık düzeyi bakımından diğer gruplardan ($P < 0.001$) ayrılmaktadır.

Morfolojik nükleus düzensizlik verileri genel olarak değerlendirildiğinde; deney gruplarının tamamında BN, ÇN, TN ve LN frekansları negatif kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Nadiren bazı gruplar dışında kuyruk örneklerinin BN, ÇN ve TN frekanslarının solungaç örneklerine göre yüksek olduğu, kuyruk örneklerinin yalnızca LN frekanslarının tüm gruplarda solungaç örneklerine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber yalnızca ÇN ve LN frekanslarındaki artışın tüm deney gruplarında negatif kontrole oranla

anlamli olduğu, N frekanslarının tüm gruplarda en yüksek anlamlılık düzeyine sahip olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$).

4.3. Genotoksik Hasarın Genel Değerlendirmesi

Negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu ve TiO_2 uygulanan deney gruplarındaki *L. caeruleus* bireylerinin solungaç ve kuyruk örneklerinin incelenmesinden elde edilen toplam genotoksik hasar verileri (MN+BN+N+TN+LN) analiz edilmiş, ortalama genotoksik hasar frekansları (%o, Ortalama $\pm$ S.H.) belirlenmiştir (izelge 7).

L. caeruleus bireylerinde toplam genotoksik hasar analizi sonucuna göre; pozitif kontrol grubu ve deney gruplarının tamamında solungaç ve kuyruk örneklerinin toplam genotoksik hasar frekansları negatif kontrole göre artış göstermiştir. Buna göre deney gruplarında en düşük toplam genotoksik hasar frekansı 24 saat sonunda 25 mg/L konsantrasyonda ($32,40\pm7,57$), en yüksek toplam genotoksik hasar frekansı 96 saat sonunda 100 mg/L konsantrasyonda ortaya çıkmıştır ($114,80\pm2,86$).

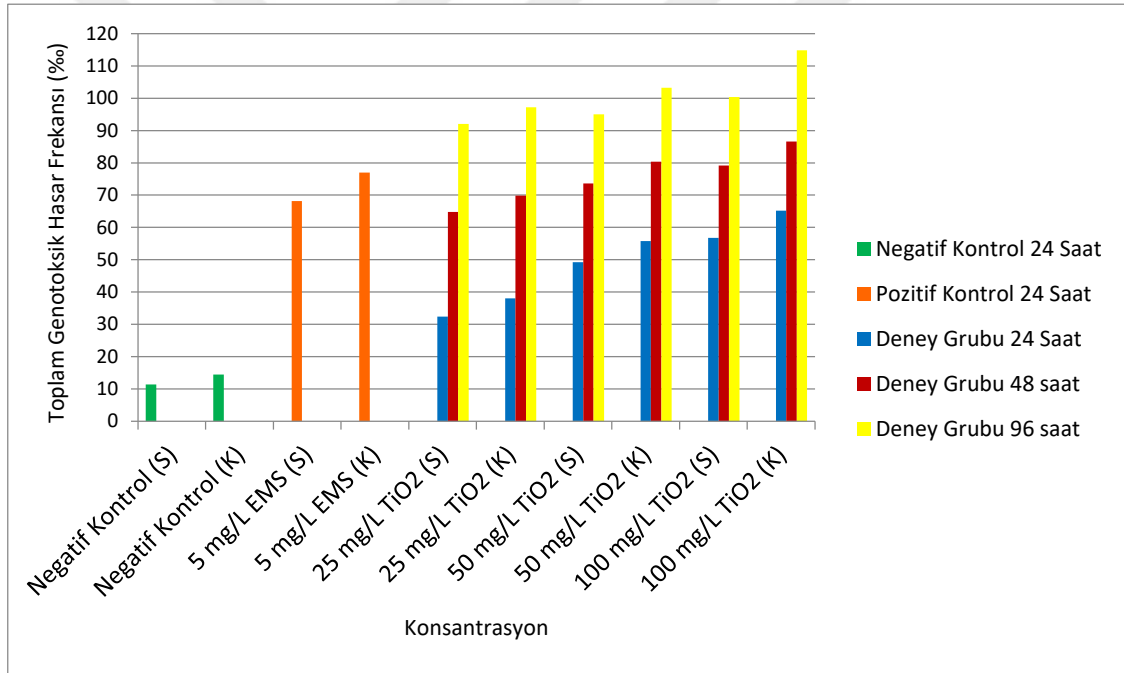
Solungaç ve kuyruk örneklerinin toplam genotoksik hasar frekansları karşılaştırıldığında; tüm deney gruplarında kuyruk örneklerinin toplam genotoksik hasar frekanslarının solungaç örneklerine göre yüksek olduğu görülmektedir. Bununla beraber solungaç ve kuyruk örneklerinin tamamında frekans artışlarının negatif kontrole göre anlamlı düzeyde gerçekleştiği, anlamlılık düzeyinin pozitif kontrol ve deney gruplarının tamamında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.001$).

Genel olarak TiO_2 ile muamele edilen deney gruplarında konsantrasyon-süre etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, uygulama sresindeki artışın toplam genotoksik hasar frekanslarında artışa yol açtığı görülmüştür (izelge 7).

Çizelge 7. *L. caeruleus* bireylerinde toplam genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması (%o, Ortalama±S.H.)

	Konsantrasyon	S-K	Uygulama Süresi		
			24 Saat		
Toplam Genotoksik Hasar (%o)	Negatif Kontrol	S	11,4±2,61		
		K	14,4±3,36		
	5 mg/L EMS (Pozitif Kontrol)	S	68,20±4,32***		
		K	77,00±3,81***		
	Konsantrasyon	S-K	24 Saat	48 Saat	96 Saat
	25 mg/L TiO ₂	S	32,40±7,57***	64,80±1,30***	92,00±2,55***
		K	38,00±7,45***	69,80±4,66***	97,20±5,72***
	50 mg/L TiO ₂	S	49,20±9,44***	73,60±4,04***	95,00±2,74***
		K	55,80±6,30***	80,40±4,04***	103,20±4,09***
	100 mg/L TiO ₂	S	56,80±5,12***	79,20±3,96***	100,40±2,41***
		K	65,20±5,36***	86,60±4,34***	114,80±2,86***

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, TiO₂: Titanyum dioksit, EMS: Etil metan sülfonat, S: Solungaç, K: Kuyruk, MN: Mikronükleus, BN: Binükleus, ÇN: Çentikli Nükleus, TN: Tomurcuklu Nükleus, LN: Loblu nükleus, **Toplam Genotoksik Hasar:** MN+BN+ÇN+TN+LN (Ortalama±S.H.)

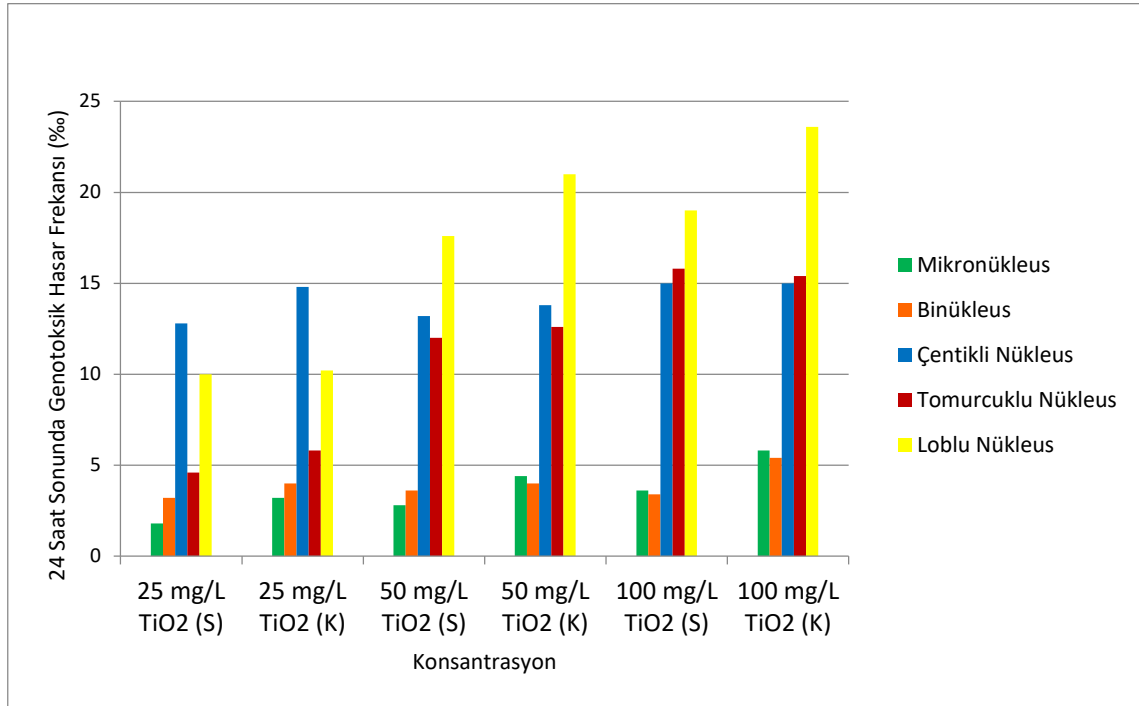


Şekil 11. *L. caeruleus* bireylerinde toplam genotoksik hasar frekanslarının değişimi (%o)

Toplam genotoksik hasar analizi sonucuna göre deney gruplarının solungaç ve kuyruk örneklerinde elde edilen MN frekansları ile BN, ÇN, TN ve LN frekanslarının (%o) uygulama sürelerine göre karşılaştırılması Şekil 12, 13 ve 14'te verilmiştir.

