



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**NANO TiO<sub>2</sub> PARTİKÜLLERİNİN YÜKSEK  
CO<sub>2</sub> İÇERİKLİ SULARDA YAŞAYAN JAPON  
BALIKLARI (*Carassius auratus*)  
ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK VE  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRMESİ**

---

IRMAK BİLGİSEVEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**  
Prof. Dr. Nagihan Gülsoy

İSTANBUL, 2019

---



MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**NANO TiO<sub>2</sub> PARTİKÜLLERİNİN YÜKSEK  
CO<sub>2</sub> İÇERİKLİ SULARDA YAŞAYAN JAPON  
BALIKLARI (*Carassius auratus*)  
ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK VE  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRMESİ**

---

IRMAK BİLGİSEVEN

(520116007)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Nagihan Gülsoy

İSTANBUL, 2019

---

# MARMARA ÜNİVERSİTESİ

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans/Doktora Öğrencisi Irmak Bilgisevenin "Nano TiO<sub>2</sub> partiküllerinin yüksek CO<sub>2</sub> içerikli sularda yaşayan japon balıkları (*Carassius auratus*) üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi" başlıklı tez çalışması, tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Nagihan GÜLSOY (Danışman)  
Marmara Üniversitesi .....

Prof. Dr. Lütfiye ERYILMAZ (Üye)  
İstanbul Üniversitesi .....

Dr. Öğr. Üyesi Özal MUTLU (Üye)  
Marmara Üniversitesi .....

### ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/07/2019. tarih ve 2019/15.02 sayılı kararı ile Irmak Bilgiseven'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.



## **TEŞEKKÜR**

Bu tez çalışmasının yürütölmesinde hep yanımda olarak bana yol gösteren Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY'a teŐekkürü borç bilirim.

Aynı zamanda bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan sevgili Doç. Dr. Filiz VARDAR ve AraŐ. Gör. Aslıhan ÇETİNBAŐ GENÇ'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Son olarak maddi ve manevi olarak yanımda olan, en zor zamanlarımda yardım eli uzatan Nur KALUÇ'a da çok teşekkür ederim.

**Haziran, 2019**

**Irmak Bilgiseven**

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>SEMBOLLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMA</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>xii</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1. 1. Nanoteknoloji.....	1
1.1.1. Nanomateryallerin kullanım alanları.....	2
1.1.2. Nanoteknoloji çevre etkileşimi.....	5
1. 2. TiO <sub>2</sub> Nanopartikülü.....	7
1. 2. 1. TiO <sub>2</sub> nanopartikülünün kullanım alanları.....	10
1. 2. 2. TiO <sub>2</sub> NP toksikolojisi .....	12
1.2. Küresel Isınmanın Akuatik Sistem Üzerindeki Etkisi.....	21
1.2.1. Yüksek CO <sub>2</sub> 'in akuatik canlılar üzerindeki etkisi .....	23
<b>2.MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>31</b>
2.1.Araştırma Materyali ve Temini.....	31
2.2. CO <sub>2</sub> Sistemi .....	32
2.3. TiO <sub>2</sub> Uygulanması .....	34
2.4. Örneklerin Alınması.....	35
2.5. Comet Analizi .....	36
2.6. Mikronukleus Yöntemi .....	39
2.7. Histopatolojik İnceleme .....	40
2.8. Pozitif ve Negatif Kontroller .....	42
2.9. İstatistik Hesaplamaları .....	42
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>43</b>
3.1. TiO <sub>2</sub> Nanopartikülü Karakterizasyonu.....	43
3.2. Comet Analizi .....	43
3.3. Mikronukleus Testi .....	50
3.4. Davranış Farklılıkları .....	52

3.5. Histopatolojik Analiz .....	53
<b>4. SONUÇLAR.....</b>	<b>70</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>89</b>



## ÖZET

# Nano TiO<sub>2</sub> Partiküllerinin Yüksek CO<sub>2</sub> İçerikli Sularda Yaşayan Japon Balıkları (*Carassius auratus*) Üzerindeki Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi

Sanayi devriminden sonra artan popülasyon ve karbon salınımı günümüzde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Artan karbon salınımı hem havadaki karbon miktarını arttırmış hem de sucul sistemlere geçerek, sistemlerin stabilitesini etkilemeye başlamıştır. Sucul sistemlerde artan CO<sub>2</sub> miktarı suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemekte ve bu değişimler canlılar için zarar verici olabilmektedir.

Metal nanopartiküller boyutları 1-100 nanometre arasında değişen parçacıklardır. Boyutlarının bu kadar küçük olması diğer moleküllere göre daha farklı elektriksel, kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır. Günümüzde yemek, ilaç endüstrilerinde sıklıkla kullanılmakta, hastalıkların görüntülenmesinde faydalanılmaktadır, mekanik araçlarda iletim hızından yararlanılmaktadır. Kullanımı bu kadar yoğun olan metal nanopartiküllerin canlı vücuduna alındığı, biriktiği ve canlı yaşamına zararlı etkiler yarattığı bilinmektedir.

Bu çalışmanın asıl amacı yükselen CO<sub>2</sub> konsantrasyonları ile TiO<sub>2</sub> NP'nün beraber sinerjik bir toksisite yaratıp yaratmadığını tayin etmektir. Bu sebeple *Carassius auratus* bireyleri öncelikle iki gruba ayrılarak 20 mg/L ve 30 mg/L olmak üzere CO<sub>2</sub> seviyesi artırılmış akvaryum suyunda belirli sürelerde bekletildi. Deney 1, 2 ve 3 hafta olarak üç farklı süre için kurgulandı. Her iki grup da artan konsantrasyonlarda TiO<sub>2</sub> NP maruz bırakıldı. Uygulanacak konsantrasyonlar 5, 10 ve 20 µg/L olarak belirlendi.

Farklı konsantrasyonlar içeren Nano TiO<sub>2</sub> ve yüksek CO<sub>2</sub> seviyelerindeki sulara maruz bırakılan bireylerin eritrositlerinden mikronükleus testi ve comet analizi yapılarak genotoksik ve sitotoksik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Comet analizinin sonucunda yüksek CO<sub>2</sub> derişimine maruz kalan balıklarda gözlemlenen DNA kırıkları düşük derişime göre yüksek bulunmuştur. Özellikle olive kuyruk momentleri karşılaştırıldığında yüksek CO<sub>2</sub>'e sahip grupların değerleri ile düşük grup arasındaki dramatik fark gözlemlenebilmektedir (20mg/L için 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP 8,5 iken 30mg/L CO<sub>2</sub> için bu değer 29,1). Bununla beraber eritrositlere uygulanan mikronükleus analizi

sonuçlarında gruplar ve sreler arasında anlamlı bir mikronükleus oluşunu gzlelenmemiştir.

Histopatolojik araştırmalar için solungaç ve karaciğerler dokuları rutin histolojik işlemlerden geçirildikten sonra incelenmiştir. Bütün doz ve gruplarda histopatolojik bulgulara rastlanmaktadır. Özellikle solungaç dokularında meydana gelen hasar ve değişimler dramatiktir. Bunun hem CO<sub>2</sub> hem de TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün vcudada girmek için asıl yol olarak solungaçları kullanması ile yakından ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Karaciğerde görülen histopatolojik bulguların solungaçlardan daha az olduğu tespit edilmiştir. Bunun altında yatan nedenler TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün agrega olması sebebiyle karaciğere ulaşamaması, CO<sub>2</sub>'in karaciğer dokusuna direkt zarar vermemesi gibi seçenekler sıralanabilmektedir.

Küresel ısınma sonucunda sucul çevrede artan CO<sub>2</sub> seviyelerinin TiO<sub>2</sub> NP'nn toksik etkilerini arttırması nedeniyle bu sinerjik etkinin daha yakından takip edilmesi gerekmektedir.

**Haziran, 2019**

**Irmak Bilgiseven**



## **ABSTRACT**

### **Genotoxic and Cytotoxic Assessment of Elevated CO<sub>2</sub> Levels with Nano TiO<sub>2</sub> particle on Goldfish (*Carassius auratus*)**

Increasing population and carbon emissions after the industrial revolution have reached their highest point today. Carbon emissions has increased and causing the increasing the amount of carbon in the air and started to affect the stability of the systems by switching to aquatic systems. In aquatic systems, the increasing amount of CO<sub>2</sub> affects the physical and chemical properties of water and these changes can be harmful for living things.

Metal nanoparticles are particles ranging in size from 1 to 100 nanometers. Its size is so small that it has different electrical, chemical and physical properties than other molecules. Today, frequently used in pharmaceutical and food industries, imaging of diseases and transmission speed is utilized in mechanical devices. It is known that uptake and accumulation of metal nanoparticles, which are so intense to use, create toxic effects on living life.

The main purpose of this study was to determine whether the rising CO<sub>2</sub> concentrations together with the TiO<sub>2</sub> NP create a synergistic toxicity. Fort his purpose, *Carassius auratus* individuals were first divided into two groups and were kept in aquarium water with increased CO<sub>2</sub> levels of 20mg/L and 30mg/L. The experiment was designed for three different periods as 1, 2 and 3 weeks. Both groups were exposed to TiO<sub>2</sub> NP at increasing concentrations. The concentrations to be applied were 5, 10 and 20µg/L.

Genotoxic and cytotoxic studies were performed by performing micronucleus test and comet analysis from erythrocytes of individuals exposed to different nano TiO<sub>2</sub> concentrations and high levels of CO<sub>2</sub>. As a result of Comet analysis, DNA fractures observed in fish exposed to high CO<sub>2</sub> concentration were higher than low concentration. Especially when the olive tail moments are compared, the dramatic difference between the values of high CO<sub>2</sub> groups and low group can be observed (For 20mg/L, 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP is 8,5 while for 30mg/L CO<sub>2</sub> this value 29,1). However, the results of micronucleus

analysis on erythrocytes showed no significant micronucleus formation between groups and durations.

For histopathological investigations, gill and liver tissues were examined after routine histological procedures. Histopathological findings are observed in all doses and groups. Especially damages and changes in gill tissues are dramatic. This is thought to be closely related to the fact that both the CO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles use the gills as the main route to enter the body. Histopathological findings in the liver were found to be less than the gills. The reasons underlying this are options such as the fact that the TiO<sub>2</sub> nanoparticle cannot reach the liver due to the aggregate and CO<sub>2</sub> does not directly damage the liver tissue.

This synergistic effect needs to be closely monitored, as the increased CO<sub>2</sub> levels in the aquatic environment as a result of global warming increase the toxic effects of TiO<sub>2</sub> NP.

## SEMBOLLER

%	: Yüzde
$\mu\text{atm}$	: Mikroatmosfer
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
<b>ACh</b>	: Asetilkolin
<b>AChE</b>	: Asetilkolin esteraz
<b>Ag</b>	: Gümüş
$^{\circ}\text{C}$	: Derece santigrat
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	: Kalsiyum karbonat
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	: Kadmiyum Klorür
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon Dioksit
<b>CoQ10</b>	: Koenzim Q10
<b>COX</b>	: Sitokrom c oksidaz
<b>d.nm</b>	: Çap x Nanometre
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>dk</b>	: Dakika
<b>E<sub>g</sub></b>	: Serbest enerji boşluğu
<b>Eh</b>	: Redoks potansiyeli
<b>EOG</b>	: Elektrookülografi
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>g</b>	: Gram
<b>h<sup>+</sup>VB</b>	: Pozitif yüklü boşluk
<b>H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Karbonik asit
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Bikarbonat
<b>HO<sub>3</sub></b>	: Hidronyum
<b>hv</b>	: Fotonun ışık enerjisi
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>L</b>	: Litre

**LOO•** : Lipid Peroksit radikali  
**mg** : Miligram  
**mV** : Milivolt  
**NaCl** : Sodyum Klorür  
**NaOH** : Sodyum Hidroksit  
**NKA** : Na/K Aktivitesi  
**O<sub>2</sub>•** : Singlet oksijen  
**OH•** : Hidroksil radikali  
**pHe** : Ekstraselüler alanın pH'si  
**pHi** : İntraselüler alanın pH'si  
**pHzpc** : pH zeta potansiyel zero  
**ppm** : Her milyondaki parça miktarı  
**RCR** : Solunum kontrol oranı  
**RO-OH** : Organik peroksit radikalleri  
**TiO<sub>2</sub> NP** : Titanyum Dioksit nanopartikülü  
**ZnO** : Çinko Oksit

## **KISALTMA**

<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EMS</b>	: Etilmetil sülfonat
<b>ETS</b>	: Elektron transport sistemi
<b>HMA</b>	: Yüksek kaynama noktalı agar
<b>LMA</b>	: Düşük kaynama noktalı agar
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>MS222</b>	: Tricaine metasülfonat
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PC12</b>	: Fare Adrenal Medulla Hücreleri
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>Tris-Baz</b>	: Tris(hidroksimetil)aminometan
<b>Tris-HCl</b>	: Tris-hidroklorik asit
<b>Triton-X</b>	: Polietilen glikol

## ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil 1.1. Nanopartiküllerin kullanım alanları	2
Şekil 1.2. Nanomateryallerin yiyecek sektöründe kullanım alanları	4
Şekil 1.3. Nanoteknolojinin çevre ve insanla olan etkileşimi	6
Şekil 1.4. TiO <sub>2</sub> nanopartikülünün fotokatalitik reaksiyonunun şematik görüntüsü	8
Şekil 1.5. TiO <sub>2</sub> NP'nün uyarılması ve reaktif oksijen üretmesinin şematik gösterimi	8
Şekil 1.6. Geçmiş verilere dayanarak 2025 yılında kadar tahmini TiO <sub>2</sub> kullanım alanları	10
Şekil 1.7. TiO <sub>2</sub> nanopartikülünün vücuda olası giriş yolları ve merkezi sinir sistemi üzerinde yaptığı hasarın mekanizması	13
Şekil 1.8. Los Angeles Bölgesinde 1 yıllık simülasyon ile elde edilen nanopartikül değerleri	15
Şekil 1.9. Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli nanopartiküllerin 2001-2012 yılları arasında sedimentteki miktarındaki artış	15
Şekil 1.10. Donnan Potansiyeli	17
Şekil 1.11. TiO <sub>2</sub> NP'nün vücuda alımı ve birikimi ile ilgili olası yollar	19
Şekil 1.12. Yeryüzünde suyun bulunma şekilleri	21
Şekil 1.13. Farklı pH değerlerinde karbonun bulunma şekilleri	23
Şekil 1.14. CO <sub>2</sub> 'in akuatik canlılar üzerinde gösterdiği olumsuz etkiler	25
Şekil 1.15. Denizel balıkta asit-baz dengesi regülasyonu	27
Şekil 2.1. <i>Carassius auratus</i>	31
Şekil 2.2. Deney için dizeyn edilen CO <sub>2</sub> düzeneği	33
Şekil 2.3. <i>Carassius auratus</i> bireylerinin iç organ anatomisi	36
Şekil 2.4. Comet analizinin şematik gösterimi	37
Şekil 2.5. Mikronükleus sayımı için yayma kan preparatı uygulamasının şematik gösterimi	39

<b>Şekil 2.6.</b>	Histolojik kesit alırken doku, fiksasyon, dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinizasyonu temsil eden şematik gösterim	40
<b>Şekil 2.7.</b>	Histopatolojik analiz sırasında kesit alma, kesitlerin lama alınması, boyama ve kesit hazırlama aşamalarının şematik gösterimi	42
<b>Şekil 3.1.</b>	Comet analizi Negatif ve pozitif kontroller (5mg/L EMS)	44
<b>Şekil 3.2.</b>	20 mg/L CO <sub>2</sub> 'e maruz kalan bireylerin farklı TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonları ve sürelerinde ortaya çıkan DNA hasarları	44
<b>Şekil 3.3.</b>	30 mg/L CO <sub>2</sub> 'e maruz kalan bireylerin farklı TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonları ve sürelerinde ortaya çıkan DNA hasarları	45
<b>Şekil 3.4.</b>	<i>Carasius auratus</i> bireylerinde negatif ve pozitif kontrollerle beraber 20 mg/L ve 30 mg/L CO <sub>2</sub> ve TiO <sub>2</sub> seviyelerinde ortaya çıkan kuyruk % DNA değerleri ve standart sapmaları	45
<b>Şekil 3.5.</b>	<i>Carasius auratus</i> bireylerinde negatif ve pozitif kontrollerle beraber 20 mg/L ve 30 mg/L CO <sub>2</sub> ve TiO <sub>2</sub> seviyelerinde ortaya çıkan kuyruk % DNA değerleri ve standart sapmaları	46
<b>Şekil 3.6.</b>	Farklı konsantrasyon ve sürelerde TiO <sub>2</sub> NP ile yüksek CO <sub>2</sub> 'in Mikronükleus oluşumuna etkisi	51
<b>Şekil 3.7.</b>	Solungaç negatif ve pozitif kontroller	56
<b>Şekil 3.8.</b>	20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna bir hafta maruz kalan bireyler	57
<b>Şekil 3.9.</b>	20mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna iki hafta maruz kalan bireylerde solungaç histolojisi	58
<b>Şekil 3.9.</b>	20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna iki hafta maruz kalan bireyler	59
<b>Şekil 3.10.</b>	1 Hafta boyunca 30 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalan bireyler	60
<b>Şekil 3.11.</b>	3 Hafta boyunca 30 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalan bireyler	61
<b>Şekil 3.12.</b>	Karaciğer negatif ve pozitif kontroller.	63
<b>Şekil 3.13.</b>	1 Hafta boyunca 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireylerde karaciğer histolojisi	64
<b>Şekil 3.14.</b>	3 Hafta boyunca 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireylerde karaciğer histolojisi	65

- Şekil 3. 15.** 2 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireylerde karaciğer histolojisi 66
- Şekil 3. 16.** 3 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireylerde karaciğer histolojisi 67





## TABLolar

	SAYFA NO
<b>Tablo 1.1.</b> Rutil, Anataz ve Brokit arasındaki yapısal farklılıklar	7
<b>Tablo 2.1.</b> Tez çalışmasındaki tüm deney grupları.	35
<b>Tablo 2.2.</b> Comet analizi için gereken kimyasallar, hazırlanışı ve kullanım amacı	38
<b>Tablo 3.1.</b> TiO <sub>2</sub> NP'nün karakterizasyon analizi sonuçları	43
<b>Tablo 3.2.</b> 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber kuyruk % DNA analiz sonuçları	46
<b>Tablo 3.3.</b> 30 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber kuyruk % DNA analiz sonuçları	46
<b>Tablo 3.4.</b> 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber olive kuyruk momenti analiz sonuçları	47
<b>Tablo 3.5.</b> 30 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO <sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber olive kuyruk momenti sonuçları	47
<b>Tablo 3.6.</b> 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarındaki (µg/mL) TiO <sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu solungaçlarda meydana gelen histopatolojik bulgular	54
<b>Tablo 3.7.</b> 30 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarındaki (5, 10, 20 µg/mL) TiO <sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu solungaçlarda meydana gelen histopatolojik bulgular	55
<b>Tablo 3.8.</b> 20 mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarındaki (5, 10, 20 µg/mL) TiO <sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik bulgular	68
<b>Tablo 3.9.</b> 30mg/L CO <sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı konsantrasyonlarındaki (5, 10, 20 µg/mL) TiO <sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik bulgular	69

# 1. GİRİŞ

## 1. 1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, 1-100nm aralığında nano ölçekli boyutlardaki malzeme ve yapıların geliştirilmesi ve uygulanması olarak tanımlanmaktadır (Roco 2003). 1999 yılında Ulusal Teknoloji Girişimi'nin (National Nanotechnology Initiative) hazırladığı rapora göre nanoteknolojik araştırmaların amaçları “Malzeme ve enerji kullanımının ve kirlilik kaynaklarının azaltılması, geri dönüşüm için fırsatlar arttırarak endüstriyel sürdürülebilirliğin korunması” olarak listelenmiştir (Rocco 1999).