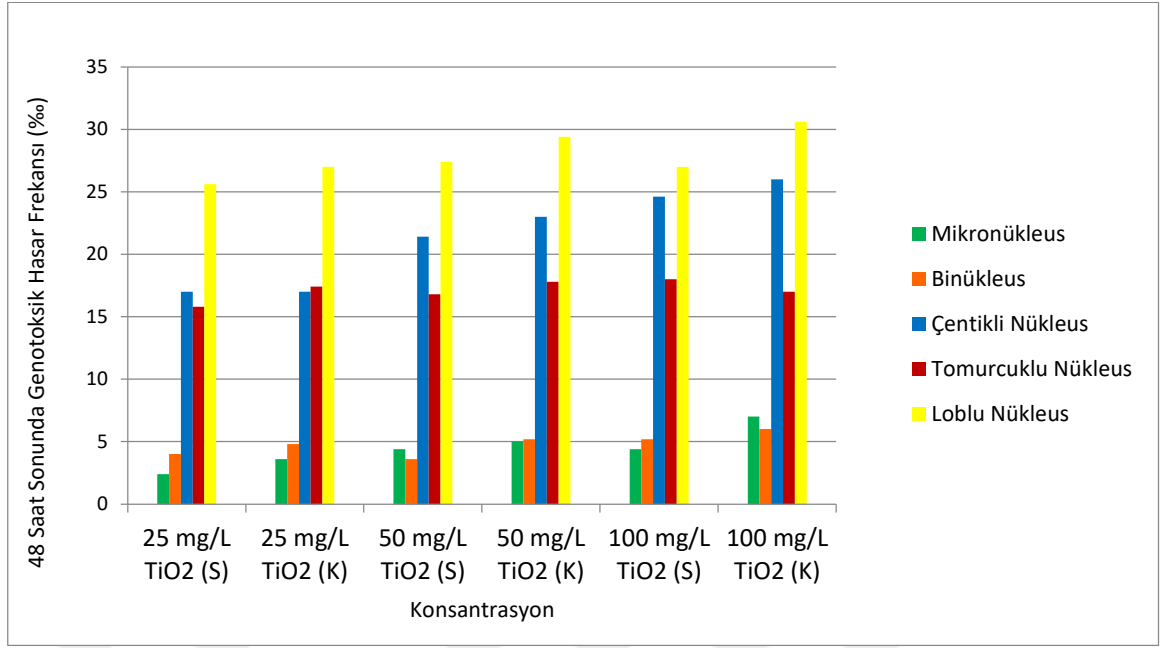
24 saatlik TiO₂ uygulamasından sonra 25 mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinde en düşük genotoksik hasar frekansının MN frekansı, en yüksek genotoksik hasar

frekansının ÇN frekansı olduğu; 50 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinde en düşük genotoksik hasar frekansının MN frekansı, en yüksek genotoksik hasar frekansının LN frekansı olduğu tespit edilmiştir. 50 mg/L konsantrasyonda kuyruk örneklerinde, 100 mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinde en düşük genotoksik hasar frekansının BN frekansı, en yüksek genotoksik hasar frekansının LN frekansı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12).



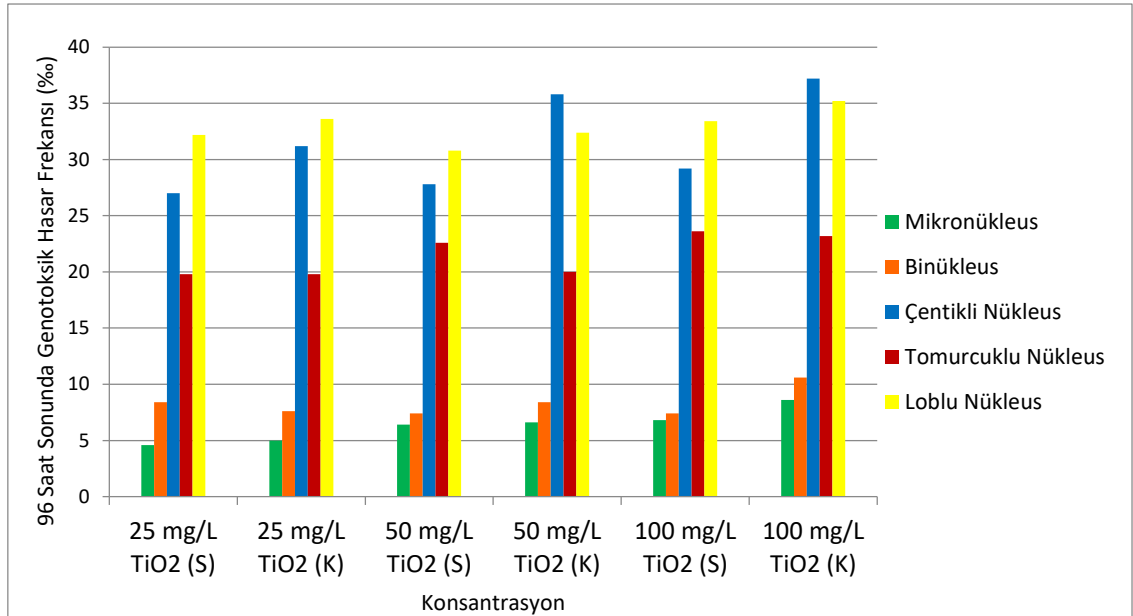
Şekil 12. 24 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması (%)

48 saatlik TiO₂ uygulamasından sonra 25 mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örneklerinin, 50 mg/L konsantrasyonda kuyruk örneklerinin ve 100 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinin en düşük genotoksik hasar frekansının MN frekansı olduğu; 50 mg/L konsantrasyonda solungaç ve 100 mg/L konsantrasyonda kuyruk örneklerinin en düşük genotoksik hasar frekansının BN frekansı olduğu tespit edilmiştir. Tüm gruplarda en yüksek genotoksik hasar frekansının LN frekansı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. 48 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması (%)

96 saatlik TiO_2 uygulamasından sonra tüm deney gruplarında solungaç ve kuyruk örneklerinde en düşük genotoksik hasar frekanslarının MN frekansı olduğu; 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda kuyruk örneklerinde ÇN frekansının, 25 mg/L konsantrasyonda solungaç ve kuyruk örnekleri ile 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda solungaç örneklerinde LN frekansının, en yüksek genotoksik hasar frekansına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. 96 saatlik uygulama sonunda oluşan genotoksik hasar frekanslarının karşılaştırılması (%)

5. TARTIŞMA

Nanoteknoloji alanında yapılan çalışmaların yoğunlaşmasıyla birlikte NP'lerin kullanım düzeyi artmakta ve ticarileşme potansiyeli gelişmektedir. NP'lerin yeni özelliklerinin keşfinden ve yeni uygulama alanları yaratılmasından dolayı nanoteknoloji “yeni bir endüstri devrimi” olarak da tanımlanmaktadır (Yakaboylu, 2011).

NP'ler; elektronik sanayi, tekstil sanayi, savunma sanayi ve kozmetik sektörü başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedir. Buna karşın, imalatına katıldıkları ürünlerle birlikte atık olarak çevreye salınmaları, NP'lerin olası olumsuz etkileri konusunda endişelerin artmasına neden olmaktadır (Asztemborska vd., 2018).

Yapay yollarla üretilerek çevreye salınan NP'ler doğrudan doğruya veya atmosferik birikim, yüzey akıntısı, atık şeklinde sucul ekosistemlere ulaşabilmektedir (Ateş ve Çelik Çakıroğulları, 2017). Bu durumun sonuçlarının araştırılması için son zamanlarda, endüstriyel amaçla üretilmiş metal ve metal oksit NP'lerinin özellikle balıklara, omurgasızlara ve zooplanktonlara toksik etkilerinin değerlendirildiği araştırmalar yapılmıştır. NP'lerin sağlık ve çevre üzerindeki muhtemel toksik potansiyelleri hakkında yapılan nitelikli araştırmaların sayısı artmasına rağmen henüz yeterli görülmemektedir. Bu nedenle, riskin boyutları hakkında farklı spekülasyonlar ortaya atılmaktadır (Di Virgilio vd., 2010).