Nanomateriyaller çok küçük olması nedeniyle yüzey alanları diğer materyallere göre daha fazladır. 10nm boyutundaki nanomateriyallerin atomlarının %35-40'ı yüzey alanını oluştururken 30nm'den daha büyük parçacıklarda bu oran %20 daha azalmaktadır (Auffan ve ark. 2006). Bu özelliği sayesinde boyutu ne kadar küçük olursa bu oran ile orantılı olarak güçlü yüzey reaktivitesi göstermektedirler (Chen and Zhang 1998).

Dünyada nanomateriyallerin 3 ana kaynağı vardır. Bunlar doğal kaynaklar, tasarlanmış nanomateriyal üretimi ve antropojenik kaynaklardır (Farré ve ark. 2009).

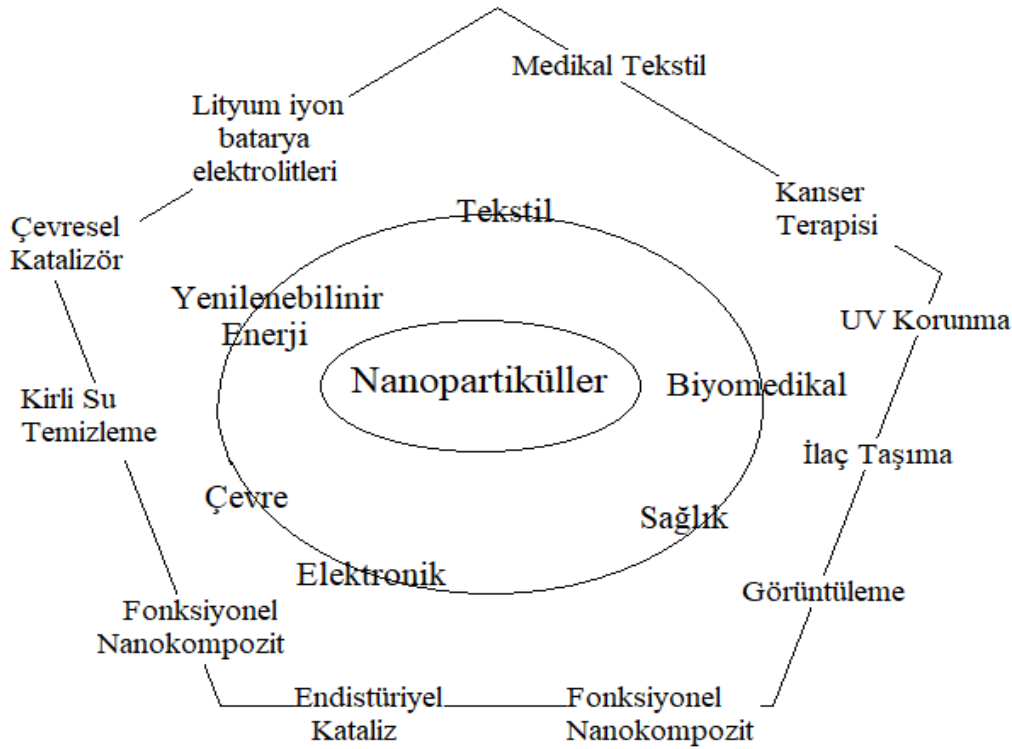
Doğal kaynaklar doğada çeşitli bozunma veya doğa olayları vasıtasıyla oluşan nanopartiküllerdir. Silikatların, oksitlerin ve diğer minerallerin kimyasal ayrışma süreçleri, amorf silika, allofan gibi sulu alümino silikatlar, halloysit gibi killer ve manyetit ve hematit gibi oksitler çeşitli nanopartikül türevlerinin doğada bulunmasına katkı sağlamaktadır (Farré ve ark 2009). Aynı zamanda  $Al_{13}$  ve  $Al_{30}$  gibi alüminyum nano tanecikleri ve  $Cu_4S_6$  gibi sülfid nano tanecikler doğal sulara bulunmaktadır (Furrer ve ark. 2002). Fulleren ve karbon nanotüpleri Kretase sonu-Tersiyer Başlangıcı dönemlerinde olduğu tespit edilen kayalarda bulunmuştur. Bu iki nanomateriyal Grönland'da bulunan 10,000 yıllık buzul kayalardan alınan örneklerde de tespit edilmiştir(). Mikroorganizmalar da çeşitli redoks reaksiyonlarının bulunduğu enerji metabolizması ile doğal yoldan nanopartikül üretmektedir (Gilbert 2005).

Nanomateriyallerin farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bulunduğu keşfedilmesi ile bu maddelerin insanlar tarafından sentezlenerek çeşitli alanlarda kullanılmasına neden olmuştur. 2006 yılında Nanoteknoloji piyasasının değerinin 10.5 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (<http://www.bccresearch.com/report/NAN031B.html>). 2020 – 2025 yılları arasında ise küresel olarak nanoteknoloji sektörlerinin yılda 1 trilyon dolar gelir elde etmesi ve 2 milyon insana iş olanağı sağlayacağını öngörmektedirler (Roco ve Bainbridge 2001). Bu

durum da doğaya salınan miktarın kaçınılmaz olarak artması anlamına gelmektedir (Barmo ve ark. 2013; Baker ve ark. 2013). Endüstriyel ve evsel atıkların kontrolsüz bir şekilde doğaya karışması doğadaki ve özellikle su-toprak sistemlerinde oluşan toksik etkinin önemli bir miktarını oluşturmaktadır. Aynı zamanda nanopartikül üretiminde oluşan yan ürünler de doğaya dönen nanopartikül miktarını arttıran bir unsurdur. Bununla beraber dizel yakıtların kullanımı, ağaç yakımı gibi olaylar da havaya nanopartikül salınımının en önemli kaynağıdır.

### 1.1.1. Nanomateryallerin kullanım alanları

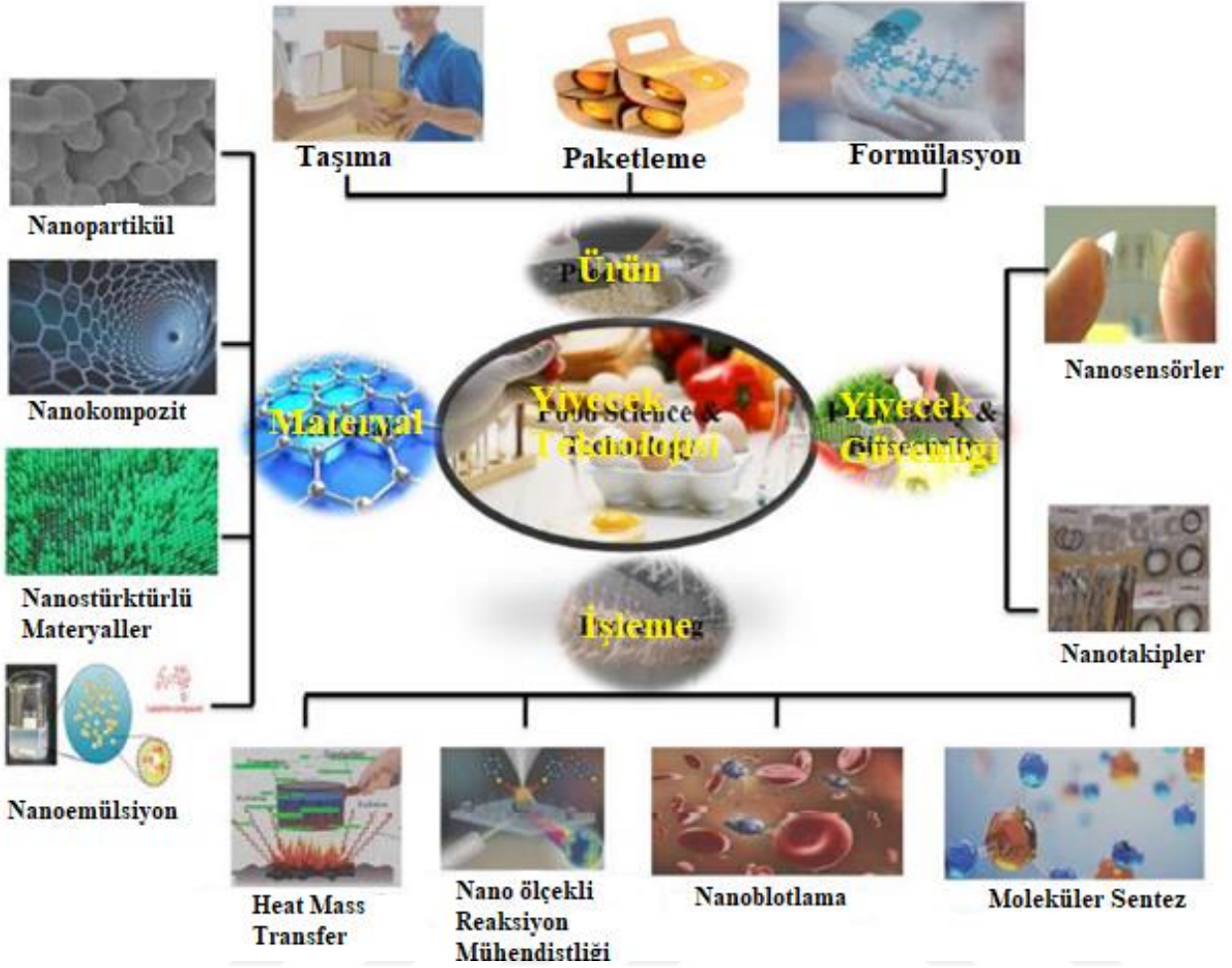
Nanomateryallerin katalist olması ve elektriği iletme hızının yüksek olması mikroelektronik sektöründe kullanım alanının oluşmasına neden olmuştur. Bu amaçla transistörler, solar enerji panelleri, enerji depolama, LED ekranlar, diyot lazerler, inkjet printing teknolojisi gibi çeşitli sektörlerde nanopartiküllerden yararlanılmıştır. Aynı zamanda farklı özellikleri sayesinde sürtünme önleyici boyalar, kendi kendini temizleyen camlar gibi çeşitli sektörlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Şekil 1.1.'de kullanım alanları ile ilgili şema gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Nanopartiküllerin kullanım alanları

Nanomateryaller yiyecek ve tarım çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu sayede küresel yiyecek üretimini ve besinsel değerlerini daha yukarı seviyelere çekmek ve daha kaliteli ürünler üretmek mümkün olmaktadır (Chung ve ark. 2017). Birçok çalışma nanosensör kullanımı ile yiyecek sistemlerindeki kontaminasyonları tespit etmek üzerindedir. Nanoemülsiyonlar içerdikleri nanodamlacıklar vasıtasıyla, fonksiyonel ve biyoaktif ürünlerin enkapsülasyonu ve taşınmasının sağlanması amacıyla geliştirilen en önemli iletim sistemlerinden birisidir (Tarhan ve ark. 2010). Yapılan çalışmalar Koenzim Q10 (CoQ10)'in nanoemülsiyon formlarının biyoyararlılığını önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir (Zuelli ve ark. 2006). Aynı zamanda biyoaktif içerikler ve probiyotik gibi fonksiyonel bileşenler nanoenkapsülasyon yöntemi ile katkı maddelerinin düzenli salınımını sağlamaktadır (Kuang ve ark. 2010). Nanokompozitler, çevre dostu ve biyolojik olarak parçalanabilir olduklarından, gıda ambalajı alanında en çok yararlanılan ürünlerdir. Nanokompozit bazlı ticarileştirilmiş gübreler, meyve ve sebzelerin etilen gazı ile olgunlaşmasına yardımcı olur (Gupta ve Moulik 2008). Nanosensörler yiyeceklerin taşınması ve saklanması sırasında çeşitli patojenlerin ve kimyasalların gözlemlenmesi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda şarap, kahve, meyve suyu, süt gibi çeşitli içeceklerin kalitesinin saptanmasında da yardımcı olmaktadır (Thiruvengadam ve ark. 2011).

Nanomateryaller sağlık sektöründe de kendine kullanım alanı bulmuştur. Beyin, göz gibi dokulara kolayca penetre olabilmesi özelliği sayesinde nanomateryal ile etkinleştirilmiş ilaçlar vücutta aktif olarak hedef dokuyu arayıp bağlanabilmektedir. Aynı zamanda tümör, kanser gibi çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılmak üzere biyogörüntüleme alanında da insanların hizmetine sunulmaktadır. Şekil 1.2.'de nanomateryallerin yiyecek sektöründe kullanım alanları gösterilmiştir.



**Şekil 1.2.** Nanomateryallerin yiyecek sektöründe kullanım alanları (Thiruvengadam ve ark. 2011 makalesinden düzenlenmiştir.)

Nanoteknolojinin kullanım alanlarının genişlemesi nanopartikülleri günlük hayatımıza da dahil etmiştir. Örnek olarak güneşin zararlı ışınlarından cildi koruması için güneş kremleri  $TiO_2$  veya  $ZnO$  nanopartikülü içermektedir. Gümüş nanopartiküller, cerrahi aletlerden kapı tokmağına kadar birçok sarf malzemesinde antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır (Mutlu 2015).

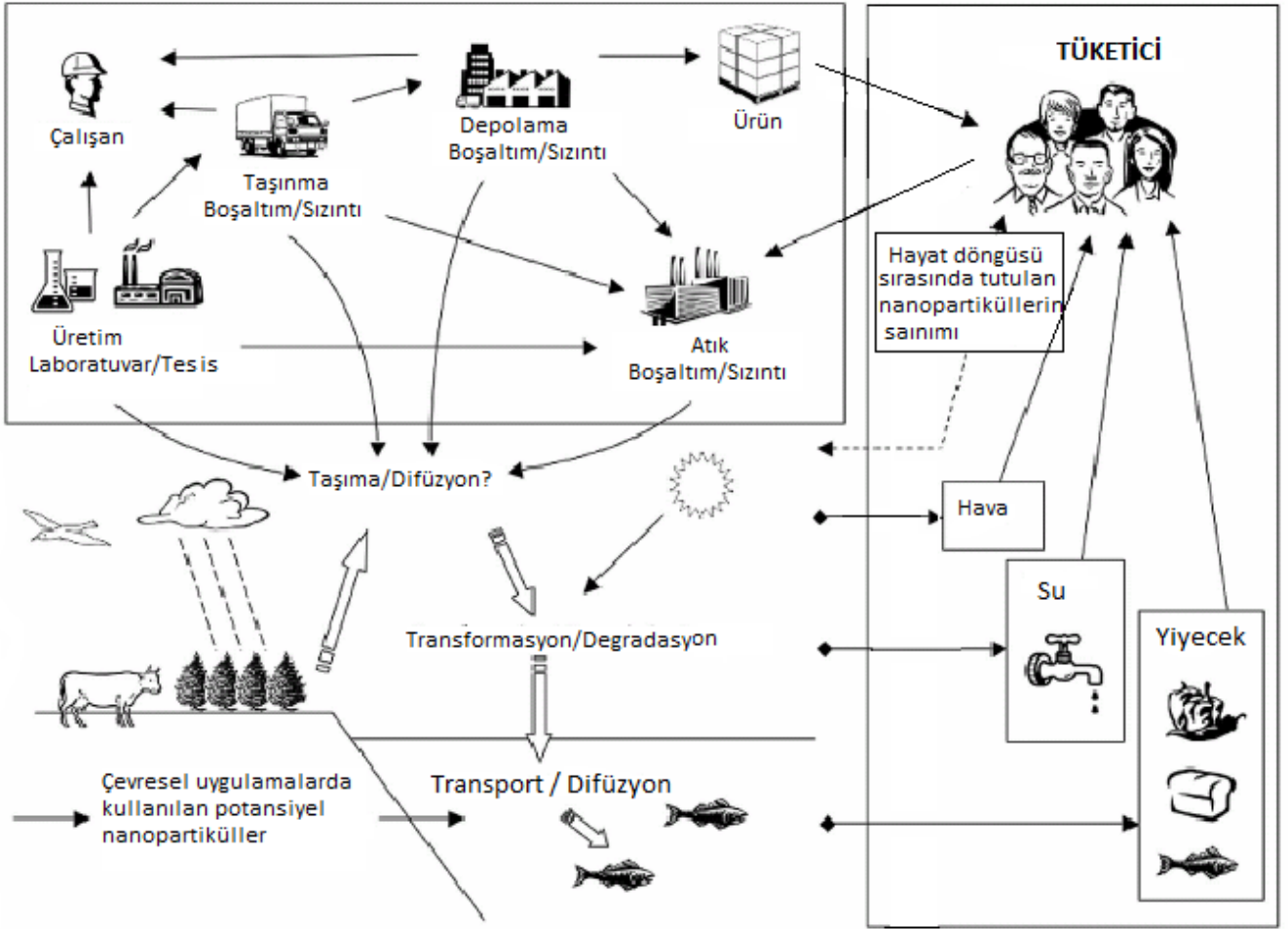
Nanopartiküllerin kullanım alanlarının bu kadar geniş olması atık formundaki nanopartikül miktarının da artmasına neden olmaktadır. Bu durum da çeşitli nanopartiküllerin doğada birikmesi ile sonuçlanmaktadır.

### 1.1.2. Nanoteknoloji çevre etkileşimi

Nanoteknolojinin kullanım alanları arttıkça üretilen ürün atıkları ve üretim sırasında çıkan yan ürün atıkların miktarı da artmaktadır. Bu durum hem doğadaki canlılar hem de bu canlılardan faydalanan insanlar için önemli bir konudur. Özellikle nanopartiküllerin canlı vücuduna olan olumsuz etkileri insanlar için de tehlike arz etmektedir.

Gümüş, altın, kadmiyum nanopartikülleri gibi bazı nanopartiküller biyomagnifikasyona özelliği gösterir (Judy ve ark. 2011; Yoo-iam ve ark. 2015). Bu nanopartiküller besin zincirinde her üst basamağa geçtikçe birikimi artmakta ve besin zincirinin en üstündeki canlılarda en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bu sebeple biyomagnifikasyon özelliği gösteren nanopartiküllerin salınımına daha çok dikkat edilmelidir. Bu sebeple doğa ile buluşan nanopartiküller besin zincirinde en üst basamağa çıktıkça birikim miktarı artmakta ve etkileri daha tehlikeli olabilmektedir. Nanopartiküllerin doğaya salınımı çeşitli yollarla gerçekleşmektedir.

Şekil 1.3'te de gösterildiği gibi nanomateryallerin üretimi sırasında fabrikalarda oluşan yan ürünlerin direkt olarak doğaya salınımı gerçekleşmektedir ve bunun yanında üretilen nanopartiküllerin taşınması ve kullanımları sırasında nanomateryallerin tekrar doğaya salınımı istemsiz olarak da olsa söz konusu olmaktadır. Bu nedenle doğaya karışan nanopartiküller toprak, hava ve su aracılığı ile taşınarak kentsel alanlardan tarlalara veya doğaya taşınır. Hem suda yaşayan canlılar hem de solunum yapan canlılar ortamda bulunan nanopartiküllere direkt maruz kalmaktadır. Topraktaki nanopartiküller ise bitkisel besin olarak bitki ve hayvanlara tekrar geri dönmektedir. Doğaya salınan nanomateryaller tek hücreli canlılardan yüksek organizasyonlu canlılara kadar birçok canlı tarafından tüketilmekte ve dokularda birikime neden olmaktadır.