Bu araştırmamızda; dünyada ve ülkemizde en çok kullanılan NP'lerden biri olan TiO_2 'in, ergin *L. caeruleus* bireyleri üzerindeki genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Genotoksik etki; 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L TiO_2 ile 24 saat, 48 saat ve 96 saat muamele edilen balıklarda, MN testi ile araştırılmıştır. TiO_2 ile muamele edilen ergin bireylerin solungaç ve kuyruk örneklerinde MN verileri ve morfolojik nükleus düzensizlik verileri (BN, ÇN, TN, LN) analiz edilmiş ve karşılaştırma yapılmıştır.

Hücrenin yaşamsal döngü süresi canlı türüne göre değişmekle birlikte, temel olarak G1, S, G2 ve M evresi olmak üzere 4 evrede gerçekleşmektedir. Bölünme yeteneğini yitiren hücrelerde ayrıca G0 evresi bulunmaktadır. G1, S ve G2 evresi hücre siklusu esnasında interfazda gerçekleşir. M evresi ise profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini kapsamaktadır. Bunun yanında, hücre siklusunda, fiziksel ve kimyasal ajanların sebep olabileceği muhtemel hasarların kontrol edildiği ve onarıldığı G1, G2 ve M kontrol noktaları bulunmaktadır. G1, G2 ve M kontrol noktalarında; kromozomlarda hasar olup olmadığı, DNA replikasyonunda

herhangi bir sorun olup olmadığı, iğ ipliklerinin kinetokorlara bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilir ve varsa G1, S, G2 ve M evrelerinde ortaya çıkan hasarlar onarılır. Hücre siklusunda oluşan kromozom kırıklarının, son kontrol noktası olan ve metafazda gerçekleşen M kontrol noktasında onarılamaması durumunda, anafazda asentrik kromozomlar veya kromozom fragmentleri, mikronükleus oluşumuna sebep olur.

Bu araştırmada kullandığımız TiO₂ NP'ü, deney gruplarının tamamında solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla artmasına sebep olmuştur. Bu artış, nadiren bazı gruplar dışında anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir. Buna göre; *L. caeruleus* bireylerine uygulanan TiO₂'in, solungaç ve kuyruk kan hücrelerinin bölünmesi esnasında kromozom hasarlarına yol açtığı, bu hasarların hücre siklusunun kontrol noktalarında tamir edilemediği, genel olarak TiO₂'in *L. caeruleus* bireylerinin kan hücreleri üzerinde genotoksik potansiyeli olduğu değerlendirilmiştir.

NP'lerin farklı hücre tiplerine etkilerinin incelendiği önceki araştırmalar genel olarak; bilinçli veya bilinçsiz şekilde NP'lere maruz kalmanın hassasiyetine işaret etmekte, NP'lerin biyolojik sistemlere yönelik ciddi düzeyde tehdit oluşturabileceğini ortaya koymaktadır (Ramsden vd., 2009). Bununla beraber toksisite çalışmalarının çoğunda tehdidin boyutunun, maruz kalınan NP konsantrasyonuna ve maruziyet süresine paralel olarak artış gösterebileceği vurgulanmaktadır (Gonzalez vd., 2011).

Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; deney gruplarında MN frekansları bakımından konsantrasyon-süre etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. Solungaç ve kuyruk örneklerinin her ikisinde de en düşük MN frekansı, en düşük konsantrasyon ve en kısa zaman periyodunda (25 mg/L; 24 saat) ortaya çıkarken; en yüksek MN frekansı, en yüksek konsantrasyon ve en uzun zaman periyodunda ortaya çıkmıştır (100 mg/L; 96 saat).

Ali vd. (2015), yaptıkları çalışmada 24 ve 96 saat süreyle TiO₂'in 28 µg/ml, 56 µg/ml ve 84 µg/ml konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları *Lymnea luteola* L.'nin (tatlı su salyangozu) kan hücrelerinde önemli ölçüde DNA hasarı belirlemişlerdir. TiO₂ konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça, hücrelerdeki DNA hasarında kademeli fakat doğrusal olmayan bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek DNA hasarının 96 saatte 84 µg/ml TiO₂ konsantrasyonunda gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Vidya ve Chitra (2018), *Oreochromis mossambicus*'u 24, 72, 96 saat ve 15, 30, 60 gün süreyle 16,4 mg/L TiO₂, 12 mg/L SiO₂, 4 mg/L Al₂O₃ ve 15 mg/L Fe₂O₃ ile muamele

etmişlerdir. TiO_2 ile muamele edilen balıklarda 24 saatlik süreden sonra MN ($3,5 \pm 0,67$) ve TN ($6,5 \pm 0,12$) oluşumunun, 15 günlük süreden sonra BN oluşumunun ($11 \pm 0,77$) uygulama süresine bağlı olarak anlamlı artış gösterdiğini belirlemişlerdir. TiO_2 uygulamasında en yüksek MN, BN ve TN frekanslarının en uzun uygulama süresi olan 60 günlük periyotta ortaya çıktığını bildirmişlerdir (MN: $55 \pm 0,35$; BN: $23,5 \pm 0,65$; TN: $32 \pm 0,27$). Ayrıca SiO_2 uygulamasında en yüksek BN ve TN frekanslarının 30 gün sonunda; SiO_2 uygulamasında en yüksek MN frekansı ile Al_2O_3 ve Fe_2O_3 uygulamasında en yüksek MN, BN ve TN frekanslarının, en uzun uygulama süresi olan 60 günlük periyotta ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Balıklarda solunum, solungaçlar aracılığıyla gerçekleşir. Solungaçlar, yutak bölgesinin her iki yanında, dışa doğru uzanan cep veya yarık şeklindeki yapıların içinde bulunur. Solungaçlar, gaz alışverişini sağlayarak vücudun ihtiyacı olan oksijeni kan hücrelerine iletir. Kan hücreleri dolaşım sistemi yoluyla, oksijeni vücudun diğer bölümlerine taşır. Dolaşım sonunda oluşan CO_2 , yine solungaçlardan dışarı atılır. Solungaçlar, su ile doğrudan ilişkilidir ve ortamdaki ağır metal ve diğer kirleticilerin hedef organıdır. Solungaç epitel hücreleri, canlının bulunduğu ortamdaki tuzluluk, sıcaklık, pH, yüksek konsantrasyonda amonyak ve ağır metaller gibi farklı ortam şartlarından etkilenirler. Suda bulunan ağır metaller eser miktarda olsalar dahi sucul organizmalar için sakıncalı maddeler olarak değerlendirilmektedir. Ağır metaller beslenme, solunum veya vücut yüzeyinden absorpsiyon yolu ile alınmakta ve dokularda birirmektedir. Bununla beraber balıklar ağır metalleri kalsiyum kanalları yoluyla da vücutlarına alabilmektedirler. Kadmiyum, çinko, mangan ve kurşun gibi ağır metallerin, balıkların vücuduna kalsiyum kanallarıyla alındığını ve dokularda biriktiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Baldisserotto vd., 2004).

Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; tüm deney gruplarında MN frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiğini, ayrıca tüm deney gruplarında kuyruk örneklerinin MN frekanslarının solungaç örneklerine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmamızda kullandığımız TiO_2 , ağır metallere benzer olarak, solungaçlarla alımın dışında absorpsiyon yoluyla veya kalsiyum kanallarıyla balıkların vücuduna alınmış ve dolaşım sistemine ulaşmış olabilir. Bu durum, kan hücrelerinin yalnızca solungaçtan alınan TiO_2 miktarından daha fazla TiO_2 'e maruz kalmasıyla ve tüm deney gruplarında MN frekanslarının negatif kontrol grubuna göre artmasıyla sonuçlanır. Ağır metal; “yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten büyük olan metaller” olarak ifade edilmektedir (Özbolat ve Tuli, 2016). Bu araştırmada kullandığımız TiO_2 'in molekül ağırlığı $79,87 \text{ g/mol}$ ve nanopartikül boyutu 25

nm'dir. TiO₂'in nano boyutlu bir materyal olması solunumla, absorpsiyonla ve kalsiyum kanallarıyla balıkların vücuduna alınma ve dolaşım sistemine ulaşma ihtimalini güçlendirmektedir. Bununla beraber tüm deney gruplarında kuyruk kan örneklerinin MN frekanslarının solungaç örneklerine göre yüksek olması; TiO₂'in solungaç kan hücrelerine erişmesinden sonra, bu hücrelerin dolaşım sistemi yolu ile kuyruğa ulaşana kadar TiO₂'e daha uzun süre maruz kalmasının bir sonucu olarak değerlendirilmektedir.