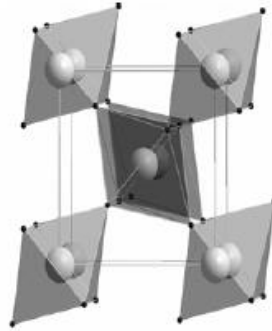
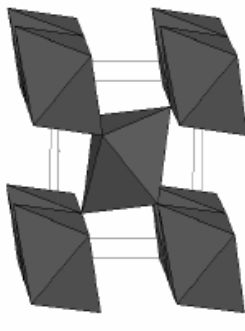
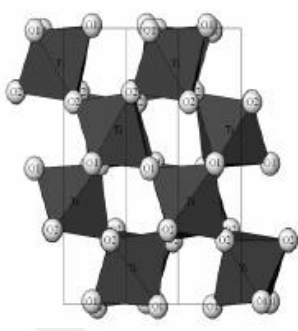
**Şekil 1.3.** Nanoteknolojinin çevre ve insanla olan etkileşimi (The Royal Society & Royal Academy of Engineering 2004'den düzenlenmiştir).

Nanomatyallerin kendilerine özgü redoks potansiyelleri (Eh) sayesinde oksitleyici özelliğine sahip olabilmektedirler. Her nanomatyeral için farklı olan bu değerler eğer hücre matrisinden yüksekse kendisini oksitleyerek reaktif oksijen üretir. Oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) etraflarındaki element ve moleküllere saldırarak elektron koparmaya çalışırlar ve bu element ve molekülleri kararsız hale sokarlar. Bu sebeple ROS üretimi hem hücren ve hem de nanomatyalin kendisi tarafından gerçekleştirilebilmekte, bu durum ise canlı organizmanın antioksidan savunma sisteminin aşırı yorulmasına ve buna bağlı olarak toksik yan etkilerin gözlemlenmesine neden olmaktadır.

## 1. 2. TiO<sub>2</sub> Nanopartikülü

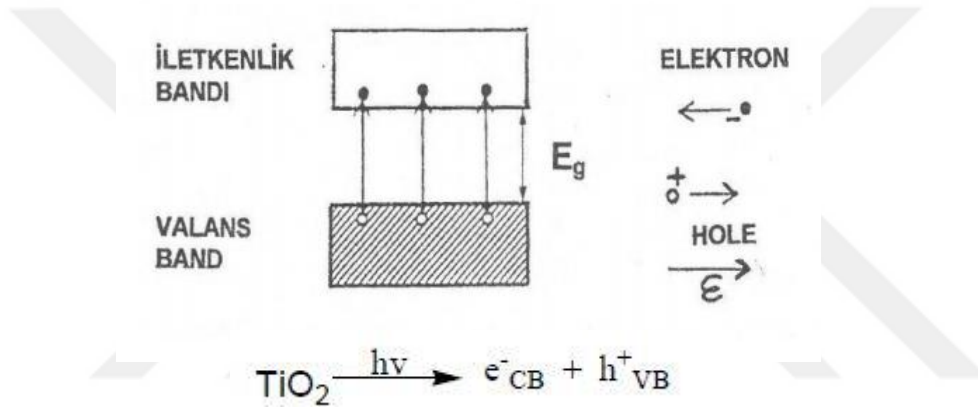
Titanyum dioksit nanopartikülleri boyları 1 ile 100 nanometre arasında değişen metal oksit nanopartiküllerdir. Boylarına göre farklı fiziksel ve kimyasal özellik gösterdiği için üç farklı yapıda gözlemlenebilir: rutil, anataz ve brokit. Bu yapısal farklılıklar Tablo 1.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo1.1.** Rutil, Anataz ve Brokit arasındaki yapısal farklılıklar

	Rutil	Anataz	Brokit
Kristal Yapısı	Tetragonal	Tetragonal	Ortorombik
Moleküler Konformasyon			
Çapı	35 nanometre ve daha büyük	11 nanometre ve daha küçük	11-35 nanometre (Watanabe ve ark. 1999)
Erime Sıcaklığı	1858°C	1825°C	1825°C (Fujishima ve ark 1991)
Yasak Bant Aralığı	3.0eV	3.2eV	- (Kumar 2013)
Absorpladığı Dalga boyu	413 nm ve daha düşük dalga boyları	388 nm ve daha düşük dalga boyları	-
pHzpc	5.9	6.3 (Kosmulski 2009)	-

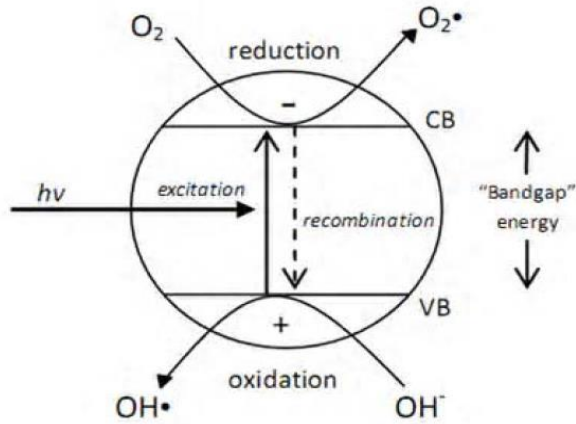
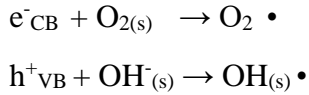


TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin en önemli özelliği fotokatalitik reaksiyon gerçekleştirebilmesidir. Fotokatalitik reaksiyon; bir katalist aracılığı ile fotonların ışık enerjisinin (hv), elektrokimyasal enerjiye transferidir. Kısaca fotokatalist, ışıktaki enerji aracılığı ile yüzeyinde güçlü oksidasyonun meydana geldiği bir yarı iletkenidir. Daha detaylı olarak ifade etmek gerekirse TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün iki bandı arasında (valans bandı ile iletkenlik bandı) belirli bir enerji farkı vardır. Güneş ışığından çıkan foton enerjisi sayesinde TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün E<sub>g</sub>'sinden (forbidden energy gap, yasak bant aralığı) daha fazla enerji kazanan elektronlar valans bandından iletkenlik bandına yükselerek serbest kalırlar ve arkalarında pozitif yüklü bir "boşluk" (hole) (h<sup>+</sup><sub>VB</sub>) bırakırlar ve böylece bir elektron-hole çifti (e<sup>-</sup><sub>CB</sub> / h<sup>+</sup><sub>VB</sub>) oluşur. Bahsedilen fotokatalitik reaksiyonun şematik gösterimi Şekil 1.4.'te verilmiştir.



**Şekil 1.4.** TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün fotokatalitik reaksiyonunun şematik görüntüsü.

Oluşan bu elektron/boşluk çiftleri, yarı iletken yüzeyinde redoks reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Valans bandında oluşan bu boşluklar, fotokatalistin yüzeyinde bulunan su ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan hidroksil radikalini (•OH) oluşturur (Şam ve ark. 2007).



**Şekil 1.5.** TiO<sub>2</sub> NP'nün uyarılması ve reaktif oksijen üretmesinin şematik gösterimi (Clemente ve ark. 2012)

TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün fotokatalitik etkisiyle oluşan singlet oksijen (O<sub>2</sub> •) ve hidroksil radikalleri (OH •) çok güçlü oksidantlardır ve birçok organik malzemeyi oksitlemek için kullanılabilirler (Şam ve ark. 2007). Hidroksil radikalleri öncelikle paylaşılmamış bir elektronu olan kararsız formdadırlar. Bu forma serbest radikaller denir. Ardından organik bileşiklerle reaksiyona girerler. Eğer ortamda oksijen bulunuyorsa oksijen molekülleri serbest radikallerle reaksiyona girerek organik peroksit radikalleri (RO-OH) oluştururlar. Bu zincir reaksiyonlar kısa bir süre içerisinde organik bileşikleri tamamen parçalayarak CO<sub>2</sub> ve suya çevirirler (Fujishima ve ark. 1999). Çeşitli oksitlenme basamakları nedeniyle dokular işlevlerini yerine getiremez. Bu olayların sonucunda tümörleşme veya hücre ölümleri ortaya çıkabilmektedir.

TiO<sub>2</sub>'nin reaktif oksijen türleri üretmesi bazı alanlarda avantaj sağlarken canlılık için büyük bir tehlike olmaktadır. Yakın zamanda IARC (International Agency for Research on Cancer) TiO<sub>2</sub>'i insanlar için olası kanserojen riski (grup 2B) sınıfına koymuştur (Baan ve ark 2006). Ekstraselüler ve intraselüler alanda üretilen radikal türler ortamda ROS bileşenlerinin artmasına ve buna bağlı olarak antioksidan cevaplarının yetersizliğine ve hücrede ROS bileşenlerinin konsantrasyonlarının artmasına neden olmaktadır.

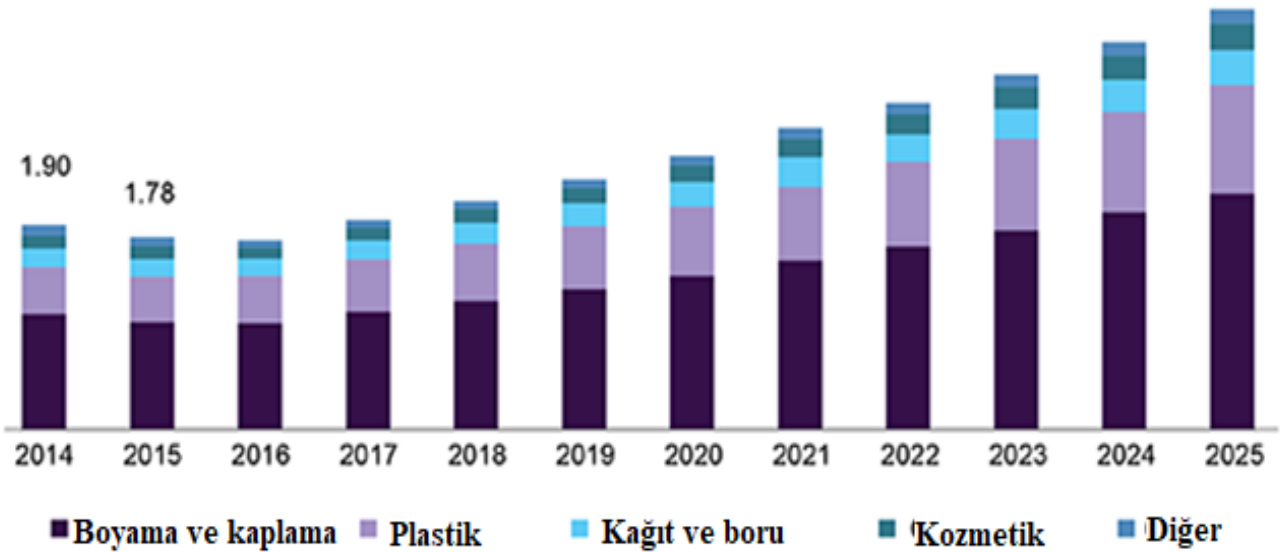
Oluşan redüksiyon reaksiyonlarının derecesi ve miktarı çeşitli parametrelere göre değişebilmektedir: Doğal ortamlarda suda bulunan organik ve inorganik maddeler ışığı adsorplayarak ışığın farklı dalga boylarında dağılmasını sağlar (Kirk 1994). Bu sebeple doğal ortamlarda TiO<sub>2</sub>'nin fotokatalizleme şiddeti ortamın turbidite derecesine göre değişkenlik gösterebilmektedir. TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin etki derecesi aynı zamanda çözücünün içinde çözünme miktarı ile de doğrudan ilişkilidir. TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri genellikle su, klorik asit, nitrik asit, etanolde çözünmezken konsantre ve ısıtılmış sülfürik, hidrojen florit, ve alkalın gibi ortamlarda çözünebilmektedir (NRC 1999). Eğer çözücünün içinde agregat oluşumu gözlemlenirse nanopartiküller olduğundan daha büyük bir parçacık olarak hareket edecek, yüzey alanının hacmi azalacak ve kendine özgü olan fiziksel-kimyasal özellikleri gösteremeyecektir. Bu sebeple TiO<sub>2</sub> partiküllerinin çözünme miktarı önemlidir. Çözünürlükleri partiküllerin büyüklüklerine, ortamın pH'ına ve çözücüde kalma süresine göre değişebilmektedir. Farklı boyutlardaki TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin çözünürlükleri kıyaslandığında en küçük boyutlara sahip olan (<5nm) TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin çözücüde daha uzun süre çözünebildiği ve stabil kalabildiği görülmüştür (Schimit ve Vogelsberger 2009). Aynı zamanda pH'a bağlı olarak çözünürlükleri kıyaslandığında düşük ve yüksek pH değerlerinde çözünürlük artarken pH'ın nötr olduğu durumlarda çözünürlüğü de azalmaktadır.

Her molekülün olduğu gibi TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün de belirli bir pH noktasında elektrik yükü sıfır (zero point of charge) olmaktadır. Bu pH noktasına kısaca pHzpc denmektedir. pHzpc, parçacığın eşit sayıda pozitif ve negatif yüke sahip olduğu pH değeridir. Bu pH'a ulaşıldığında, parçacıklar elektrik alanının varlığında hareket etmeyi durdururlar.

Farklı pH noktalarında farklı fizikokimyasal etkiler göstermesi ve farklı çözüncülerde farklı verimler göstermesi gibi çeşitli farklılıklar TiO<sub>2</sub> NP'nün farklı alanlarda kullanılmasını sağlamaktadır.

### 1. 2. 1. TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün kullanım alanları

19. yüzyıldan önce beyaz boya pigmenti olarak kurşun-oksit kullanılmaktaydı. Ancak ilerleyen dönemlerde kurşun-oksitin toksik özelliğinin keşfedilmesi yeni materyal arayışını da beraberinde getirmiştir. TiO<sub>2</sub>'in gözle görülür ışığı etkin biçimde dağıtma özelliği yani görünür bölge spektrumunda kırılma özelliği keşfedildikten sonra boya imalatında kullanılmaya başlanmıştır (Greenwood 1984). Bu yenilik TiO<sub>2</sub>'in endüstriyel önemini arttırmıştır. 20. Yüzyıldan sonra toplam boya üretiminin %51'i TiO<sub>2</sub> metali ile karşılanmaktadır ve bu üretimin %19'u plastik ürünler, %17'si ise kâğıt ürünler üzerinden olmaktadır (Mert 2006).



Şekil 1.6. Geçmiş verilere dayanarak 2025 yılında kadar tahmini TiO<sub>2</sub> kullanım alanları (TiO<sub>2</sub> Endüstriyel Raporu 2019-2025)

Şekil 1.6.'da A.B.D.'nde şuan ki kullanım temel alınarak gelecek yıllar için ortalama kullanım miktarları verilmiştir. Grafiğe bakıldığında her senenin bir önceki seneye göre daha fazla üretim hacmine sahip olduğu ve buna bağlı olarak da atık formunda doğaya dönecek TiO<sub>2</sub> NP miktarının arttığı gözlemlenmektedir. Bu durum da TiO<sub>2</sub> NP'nün etkisinin her geçen sene

doğada daha çok hissedileceğine işaret etmektedir. Bu sebeple TiO<sub>2</sub> NP'nün kimyasal ve fiziksel özelliklerinin keşfedilmesinin ardından çeşitli toksikoloji çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu herhangi bir toksik etkinin görülmediği idda edilmiş ve gıda, eczacılık ve özellikle kozmetik; güneş kremi sektörlerinde TiO<sub>2</sub> nanopartikülü kullanılmaya başlanmıştır. Kozmetik ve güneş kreminde, bulunan içeriklerin stabilizasyonu amacıyla ve vitaminlerle birlikte antioksidantların deriye penetre etmesini kolaylaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu sayede güneşten kaynaklanan UV ışınlarının engellemesinin verimi arttırılmaktadır (Mu ve Sprando 2010). Avusturalya'da 300'den fazla güneş kremi ürününde TiO<sub>2</sub> nanopartikülü ya da CuO nanopartikülü bulunmaktadır (Australian Government, 2006). Cilt kozmetikleri üretimi için kullanılan metal oksit miktarının 2005-2010 yılları arasında 1,000 ton/yıl olduğu tahmin edilmektedir (Pitkethly 2004).

Buldukları ortamda neredeyse hiç kimyasal değişim göstermediği için ve kimyasal maddelere karşı dayanıklılığı yüksek olması nedeniyle inert biyoseramik olarak insanlarda dış implantlarında kullanılmaktadır. Aynı zamanda kontak lenslerde de renk açıcı özelliği sayesinde TiO<sub>2</sub> moleküllerinden yararlanılmaktadır (French ve ark. 2009).

Işık varlığında fotokatalitik özellik gösteren TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin ışıksız ortamda daha az reaktif oksijen türü ürettiği bilinmektedir. TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün ışık varlığında superoksit anyon radikalleri, hidrojen peroksit, bağımsız hidroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini katalizleme özelliği sayesinde bakterilere karşı sterilizasyonda kullanılmaktadır (Wei ve ark. 1994). Uygulanan TiO<sub>2</sub> NP miktarı ile bakterilerin büyüme oranları arasında ters bir ilişki olduğu da bildirilmiştir (Adams ve ark. 2006).

TiO<sub>2</sub> NP'in bilinen fotokatalitik oksitleme özelliğinin yanı sıra bir diğer özelliği de ışık etkisi ile yüzeyinin süperhidrofilik özellik kazanmasıdır. TiO<sub>2</sub> NP'nün bu özelliği, buğulanmayan ve kendi kendisini temizleyebilen yüzeyler ve camlar elde edilmesini sağlamaktadır (Wang ve ark. 1997). Aynı zamanda yol, tünel ve kaldırımlarda kullanılan çimento ve asfaltın içine konulan TiO<sub>2</sub> nanopartikülü hava temizleme ve havadaki azotoksit ve türevlerinin (NO<sub>x</sub>) oranını azaltma işlevi gerçekleştirmektedir (Chen ve Poon 2009).

Ayrıca ışığı çok iyi kırma özelliği ve reaktif oksijen üretebilmesi nedeniyle silikonlu güneş pillerinde, yansımayı engellemesi nedeniyle de ince film optik aletlerde kullanılır (Mert 2006).

2002 yılında TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün üretim kapasitesinin 4.6 milyon ton olduğu tahmin edilmektedir (Winkler, 2003). Önümüzdeki 10 yıl içinde TiO<sub>2</sub> nanopartikülü içeren 2 milyon ile 6 milyon ton arasında ürünün ise doğaya karışacağı (Robichaud ve ark. 2009) tahmin edilmektedir. TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin kullanımının gittikçe artması doğaya geri dönen miktarın artmasına ve buna bağlı olarak da ekolojik riskleri konusunda da çeşitli endişelere neden olmaktadır. Müller ve Nowack (2008)'in bildirdiğine göre TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün havadaki konsantrasyonunun 0.0015µg/m, sudaki konsantrasyonunun 3.07µg/L ve topraktaki konsantrasyonunun 0.4µg/kg olduğu tahmin edilmektedir.