Ali vd. (2008), *Oreochromis niloticus* (Nil Tilapiyası), *Oreochromis aureus* (Mavi tilapia), *Tilapia zillii* (kırmızı karınlı tilapiya) ve *Clarias gariepinus* (Afrika keskin dişli yayın balığı) türü balıklara 24 saat süreyle 2, 5, 10, 40 mg/kg siklofosamid (C₇H₁₅Cl₂N₂O₂P) enjekte etmişler, uygulama süresinin sonunda solungaç ve böbrek kan örneklerinde MN oluşumlarını incelemişlerdir. Araştırma sonucunda; siklofosamid enjekte edilen balıkların tamamında böbrek kan örneklerindeki MN frekanslarının, solungaç örneklerindeki MN frekanslarından yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Dört balık türünde solungaç ve böbrek örneklerinin en yüksek MN frekansının, en yüksek doz olan 40 mg/kg'lık uygulamada ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Morfolojik nükleus düzensizlikleri ilk olarak Carrasco vd. (1990) tarafından *Cenyonemus lineatus* (White croaker) eritrositlerinde MN testi ile tanımlanmış ve genotoksik etkinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Morfolojik nükleus düzensizliklerinden çentikli nükleusun oluşum mekanizması ile ilgili kesin bir görüş bulunmamakla birlikte, loblu ve tomurcuklu nükleusun oluşum mekanizması ile ilgili bazı araştırma sonuçları bildirilmiştir (Könen, 2007).

Nükleusta tomurcuk ve lob oluşumuyla ilgili kabul edilen en geçerli raporlardan biri Shimizu vd. (1998) tarafından yapılan araştırma sonuçlarıdır. Shimizu vd. (1998), yaptıkları araştırmada; tomurcuk oluşumunun hücre siklusunun S fazında, amplifiye edilmiş DNA'nın nükleus zarına doğru itilmesi sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca nükleusun, nükleus alanı ile orantısız şekilde fazlalık oluşturan DNA miktarını tanıma yeteneğine sahip olabileceğini, bu sebeple nükleusun fazla DNA'yı dışarı atma eğilimi gösterdiğini, tomurcuk oluşma sebebinin bu duruma bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Hücre döngüsünün ilerleyen sürecinde tomurcuğun nükleustan dışarı atılması sonucunda, mikronükleus oluştuğunu bildirmişlerdir (Shimizu vd., 1998). Buna göre tomurcuklu nükleus oluşumu, hücre bölünmesi

esnasında gen amplifikasyonu veya değişen gen miktarının göstergesi olarak da değerlendirilmektedir (Börçek Kasurka, 2019).

Carrasco vd. (1990), lob ve tomurcuk oluşumu arasındaki farkın, yalnızca içerdikleri DNA miktarına bağlı olarak büyüklük farkı olduğunu, mikroskopik incelemede tomurcuklu nükleusun loblu nükleusa göre daha belirgin ve ayrıntılı bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, morfolojik nükleus düzensizlikleri analizi sonucuna göre tüm deney gruplarında BN, ÇN, TN ve LN frekanslarının negatif kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. ÇN ve LN frekanslarının tüm deney gruplarında, BN ve TN frekanslarının nadiren bazı gruplar dışında negatif kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarımız TiO₂'in, morfolojik nükleus düzensizliklerinin oluşumunda genotoksik potansiyelinin olduğunu ortaya koymaktadır.

Alimba vd. (2019), *Clarias gariepinus* (Afrika keskin dişli yayın balığı) ile yaptıkları çalışmada; balıkları 14 gün boyunca %2,18, %4,35, %8,71 ve %17,41'lik konsantrasyonda arsenik (As), kadmiyum (Cd), krom (Cr), kurşun (Pb), bakır (Cu), demir (Fe) ve mangan (Mn) gibi kimyasalları içeren ilaç endüstrisi atık sularına maruz bırakmışlardır. 7 günlük maruziyetten sonra MN sayısında %4,35, %8,71 ve %17,41'lik konsantrasyonlarda, BN sayısında %8,71 ve %17,41'lik konsantrasyonlarda, TN sayısında ise tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark tespit etmişlerdir. 14 günlük maruziyetten sonra MN ve TN sayısında tüm konsantrasyonlarda, BN sayısında ise %4,35, %8,71 ve %17,41'lik konsantrasyonlarda anlamlı fark tespit etmişlerdir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, NP'lerin artan bir potansiyelinin olduğu bilinmektedir. Üreticiler, ürünlerinin büyüme ve üreme etkinliğini artırmak, su arıtımında yaşanan güçlükleri ortadan kaldırmak amacıyla NP'leri kullanmaktadırlar. Bazı üreticiler bu NP'leri balıkların yemlerine, bazıları ise yaşam ortamlarına veya su kültür tesislerine doğrudan ekleyerek kullanmaktadırlar. Üreticiler, kısa süreli maruziyetin herhangi bir sakıncasının olmayacağı düşüncesiyle NP'lerin potansiyel etkilerini göz ardı etmektedir (Berik, 2018). Oysaki birçok hayvan deneyinde elde edilen sonuçlar, NP'lerin akut maruziyetlerde bile toksik potansiyellerinin olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada kullanılan TiO₂, balıklara 24, 48 ve 96 saat süreyle 25 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L konsantrasyonda uygulanmıştır. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda bu uygulama süreleri, akut belirtilerin gözlenebileceği süreler

olarak değerlendirilmektedir. Araştırmamızda, tüm uygulama sürelerinde ve konsantrasyonlarda MN, BN, ÇN, TN ve LN frekansları, negatif kontrol grubuna göre artış göstermiştir.

Zhu vd. (2010), *Daphnia magna*'da (su piresi) 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonlarda TiO₂ birikimini analiz ettikleri akut (72 saat) ve kronik (21 gün) ekotoksisite çalışmalarında; 48 saat muameleden sonra 50 mg/L ve 100 mg/L'lik yüksek konsantrasyonlarda mortalite gözlendiğini fakat önemli düzeyde olmadığını, 72 saat sonra 0,1 mg/L'lik düşük konsantrasyonda bile %13 oranında mortalite gözlendiğini bildirmişlerdir. Öte yandan, 21 günden sonra kronik maruziyet sebebiyle *D. magna*'da şiddetli büyüme geriliği, üreme kusurları ve mortalite gözlemlenmiştir. Genel bir değerlendirmeye sucul organizmaların TiO₂'e maruz kalmasının hem bireylerde hem de populasyon düzeyinde büyüme geriliğine neden olabileceğini, bu durumun sucul ekosistemler için risk oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Vidya ve Chitra (2017), *Oreochromis mossambicus*'u 96 saat süreyle 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 mg/L TiO₂'e (11,4 nm), 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 mg/L Al₂O₃'e (16,7 nm) ve 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ve 175 mg/L SiO₂'e (1 nm) maruz bırakarak, nanopartiküllerin akut toksisitesini değerlendirmişlerdir. TiO₂'e maruz kalan balıklarda 125, 150, 175 ve 200 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda sırasıyla %20, %40, %50 ve %80 mortalite gözlemlenmiştir. 225 mg/L konsantrasyonda ise 24 saatten sonra mortalite belirlemiştir. Al₂O₃'e maruz kalan balıklarda 96 saat sonunda 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarda mortalite gözlenmediğini, 30, 40 ve 50 mg/L konsantrasyonlarda sırasıyla %20, %50 ve %80 mortalite gözlendiğini belirlemiştir. SiO₂'e maruz kalan balıklarda 100 ve 125 mg/L konsantrasyonlarda 96 saat sonunda %40 ve %50, 150 mg/L konsantrasyonda 96 saat sonunda ve 175 mg/L konsantrasyonda 48 saat sonunda %100 mortalite gözlemlenmiştir. Probit analizi sonucunda ortalama mortalite konsantrasyonlarını; Al₂O₃ için 40 mg/L, SiO₂ için 120 mg/L ve TiO₂ için 164 mg/L olarak tespit etmişlerdir.

Sucul ekosistemlerde balıklar, besin zincirinin en üstünde bulunmakta ve kirli sulardaki toksik iz elementleri biriktirmektedirler. Balıkların, bulundukları ortamda çevresel kirleticilere maruz kalması sonucu ya doğrudan ya da genellikle hücresel stresin uyarılmasıyla genotoksik hasar meydana gelir (Kontaş ve Bostancı, 2020). NP'lerin ve diğer kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında balıklar yoğun olarak kullanılmaktadır (Könen Adıgüzel

ve Çavaş, 2017). Çünkü toksik maddelere gösterdikleri tepki, genellikle yüksek omurgalıların gösterdiği tepkilerle benzerdir (Ali vd., 2008). Bunun yanında balık toksisite testlerinde uygulanması gereken protokoller OECD kılavuzlarında belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kimyasalın konsantrasyonu, kimyasal uygulama süresi, hayvan barındırma ve besleme koşulları, hayvan sayısı, dişi/erkek oranı gibi araştırma kriterleri, OECD'nin TG 474 ve 203 numaralı kılavuzlarında açıklanan ve önceki çalışmalarda tavsiye edilen bilgilere uygun olarak belirlenmiştir.