### **1. 2. 2. TiO<sub>2</sub> NP toksikolojisi**

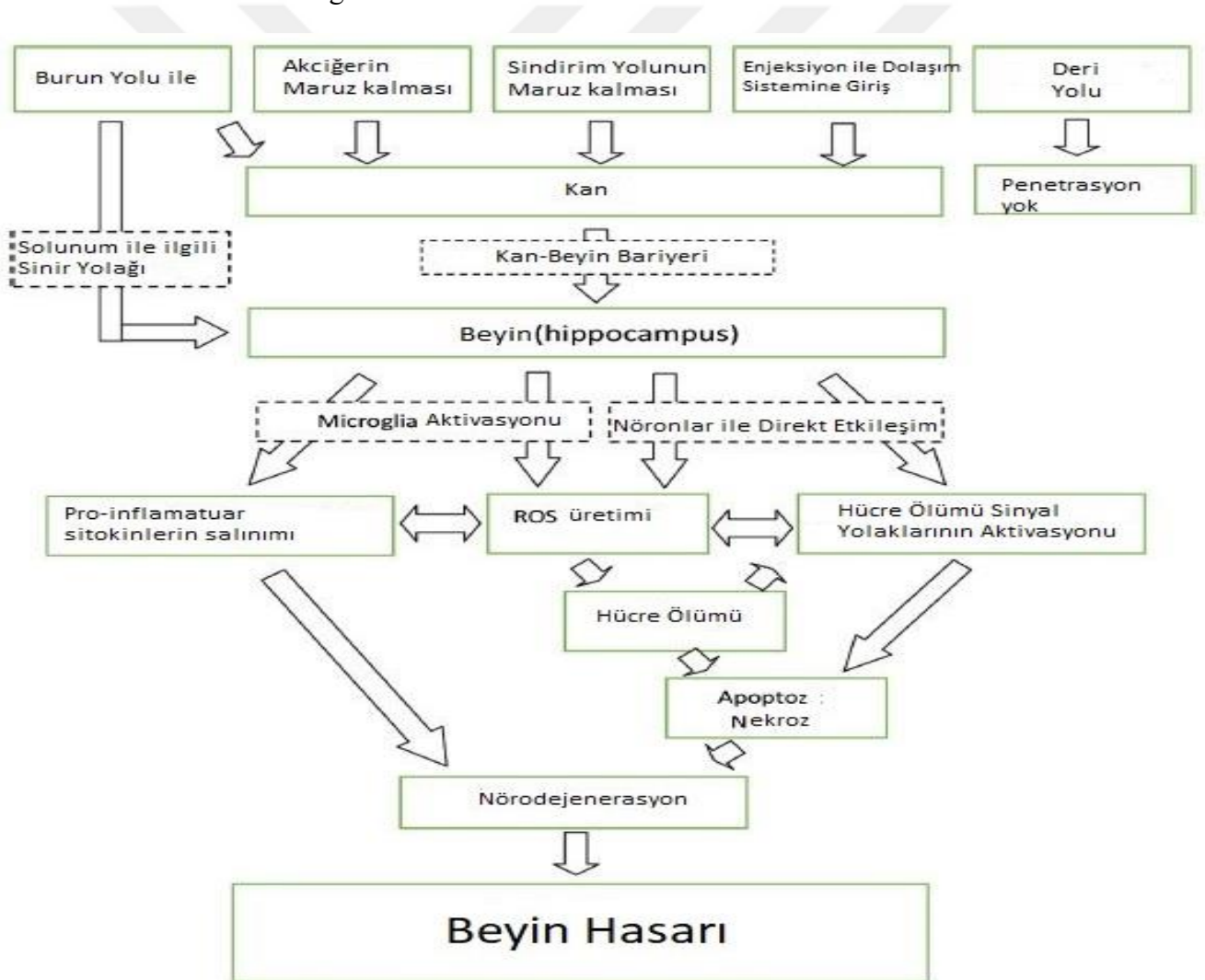
TiO<sub>2</sub> NP'nün endüstri, sağlık ve kozmetik alanlarda yoğun kullanımı nedeniyle risk değerlendirme çalışmalarının özellikle memeliler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Birçok çalışmada farelerde kronik akciğer inflamatuvar oluşumu gözlemlenmiştir (Oberdörster ve ark. 1992). Memeli çalışmaları solunum yoluyla vücuda alınan TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin akciğer dokusunda biriktiği ve bu sebeple inflamatuvar cevap geliştirmesine sebep olduğunu ve bununla beraber akciğerde nötrofil oranında yükselme ve dokuda patolojik değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir (Osier ve Oberdörster, 1997; Oberdörster ve ark. 2000; Bermudez ve ark, 2004; Warheit ve ark. 2005).

TiO<sub>2</sub>'in diş macunu, ağız pastili gibi ürünlerde kullanılması ve ilaç taşınması gibi farmakolojik alanlarda kullanılması TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün gastrointestinal emilim ile herhangi bir toksik yangı oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Farelerle yapılan deneyde TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün beyindeki konsantrasyonu önemli derece artmıştır (Wang ve ark. 2007). Ancak daha sonra yapılan araştırmalar TiO<sub>2</sub>'in birikiminin en düşük olduğu yolağın beslenme ile alından yolağın olduğu ortaya konmuştur. Bu durum nanopartiküllerin bağırsaklardan geri emilim oranının az olması ile açıklamaktadırlar (Cho ve ark. 2013).

Kan-beyin bariyerinden fagositler aracılığı ile 60-120 nm boyutundaki parçacıkların geçebilmesi, nanopartiküllerin beyine ulaşabilmesini mümkün kılmaktadır. Beyindeki sinir hücrelerinde bulunan lipitler reaktif oksijen türlerinin hücumuna uğrayarak lipit peroksidasyonu yoluna gitmeye daha yatkındırlar. Bu durum ise nöronların fizyolojik fonksiyon bozukluğuna ve beynin oksidatif hasar görmesine neden olmaktadır (Matés 2000). Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada nano boyutlu TiO<sub>2</sub> partiküllerinin sadece beyindeki Mikroglia hücrelerini uyarak reaktif oksijen türlerinin üretilmesine sebep olmakla kalmayıp aynı zamanda mitokondrial enerji üretimine de müdahale ettiği ortaya çıkmıştır (Long ve ark.

2006). ). *In vitro* ortamda yapılan birçok çalışma da TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün sinir hücreleri için sitotoksik olduğunu ve apoptozu arttırdığı sonucuna ulaşmıştır. İnsan ve farelerin glia hücreleri, insan astrosit hücreleri, fare adrenal medulla hücreleri (PC12) gibi birçok sinir hücresiyle *in vitro* yapılan çalışmaların çoğunda apoptozda artış, nükleusun daralması, anormal nükleer membran ve kromatin marjinalizasyonu, mitokondrial şişme gibi sistotoksik ve genotoksik gelişmeler ortaya konmuştur (Marquez-Ramirez ve ark.2012; Sheng ve ark. 2015).

TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin aynı zamanda nörotransmitterlerin salınımını da etkiledikleri gözlemlenmiştir. Farelerin vücutlarında biriken TiO<sub>2</sub> miktarı vertebralarda en uyarıcı nörotransmitter olan glutamat metabolizmasında aksamalara neden olmaktadır (Ze ve ark 2016). Şekil 1.7.'de yukarıda paragraflar şeklinde anlatılan gibi TiO<sub>2</sub> NP'nün merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisi gösterilmektedir.



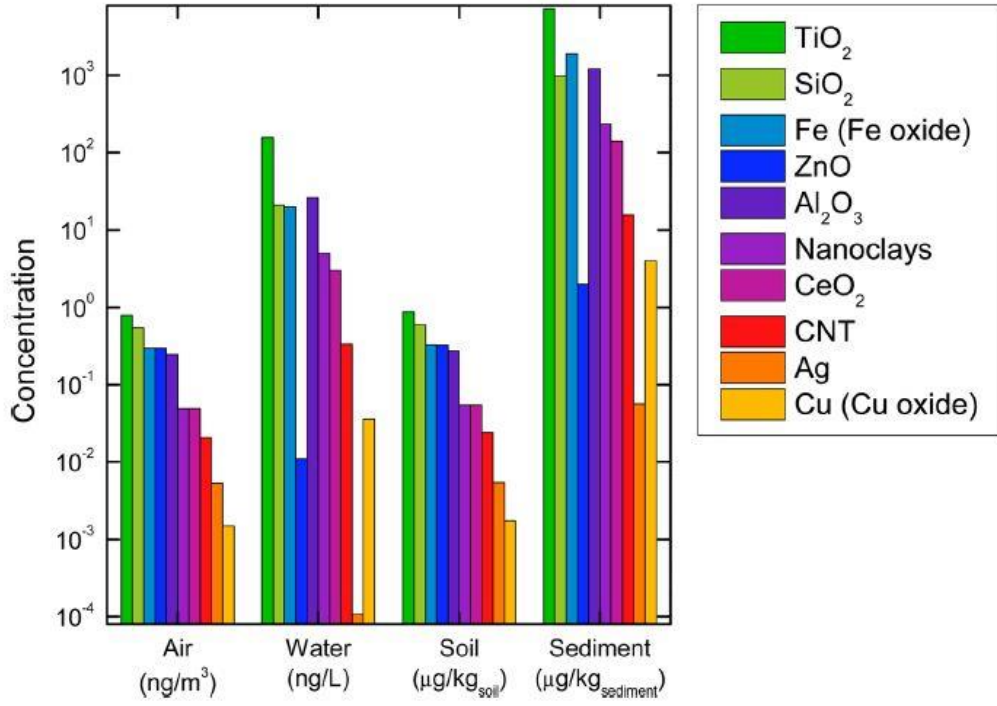
**Şekil 1.7.** TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün vücuda olası giriş yolları ve merkezi sinir sistemi üzerinde yaptığı hasarın mekanizması (Czajka ve ark. 2015'den düzenlenmiştir).

TiO<sub>2</sub> NP immün sistemde de çeşitli yangılar oluşturmaktadır. Canlıda pro-inflamatuar cevap oluşturduğu insan endotel hücrelerinde gözlemlenmiştir (Driscoll ve ark. 1997). TiO<sub>2</sub> NP'nün UV altında reaktif oksijen türleri üretmesinin yanı sıra UV yokluğunda da gerçekleşmesi dikkat çekicidir (Peters ve ark. 2004).