MN testi; hızlı ve güvenilir sonuç vermesi, ekonomik olması gibi özellikleri sebebiyle genotoksisite çalışmalarında en çok tercih edilen testlerden biridir (Taşçı ve Tok, 2018). Çalışmamızda, TiO₂ NP'ünün genotoksik etkileri MN testi ile araştırılmış, MN oluşumuyla birlikte morfolojik nükleus düzensizlikleri de değerlendirilmiştir. MN testi; kromozom hasarlarına sebep olabilecek fiziksel ve kimyasal etkenlerin karsinojenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde, ilaçların toksik etkilerinin ve güvenilirliğinin araştırılmasında, kanserden korunmada ve kanserin takip edilmesinde oldukça yaygın kullanılan bir testtir. Bununla beraber NP'ler dışındaki kimyasalların genotoksik etkilerinin MN testi ile araştırıldığı çalışmalarda önemli sonuçlar rapor edilmiştir.

Talapatra vd. (2014), *Heteropneustes fossilis* (Asya yayın balığı veya fosil kedi balığı) bireylerini 5, 10 ve 30 mg/L Zn içeren çözeltiye maruz bırakarak 24, 48, 72 ve 96 saat sonunda MN oluşumlarını incelemişlerdir. Tüm konsantrasyonlarda kontrol gruplarına göre MN frekanslarında anlamlı artışlar olduğunu, en yüksek anlamlı artışın 30 mg/L konsantrasyonda 72 ve 96 saat sonunda gerçekleştiğini bildirmişlerdir ($p < 0.001$).

Aslantürk ve Çelik (2017), Aydın sınırları içerisinde 5 kuaför salonunda en az 2 yıldır çalışan ve saç bakım ürünlerindeki kimyasal maddelere maruz kalan 10 erkek ve 10 kadın birey ile kuaför salonlarında çalışmayan 10 erkek ve 10 kadın bireyin ağız içi yanak epitel (bukkal) hücrelerinde MN frekanslarını araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre MN frekansının; kontrol grubu kadınlarında %2,14, deney grubu kadınlarında %24,37, kontrol grubu erkeklerinde %2,05 ve deney grubu erkeklerinde %31,95 olduğunu, kadın ve erkek bireylerdeki MN frekansı artışının anlamlı düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. Buna göre deney grubundaki kadın ve erkeklerin MN frekansları bakımından genotoksik risk taşıdıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca TN frekanslarının; kontrol grubu kadınlarında %0,19, deney grubu kadınlarında %0,54, kontrol grubu erkeklerinde %0 ve deney grubu erkeklerinde %0,30

olduğunu belirlemişlerdir. Yine BN frekanslarının; kontrol grubu kadınlarında %0,22 iken deney grubu kadınlarında %0,34, kontrol grubu erkeklerinde %0,10 iken deney grubu erkeklerinde %1,82 olduğunu belirlemişlerdir. Deney grubundaki kadın ve erkeklerin TN frekanslarının kontrol grubu kadın ve erkeklerine göre anlamlı düzeyde arttığını, BN frekanslarının ise yalnızca erkek bireylerde anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, yaptıkları bazı çalışmalarda TiO_2 'in diğer fiziksel veya kimyasal ajanlarla etkileşiminin farklı genotoksik ve sitotoksik sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Bu araştırmaların birçoğunda, düşük konsantrasyonlarda bile tek başına toksik olmayan veya çok az hasara sebep olan TiO_2 'in, fiziksel ve kimyasal ajanlarla birlikte maruz kalma sonucunda potansiyel toksik etkiler gösterebileceği bildirilmiştir. Buna karşın, TiO_2 'in tek başına veya diğer kimyasallarla birlikte uygulamasının birden fazla teknikle araştırıldığı bazı çalışmalarda, uygulanan test tekniğine bağlı olarak genotoksik hasar türlerinin farklı düzeylerde ortaya çıkabileceği rapor edilmiştir.

24 saat süreyle 0,1 ile 1000 $\mu g/mL$ arasında değişen konsantrasyonlarda TiO_2 'in, 2 saat süreyle UV (0,5-2,0 kJm) varlığında *Carassius auratus* (Japon balığı) deri hücrelerinde potansiyel sitotoksik ve gonotoksik etkileri araştırılmıştır. *In vivo* çalışmanın sonucunda; TiO_2 'in tek başına düşük düzeyde DNA hasarına sebep olduğu, birlikte maruz kalma sonucunda 1 $\mu g/mL$, 10 $\mu g/mL$ ve 100 $\mu g/mL$ dozların DNA hasarında daha fazla artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Reeves vd., 2008).

Nigro vd. (2015) *Dicentrarchus labrax*'a (Avrupa levreği) 7 gün boyunca 1 mg/L TiO_2 'i tek başına ve 0,1 mg/L $CdCl_2$ ile birlikte uygulamışlardır. Comet testi sonucunda; TiO_2 'in tek başına uygulanmasında DNA hasarının (%40 kuyruk DNA) kontrol grubu değerlerine (%39 kuyruk DNA) yakın olduğunu ve bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. $CdCl_2$ 'ün tek başına %47 oranında, TiO_2 ile birlikte maruz kalma sonucunda %46 oranında DNA hasarına sebep olduğunu, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen TiO_2 'in DNA hasar oranına herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bunun yanında MN testi sonucunda; TiO_2 'in tek başına uygulamasında MN oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, tek başına $CdCl_2$ uygulaması ve birlikte uygulama sonucunda MN oranının kontrol grubu değerlerine yakın olduğunu, istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemlemişlerdir (Kontrol Grubu: %1,2 MN; TiO_2 : %17 MN; $CdCl_2$: %1 MN; TiO_2+CdCl_2 : %1 MN).

Balıklar “poikilotermik” yani “soğukkanlı” canlılardır. Balıkların vücut ısıları, içinde yaşadıkları suyun sıcaklığıyla aynıdır ve ortamın sıcaklık değişiminden doğrudan etkilenirler. Balıkların biyokimyasal fonksiyonları ortamın sıcaklığına bağlıdır. Türe ve türün habitatına bağlı olarak değişmekle birlikte genelde ortam sıcaklığında oluşacak her 10°C’lik artış, biyokimyasal fonksiyonların oranını iki kat artırmaktadır. Dolayısıyla oksijen tüketimi, sıcaklık artışına bağlı olarak artmakta ve tüketim miktarı belirli bir maksimum sıcaklık aralığında letal seviyeye ulaşmaktadır (Dikel, 2009). Bu araştırmada kullanılan *L. caeruleus* bireyleri, türün özelliklerine uygun olarak 23.0 °C’de (± 2.0), 14/10 saat aydınlık/karanlık rejimine tabi tutulmuş ve 12 saatte bir kez ticari yemle beslenmiştir. Periyodik olarak sağlık gözlemleri yapılmış ve deneyin sonuçlarını etkileyecek herhangi bir anormallik yaşanmadığı gözlenmiştir. Araştırmalar, balıkların yaşam ortamlarındaki kimyasal faktörlerin yanı sıra sıcaklık başta olmak üzere fiziki koşullardaki aşırılığın, hasar düzeyini artırabileceğini ortaya koymaktadır.

Çavaş ve Ergene Gözükara (2005); Mersin Limanı, Karaduvar Limanı ve Erdemli Limanındaki polisiklik hidrokarbon, krom, soda, gübre ve petrol gibi kirleticilerin *Mugil cephalus* (gri kefal) üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla araştırma yapmışlardır. Ekim, Şubat, Nisan ve Temmuz (2002-2003) aylarında topladıkları 120 adet *M. cephalus*’un kaudal damarlarından ve solungaçlarından aldıkları örnekleri incelemeleri sonucunda; solungaç hücrelerindeki MN frekanslarının, kaudal damardan alınan örneklerdeki MN frekanslarından önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Lokasyonların karşılaştırılmasında; Karaduvar ve Mersin Limanındaki balıklardan alınan örneklerin MN frekanslarının, Erdemli Limanındaki balıklardan alınan örneklere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Mevsimsel değişim analizlerinde; MN frekanslarının kış aylarına oranla yaz aylarında daha yüksek olduğunu, mevsimsel ve bölgesel MN farklılıklarının, incelenen her iki örnek için benzer olduğunu belirlemişlerdir.

Kontaş ve Bostancı (2020); Ordu Kıranyağmur lokasyonunda kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), arsenik (As), alüminyum (Al), nikel (Ni), krom (Cr), demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu), manganez (Mn), kobalt (Co) elementlerinin suda, sedimentlerde ve *Vimba vimba* (Eğrez balığı) bireylerinin kas, solungaç ve karaciğer dokularındaki yoğunluğunu mevsimsel olarak belirlemişler, genotoksik potansiyellerini değerlendirmişlerdir. MN testi sonucuna göre; eritrositlerdeki MN frekansını yaz, kış, sonbahar ve ilkbahar mevsimlerinde sırasıyla %5,20, %1,80 %1,40 ve %1,10 olarak belirlemişlerdir. Yaz mevsiminde ortaya çıkan MN frekansının diğer mevsimlere oranla belirgin şekilde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Comet testi

sonuçlarına göre; eritrositlerdeki DNA hasarına bağlı olarak oluşan kuyruk boyu değerlerinin yaz, ilkbahar, sonbahar ve kış mevsimlerinde sırasıyla 26,32 µm, 25,12 µm, 22,16 µm ve 17,78 µm olduğunu, en yüksek DNA hasarının yaz aylarında görüldüğünü, kış mevsiminde ortaya çıkan DNA hasarının diğer mevsimlere göre daha düşük seviyede olduğunu bildirmişlerdir.

Sanayide, endüstride, tıpta, gıda sektöründe yoğun ve çok çeşitli kullanım alanı bulunan TiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, ZnO, CuO, SiO₂, aynı zamanda deneysel çalışmalarda en çok araştırılan NP'lerdir. Bu NP'lerin histopatolojik, teratojenik, genotoksik ve benzeri potansiyellerinin araştırılmasında çoğunlukla balıklar, ratlar, fareler, nematodlar, çekirgeler, deniz kabukluları kullanılmaktadır. Bununla beraber *Allium cepa*, *Vicia faba* gibi bazı bitkiler, kolay elde edilmesi ve kromozomlarının mikroskop altında rahatlıkla gözlenebilmesi sebebiyle genotoksisite çalışmalarında yoğun olarak tercih edilmektedir.

Atacı ve Türkoğlu (2020), 25, 50, 100 µg/ml'lik dozlar halinde TiO₂, SiO₂, ZnO, CuO ve Al₂O₃ NP'lerini *Allium cepa* ve *Caenorhabditis elegans* modellerine uygulayarak *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indeks ve kromozomlar üzerine etkilerini, *C. elegans*'da yaşam süresi, yumurta verimi ve fiziksel büyüme üzerine etkilerini araştırmışlardır. *A. cepa*'ya uygulanan TiO₂, SiO₂, ZnO, CuO ve Al₂O₃'in tüm dozlarında 12 ve 24 saatlik sürelerde, doz ve uygulama süresindeki artışla birlikte kontrol grubuna kıyasla mitotik indeksin azaldığını, kromozom anormallik oranının arttığını belirlemişlerdir. İnceleme sonucuna göre en çok gözlenen anormalliğin BN olduğunu, bunu multinükleus veya C-mitoz'un takip ettiğini saptamışlardır. *C. elegans* nematodunun yaşam süresi incelemesi sonucunda; kontrol grubunda 17 günde tamamlanan yaşam süresinin, NP'lerin etkisiyle 100 µg/ml'lik dozda en düşük seviyeye indiğini, bu grupta yaşam süresini TiO₂'in 13 günde, SiO₂'in 12 günde, ZnO ve Al₂O₃'in 7 günde, CuO'nun 6 günde sona erdirdiğini gözlemlemişlerdir. Genel olarak doz artışıyla birlikte yaşam süresinin azaldığını tespit etmişlerdir. Yumurta verimi incelemesi sonucunda kontrol grubundaki yumurtaların %98,31'inden yavru çıktığını, NP uygulanan gruplarda yumurta verimliliğini TiO₂'in %89,69'a, SiO₂'in %84,43'e, ZnO'nun %93,87'ye, CuO'nun %85,27'ye ve Al₂O₃'in %88,34'e gerilettiğini gözlemlemişlerdir. Fiziksel büyüme değerlerinin kontrol grubunda ortalama 4,99 mm düzeyindeyken, NP uygulanan gruplarda TiO₂'in 2,38 mm, SiO₂'in 2,56 mm, ZnO'nun 1,92 mm, CuO'nun 2,96 mm ve Al₂O₃'in 2,63 mm'ye kadar gerilemeye sebep olduğunu, doz artışının genel olarak fiziksel büyümeyi olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir.

Bazı çalışmalarda TiO₂'in, alg büyümesini ve toplam klorofil varlığını azalttığı açıklanmıştır. TiO₂'in alglere düşük toksisitesini gösteren çalışmalar da yapılmıştır. TiO₂'in algler üzerindeki toksisite mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir. TiO₂, UV ve güneş ışığı altında reaktif oksijen türleri (ROS) ve hidroksil radikalleri (OH) üretebilir. ROS güçlü bir antioksidandır, bu nedenle hücre zarını parçalayabilir. Oksidatif strese sebep olarak lipid peroksidasyonuna ve membran deformasyonunun artmasına yol açabilir. Böylece hücre mortalitesine sebep olur (Özkaleli ve Erdem, 2018).

Bu araştırmada elde ettiğimiz bulguların aksine, nadiren olmakla birlikte TiO₂'in herhangi bir toksik potansiyelinin gözlenmediğini, uygulama süresi veya konsantrasyon artışının farklı etkilere sebep olabileceğini ortaya koyan araştırma sonuçları da rapor edilmiştir. Boyle vd. (2013) *Oncorhynchus mykiss*'e (gökkuşağı alabalığı) 24 ve 96 saat süreyle 50 µg TiO₂ enjekte ederek böbrek, dalak, karaciğer, kalp, beyin, kas, solungaç ve bağırsaklardaki birikimini araştırmışlardır. TiO₂'in ölçülebilen toplam miktarının %94'ünün böbrekte ve çok az miktarının dalakta biriktiğini, buna rağmen dalak, böbrek veya diğer dokularda herhangi bir toksik etki gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Clemente vd. (2013), *Piaractus mesopotamicus* bireylerini 96 saat boyunca 1, 10 ve 100 mg/L TiO₂ konsantrasyonlarına maruz bırakmış ve en fazla MN oluşumunun 10 mg/L konsantrasyona maruz kalmış bireylerde ortaya çıktığını tespit etmişlerdir.

Bir başka araştırmada Nagamachi vd. (2014), *Oreochromis niloticus* (Nil Tilapiyası) bireylerini 72 saat süreyle 0,06 mg/L, 0,125 mg/L, 0,187 mg/L, 0,25 mg/L, 0,3125 mg/L ve 0,375 mg/L konsantrasyonlarda rotenona maruz bırakmışlardır. Araştırma sonucunda 0,06 mg/L, 0,125 mg/L, 0,187 mg/L ve 0,25 mg/L'lik konsantrasyonlarda MN frekanslarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını, buna karşın 0,3125 mg/L ve 0,375 mg/L'lik yüksek konsantrasyonlarda anlamlı fark oluşmadığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte MN oluşumunun hücre bölünmesi sırasında gerçekleştiğini ve hücre döngüsü tamamlandığında gözlenebileceğini, yüksek konsantrasyonlardaki rotenonun hücre bölünmesini engellemiş olabileceğini, bu sebeple yüksek konsantrasyonlarda MN gözlenememiş olabileceğini bildirmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TiO₂ NP'nün, ergin *L. caeruleus* bireyleri üzerindeki genotoksik etkilerini MN testi ile araştırdığımız çalışmamızda MN frekansı analizi sonucunda; tüm deney gruplarında MN frekanslarının negatif kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği fakat bu artışın tüm gruplarda anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Kuyruk örneklerinin MN frekanslarının, solungaç örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, deney gruplarında MN frekansları bakımından konsantrasyon-süre etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, uygulama süresindeki artışın MN frekanslarında artışa yol açtığı tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulama ve 100 mg/L konsantrasyon ile 96 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda solungaç ve kuyruk örneklerinin MN frekanslarının anlamlılık düzeyi benzer olmakla birlikte, diğer gruplarda kuyruk örneklerinin MN frekansının, solungaç örneklerinin MN frekansına göre daha yüksek anlamlılık düzeyine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Morfolojik nükleus düzensizlikleri analizine göre; solungaç ve kuyruk örneklerinin tamamında BN, ÇN, TN ve LN frekansları negatif kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Kuyruk örneklerinin BN, TN, ÇN frekansları nadiren bazı gruplar dışında, LN frekansları ise tüm gruplarda solungaç örneklerine kıyasla daha yüksektir. ÇN ve LN frekansları tüm gruplarda negatif kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Beraberinde ÇN frekansları tüm gruplarda en yüksek anlamlılık düzeyine sahiptir.

Toplam genotoksik hasar frekansları incelendiğinde tüm deney gruplarında genotoksik hasar frekanslarının negatif kontrole göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği, kuyruk örneklerinin toplam genotoksik hasar frekanslarının tüm gruplarda solungaç örneklerine göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızdan ve bilim insanlarının önceki çalışmalarından anlaşılabileceği üzere NP'ler, genel olarak canlı sistemlerde farklı düzeyde genotoksik, sitotoksik, histopatolojik vb. etkilere sebep olabilmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çok azında NP'lerin herhangi bir hasara yol açmadığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, NP'lerin potansiyel toksik etkileri konusundaki endişelerin yersiz olmadığını, bu konuda daha fazla bilimsel çalışma yapılması gerektiğini göz önüne sermektedir.

Ayrıca araştırmamız esnasında yaptığımız literatür taramasında, NP'lerin toksik potansiyelinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışmaların sınırlı sayıda olduğunu

gözlemlemiş bulunmaktayız. Özellikle farklı doku, organ ve hücre hatlarında yapılacak karşılaştırmalı çalışmalar, NP'lerin toksik etkileri konusunda daha ayrıntılı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak sağlayacaktır. Bu nedenle, elde ettiğimiz bulguların yanında araştırma yöntemimizin de benzer çalışmalara örnek oluşturabileceği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- AKICI, M. (2017). *Titanyum dioksit nanopartiküllerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi* Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Ali, D., Ali, H., Alarifi, S., Kumar, S., Serajuddin, M., Mashih, A.P., Ahmed, M., Khan, M., Adil, S.F., Shaik, R.M., Ansari, A.A. (2015). Impairment of DNA in a freshwater gastropod (*Lymnea luteola* L.) after exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68:543-552.doi: 10.1007/s00244-015-0132-0
- Ali, F.K., El Shehawi, A.M., Seehy, M.A. (2008). Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology*, 7(5):606-612.
- Alimba, C.G., Adekoya, K.O., Soyinka, O.O. (2019). Exposure to effluent from pharmaceutical industry induced cytogenotoxicity, hematological and histo-pathological alterations in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *EXCLI Journal*, 18:63-78.doi:10.17179/excli2018-1916
- Anonim 1. (2019) www.akvaryum.com/ adresinden 23.04.2019 tarihinde erişildi.
- Anonim 2. (2019) www.google.com/search?q=malawi+gölü+haritası adresinden 24.04.2019 tarihinde erişildi.
- Anonim 3. (2019) www.ertekinkimya.com/index.php/titan-dioksit/ adresinden 25.04.2019 tarihinde erişildi.
- Anonim 4. (2019) www.google.com/search?q=titanyum+dioksit/ adresinden 23.04.2019 tarihinde erişildi.
- Aslantürk, Ö.S., Çelik, T.A. (2017). Genotoxic risk assessment in professionals working hairdressers area using buccal micronucleus assay, in Aydın City, Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 14700-14705. doi: 10.1007/s11356-017-9075-5
- Asztemborska, M., Jakubiak, M., Stęborowski, R., Chajduk, E., Bystrzejewska, G. (2018). Piotrowska titanium dioxide nanoparticle circulation in an aquatic ecosystem. *Water Air Soil Pollut*, 229:208.doi:10.1007/s11270-018-3852-8

- Atacı, G., Türkoğlu, Ş. (2020). The investigation of toxic, genotoxic and cytotoxic effects of various nanoparticles in *Allium cepa* and *Caenorhabditis elegans* test systems. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 05(01): 016-035. doi:10.30574/wjarr.2020.5.1.0108
- Ateş, M., Çelik Çakıroğulları, G. (2017). Akuatik nanotoksikoloji. *Ziraat Mühendisliği*, 364: 47-53.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4 (3): 221-229.
- Baldisserotto, B., Kamunde, C., Matsuo, A., Wood, C.M. (2004). A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 67(1):57-73. doi: 10.1016/j.aquatox.2003.12.004
- Berik, N. (2018). Possible harmful effects of titanium dioxide and nano titanium dioxide use on aquatic product, *Comu Journal of Marine Science and Fisheries*, 1(2): 59-65.
- Boyle, D., Al-Bairuty, G.A., Henry, T.B., Handy, R.D. (2013). Critical comparison of intravenous injection of TiO₂ nanoparticles with waterborne and dietary exposures concludes minimal environmentally-relevant toxicity in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Pollution*, 182:70-79. doi: 10.1016/j.envpol.2013.07.001
- Börcek Kasurka, C. (2019). Geno-sitotoksikite çalışmalarına sitom yaklaşımı. *Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*, 8(2):261-269. doi: 10.18036/estubtdc.599209
- BULGUROĞLU, S.Y. (2014). *Bazı akvaryum balıklarında (Cichlidae ve Poeciliidae) rastlanılan ektoparaziter enfestasyonların araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Carrasco, K.N., Tilbury, K.L., Myers, M.S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic*, 47: 2123-2136.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*. *Toxicology Letters*, 163(2): 109-20. doi:10.1016/j.toxlet.2005.10.003

- Clemente, Z. Castro, V.L., Feitosa, L. O., Lima, R., Jonsson, C. M., Maia, A. H. N., Fraceto, L. F. (2013). Fish exposure to nano-TiO₂ under different experimental conditions: methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. *The Science of the Total Environ*, 1: 463-464. All rights reserved. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.022
- Colvin, V.L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21:1166-1170.
- Çavaş, T. ve Ergene Gözükar, S. (2005). Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46:64-70. doi:10.1002/em.20130
- Demirel, S. ve Zamani, A.G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3):123-127.
- Dikel, S. (2009). Su sıcaklığının balık yetiştiriciliğine etkisi. *Alinteri Ziraat Bilimleri Dergisi*, 1: 42-49.
- Di Virgilio A.L., Reigosa M., Arnala, P.M., De Mele, F.L. M. (2010). Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1). *Journal of Hazardous Materials*, 177:711-718.
- Disner, G.R., Guiloski, I.C., Klingelfus, T., Oya Silva, L.F., Lirola, J.R., Silva De Assis, H.C., Cestari, M.M. (2017). Co-exposure effects of titanium dioxide nanoparticles and metals on antioxidant systems and DNA in the fish *Hoplias intermedius*. *Ecotox Brasil*, 12:75-84.
- Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., Tran, L., Stone, V. (2002). The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *Journal of Aerosol Medicine*, 15: 213-220.
- Doğan Etyemez, G., Tümöklü Soyutürk, Ö., Bircan, R. (2013). Hamsi ve çaça unu içeren yemlerin yunus çiklit (*Cryptocara moorii Boulenger*, 1902) yavrularının büyümesi üzerine etkileri. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3(8):11-20.
- Fan, Z. ve Lu, J.G. (2005). Zinc oxide nanostructures: synthesis and properties. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5:1561-1573. doi:10.1166/jnn.2005.182

- Garcia, M.P., Parca, R.M., Chaves, S.B., Silva, L.P., Santos, A.D., Lacava, Z.G.M. (2005). Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293: 277-282.doi:10.1016/j.jmmm.2005.02.053
- Gleason, K.M. (2017). Hermann Joseph Muller's study of x-rays as a mutagen (1926-1927).*The Embryo Project Encyclopedia*. <https://embryo.asu.edu/pages/hermann-joseph-mullers-study-x-rays-mutagen-1926-1927> adresinden 12.05.2019 tarihinde erişildi.
- Gonzalez, L., Sanderson, B.J.S., Kirsch-Volders, M. (2011). Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*, 26: 185-191.doi:10.1093/mutage/geq088
- Guildford, S.J., Bootsma, H.A., Fee, E.J., Hecky, R.E., Patterson, G. (2000). Phytoplankton nutrient status and mean water column irradiance in Lakes Malawi and superior. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 3:35-45. doi:10.1080/14634980008656989
- Guzman, K. A. D., Finnegan, M. P., Banfield, J. F. (2006). Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 40:7688-7693. doi:10.1021/es060847g
- Jugan, M.L., Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., Carriere, M. (2012). Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 6:501-513.doi: 10.3109/17435390.2011.587903
- Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M., Boller, M. (2008). Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 156:233-239.doi:10.1016/j.envpol.2008.08.004
- Kart, Y.S. (2016). Titanyum. *İnovatif Kimya Dergisi*. <https://inovatifkimyadergisi.com/> adresinden 28.04.2019 tarihinde erişildi.
- KILIÇ, C. (2018). *Katkılı ve katkısız titanyum dioksit kaplamaların üretimi ve karakterizasyonu* Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Kim, B.G., Park, S.J., Kim, H.W. (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*, 89(1): 338-347.doi:10.1093/toxsci/kfj027
- Kirk, R.G.W. (2018). Recovering the principles of humane experimental technique: The 3Rs and the human essence of animal. *Science, Technology & Human Values*, 43:622-648.doi:10.1177/0162243917726579
- Kontaş, S. ve Bostancı, D. (2020). Ağır metal varlığında *Vimba vimba* bireylerindeki genotoksik hasarın tespiti. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(3): 2090-2100.doi: 10.21597/jist.692710
- Könen Adıgüzel, S. ve Çavaş, T. (2017). Trifluralin, treflan ve etil metan sülfonatın *Oreochromis niloticus*'ta oluşturduğu genotoksik hasar üzerine askorbik asitin antigenotoksik etkisi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1):10-19.doi: 10.17100/nevbiltek.331407
- KÖNEN, S. (2007). *Trifluralin ve askorbik asit kombinasyonlarının Oreochromis niloticus üzerindeki genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Kückelhaus, S., Garcia, V.A.P., Lacava, L.M., Azevedo, R.B., Lacava, Z.G.M., Lima E.C.D., Figueiredo, F., Tedesco, A.C., Morais, P.C. (2003). Biological investigation of a citrate-coated cobalt-ferrite-based magnetic fluid. *Journal of Applied Physics*, 93(10): 6707-6708.doi: 10.1063/1.1558665
- KUTOĞLU, S. (2017). *Tatların Baraj Gölündeki su kirliliğinin bazı Cyprinidae türlerine genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir.
- Küçük, S., Midilli, S. Güler, M., Çoban, D. (2018). Kadmiyuma maruz bırakılmış sarı prenses (*Labidochromis caeruleus*) balıklarında saptanan histolojik değişiklikler üzerine bir ön çalışma. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(3):261-266. doi:10.12714/egejfas.2018.35.3.05
- Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Xiao, Z., Ye, B. (2009). Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science*, 19:573-579. doi:10.1016/j.pnsc.2008.06.020

- Meschini, S., De Berardis, B., Civitelli, G., Condello, M. Lista, P., Pozzi, R., Arancia, G. (2010). Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246:116-127. doi:10.1016/j.taap.2010.04.012
- Mital, G.S. ve Manoj, T. (2011). A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*, 56(16): 1639-57. doi: 10.1007/s11434-011-4476-1
- Mouminsta, H. (2017). E171 Titanyum dioksit (TiO₂) katkı maddesi. *İnovatif Kimya Dergisi*.<https://inovatifkimyadergisi.com/> adresinden 28.09.2019 tarihinde erişildi.
- Nagamachi, C.Y, Melo, K.M., Grisolia, C.K., Pieczarka, J.C., de Souza, L.R, Filho, J.S. (2014). Fish in micronucleus test demonstrates aneugenic action of rotenone in a common freshwater fish species, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mutagenesis*, 29: 215-219.doi:10.1093/mutage/geu005
- Nigro, M., Bernardeschi, M., Costagliola, D., Della Torre, C., Frenzilli, G., Guidi, P., Lucchesi, P., Mottola, F., Santonastaso, M., Scarcelli, V., Monaci, F., Corsi, I., Stingo, V., Rocco, L. (2015). n-TiO₂ and CdCl₂ co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium: Genomic, DNA and chromosomal damage evaluation in the marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*, 168: 72-77.doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.013
- Nowack, B. ve Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150:5-22. doi:10.1016/j.envpol.2007.06.006
- Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W., Hubbs, A.F., Cumpston, J.L., Chen, B.T., Frazer, D.G., Castranova, V. (2008). Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Particle and Fibre Toxicology*, 5:1. doi:10.1186/1743-8977-5-1
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (1992). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals 203. Fish Acute Toxicity Test*, 1-9.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 487. In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, 1-26.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014). *OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, 1-21.

- Özbolat, G., Tuli, A. (2016). Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(4):502-521. doi:10.17827/aktd.253562
- Özkaleli, M. ve Erdem, A. (2018). Biototoxicity of TiO₂ nanoparticles on *Raphidocelis subcapitata* microalgae exemplified by membrane deformation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15:416.doi:10.3390/ijerph15030416
- ÖZKAN, D. (2009). *Acephate ve mephosfolan insektisitlerinin insan lenfosit kültüründe genotoksik etkileri* Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özkan, F., Gündüz, S.G., Berköz, M., Özlüer Hunt, A. (2011). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. *Turkish Journal of Zoology*, 35(4): 585-592.doi:10.3906/zoo-0907-77
- Özkara, A. ve Akyıl, D. (2015). Bitkilerde mikronükleus testi ile genotoksik hasarın değerlendirilmesi. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 34:27-40.
- Paull, R., Wolfe, J., Hebert, P., Sinkula, M. (2003). Investing in nanotechnology. *Natural Biotechnology*, 21(10):1144-1147.doi: 10.1038/nbt1003-1144
- QARANJIKI, A. (2017). *Sarı prenses çiklit (Labidochromis caeruleus Fryer, 1956) balığında embriyolojik ve larval gelişim: morfolometrik ve histolojik inceleme* Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., Tan, W. (2001). Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst*, 126: 1274-1278.doi: 10.1039/b101489g
- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D. (2009). Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): No effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*, 18:939-951.doi: 10.1007/s10646-009-0357-7
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N. (2008). Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research*, 640:113-122.doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010

- Rossi, E.M.P.L., Koivisto, A.J., Vippopa, M., Jensen, K.A., Miettinen, M., Sirola, K., Nykasenoja, H., Karisola, P., Stjernvall, T., Vanhala, E., Kiilunen, M., Pasanen, P., Makinen, M., Hameri, K., Joutsensaari, J., Tuomi, T., Jokiniemi, J., Wolff, H., Savolainen, K., Matikainen, S., Alenius, H. (2010). Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicological Sciences*, 113:422-433. doi:10.1093/toxsci/kfp254
- Salata, O.V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2:3.
- Saman, S. Moradhaseli, S., Shokouhia, A., Ghorbani, M. (2013). Histopathological effects of ZnO nanoparticles on liver and heart tissues in wistar rats. *Advances in Bioresarch*, 4(2):83-88.
- Saqib, Q., Al-Khedhairi, A.A., Siddiqui, M.A., Abou-Tarboush, F.M., Azam, A., Musarrat, J. (2012). Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology In vitro*, 26: 351-361. doi:10.1016/j.tiv.2011.12.011
- SAYGI, T. (2009). *Akvaryum balıklarından sarı prensesin (Labidochromis caeruleus, Fryer 1956) üretilmesi üzerine bir araştırma* Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Schmitter-Soto, J.J. (2007). A systematic revision of the genus *Archocentrus* (Perciformes: Cichlidae), with the description of two new genera and six new species. *Zootaxa*, 1603: 1-78.
- Sezginer, H. ve Dane, F. (2016). Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 9(1): 50-55.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10:15. doi:10.1186/1743-8977-10-15
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of Cell Biology*, 6: 1307-1320

- Takeda, K., Suzuki, K., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M. (2009). Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, 55(1): 95-102.
- Talapatra, S.N., Banerjee, P., Mukhopadhyay, A. (2014). Dose and time-dependent micronucleus induction in peripheral erythrocytes of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) by zinc. *International Letters of Natural Sciences*, 9: 36-43. doi:10.18052/www.scipress.com/ILNS.9.36
- Taşçı, B., Tok, C.V. (2018). Çanakkale civarından toplanan *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) (Amphibia: Urodela) örneklerinde mikronukleus analizi ve nuklear anomaliler. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(2):88-102.
- Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., Schiestl, R.H. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Research*, 69: 8784-8789. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2496
- TURUNÇ, S. (2019). *Nanoteknolojik yapı malzemelerinin Türk yapı sektöründe kullanımı* Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Mimarlık Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Üstüner, D. (2011). Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz bağlantısı. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(1): 64-69
- Venkatesan, N., Yoshimitsu, J., Ito, Y., Shibata, N., Takada, K. (2005). Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials*, 26: 7154-7163. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.012
- Vidya, P.V. ve Chitra, K.C. (2017). Assessment of acute toxicity (LC₅₀ 96h) of aluminium oxide, silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on the freshwater fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 5: 327-332.
- Vidya, P.V. ve Chitra, K.C. (2018). Evaluation of genetic damage in *Oreochromis mossambicus* exposed to selected nanoparticles by using micronucleus and comet bioassays. *Ribarstvo*, 76(2):140-158. doi: 10.2478/cjf-2018-0015

- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science and Technology*, 46: 2242 -2250.doi:10.1021/es204168d
- YAKABOYLU, G.A. (2011). *Şekil ve boyut kontrollü titanyum dioksit partiküllerinin üretimi* Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., Tschopp, J. (2010). Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:19449-19454.doi:10.1073/pnas.1008155107
- Yıldız, Y. ve Önen, Ö. (2016). Bazı kirleticilerin Teleostlar üzerindeki genotoksik etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1):63-74.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, M. (2014).Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda/The Journal Food*, 39 (3): 179-186.doi: 10.5505/gida.24861
- Zhu, R.R., Wang, S.L., Chao, J., Lu Shi, D., Zhang, R., Sun, X.Y., Yao, S.D. (2009). Bio-effects of nano-TiO₂ on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size. *Materials Science and Engineering*, 29:691-696.doi:10.1016/j.msec.2008.12.023
- Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y. (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78:209-215. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.013
- ZORLU, T. (2016). *Farklı dozlardaki titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülünün Galleria mellonella (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)'nın biyolojisine ve enzim sistemine etkisi* Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

BİLİMSEL ETİK BEYANI

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere, bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

06/07/2021

Bilgehan BULUT