İnsan ve memeli hücreleri ile *in vitro* yapılan çalışmalarda, ışık varlığında TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin DNA üzerinde çeşitli etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle fotokataliz etkisi sebebiyle DNA'da zincir bozulmalarına sebep olabileceği düşünülmektedir. 10nm çapındaki TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri ile yapılan çalışmada partiküllerin DNA'nın fosfat grubuna bağlandığı gözlemlenmiştir (Zhu ve ark. 2007). Lenfoblastoid hücrelerinde TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün mikronükleus oluşumunu 2,5 kat arttırdığı ve DNA'da oluşan tek zincir kırıklarının oluşma sıklığının 5 katına çıkardığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark. 2007).

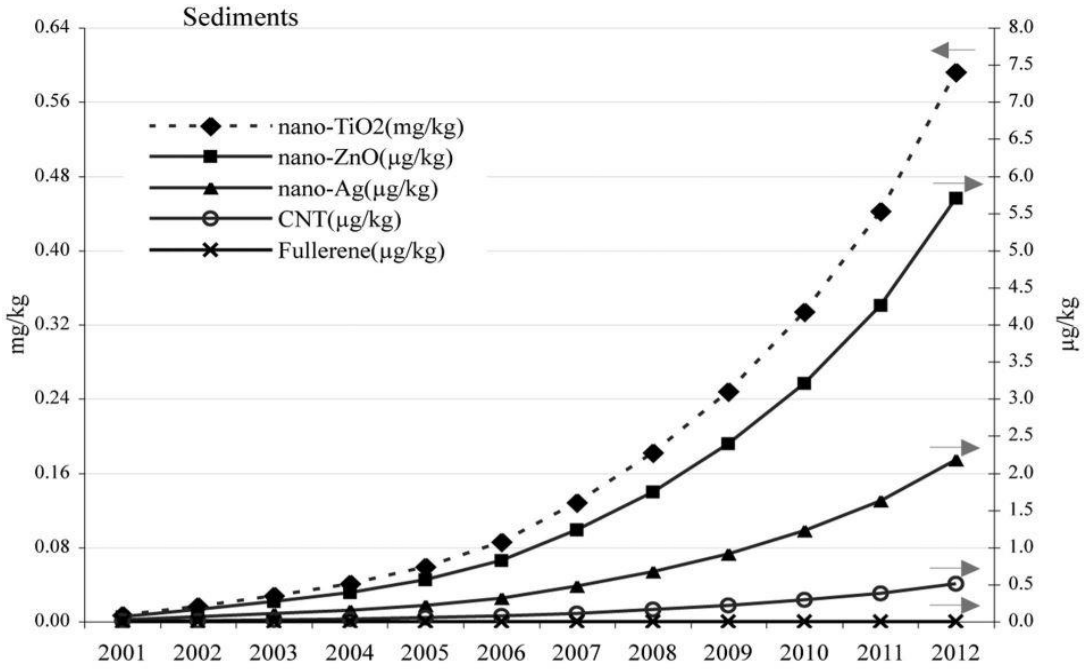
Nanomateriyallerin kontrolsüz bir şekilde doğaya salınımı başlıca su sistemleri üzerinden olmaktadır. Özellikle nanopartiküllerin kullanıldığı ürünlerin imalatını yapan sanayi tesisleri ve popülasyonun yoğun olduğu şehirlerde biriken atıkların açık su sistemlerine dökülmesi denizel sistemlere nanopartikül yüklemesi ile sonuçlanmaktadır. Örneğin İsviçre'de şehir atıklarının toplandığı atık sularında Ti konsantrasyonu 16µg/L olarak ölçülmüştür (Kaegi ve ark. 2008).

Su canlılarının vücutlarına giren nanopartiküller, hem çeşitli dokularda birikerek hem çeşitli yolların aktivasyonuna zarar vererek hem de ürettiği reaktif oksijen türleri ile canlıların iç dengesini bozarak toksik etki yarattığı bilinmektedir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada bazı nanomateriyallerin (nano TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, karbon nanotüp ve fullerene) A.B.D, Avrupa ve İsviçre'de toprak ve sedimentteki miktarları ölçülmüş ve TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün 3 bölgede de en çok konsantrasyona sahip olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada bir yıl içinde tahmin edilen birikim miktarları karşılaştırıldığında yüzey suyu için 0.085µg/L, sediment için 2382µg/kg.y, hava için 0.003µg/m<sup>3</sup> ve toprak için 2.13µg/kg.y'dir (Gottschalk ve ark. 2009). Özellikle atık su arıtma tesislerinde biriken TiO<sub>2</sub> NP'nün bertaraf edilme yöntemleri sucul ekosistem için hayati özellik taşımaktadır. Atık su tesislerinde TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin modellenen konsantrasyonu 1,2mg/L'ye kadar çıkmıştır. (Gottschalk ve ark. 2013). Aynı zamanda 2011 yılında Avrupa denizlerinin yüzey suyundaki TiO<sub>2</sub> değerinin 0.1 ile 16 µg/L arasında olduğu tahmin edilmektedir (Johnson ve ark. 2011).



**Şekil 1.8.** Los Angeles Bölgesinde 1 yıllık simülasyon ile elde edilen nanopartikül değerleri. (Liu ve Cohen 2014 makalesinden düzenlenmiştir.)

Şekil 1.8.'de de görüldüğü gibi çeşitli nanopartiküllerle kıyaslandığında TiO<sub>2</sub> NP'nün doğada bulunma miktarının üretimi ile bağlantılı olarak en yüksek olduğu görülmektedir. Özellikle su ve sedimentteki miktarının toprak ve havada bulunma miktarından daha fazla olması TiO<sub>2</sub> NP'nün toksisite tehlikesinden en çok akutaiik canlıların etkileneceği öngörülebilir.



**Şekil 1.9.** Amerika Birleşik Devletleri'nde çeşitli nanopartiküllerin 2001-2012 yılları arasında sedimentteki miktarındaki artış. (Gottschalk ve ark. 2013)



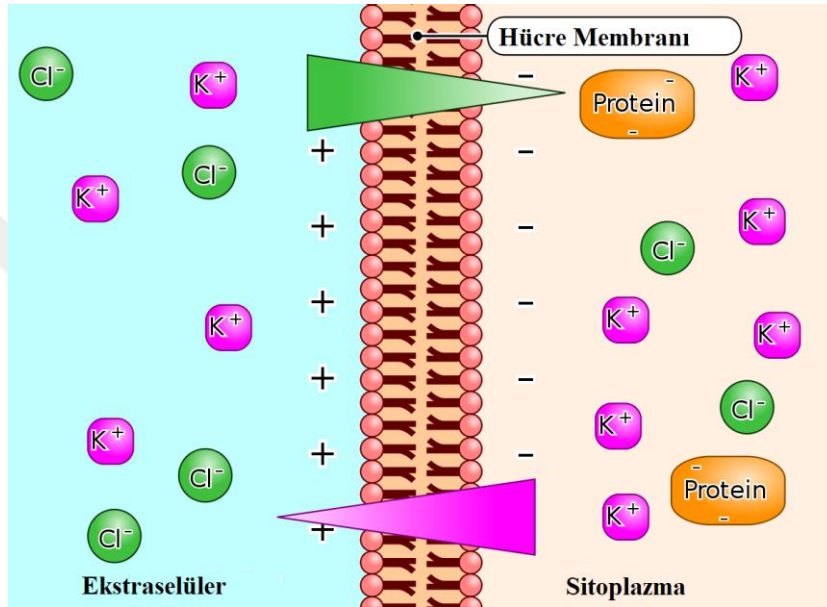
Şekil 1.9.'da Amerika Birleşik Devletleri'nde 2001 ile 2012 yılları arasında TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün çeşitli nanopartiküllerle kıyaslandığında sedimentte bulunma miktarının gösterilen grafik incelendiğinde TiO<sub>2</sub> NP'nün miligram cinsinden verilmesi ancak diğer nanopartiküllerin mikrogram cinsinden verilmesi dikkat çekicidir. Ayrıca TiO<sub>2</sub> NP'nün sedimentte bulunma oranının diğer nanopartiküllerle kıyaslandığında ilerleyen yıllardaki bulunma miktarındaki artışın daha fazla olduğu da görülmektedir. Bu da TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün ekolojik hayat ve canlılık için gittikçe daha büyük bir tehdit oluşturduğunu göstermektedir.

Deniz ve tatlısu sistemlerinde suyun içinde bulunan TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri sonikasyonla çözünebildiği gibi birkaç saat sonra suyun zemininde çökelti oluşturmaya meyillidirler. Bu sebeple başta midye, deniz salyangozu gibi deniz omurgalıları ve dip balıkları gibi bentik zonda yaşayan canlılar için toksik etkisinin daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir.

Akuatik ekosistemin bir parçası olan midyeler filtrasyonla beslenirler. 6µm'den büyük partikülleri %90 verimle yakalayan bu sistem daha küçük partikülleri yakalama oranı gittikçe düşmektedir (Riisgård 1988). 1µm'den daha küçük partikülleri ise çoğu türün yakalama verimi %15'in altındadır (Ward ve Shumway 2004). Bütün bu sınırlamalar göz önünde bulunduğunda bivalv sınıfının nanopartikül toksikolojisi yönünden düşük risk grubunda olduğu söylenebilir. Ancak nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri çok hızlı bir şekilde değişebildiği gibi agregat oluşturmaya ve kümelenmeye yatkın partiküllerdir. Özellikle tuzlu sudaki yüksek iyonik bağ yapma kapasitesi nanopartiküllerin çok daha büyük partiküllere dönüşmesine sebep olmaktadır (Keller ve ark. 2010). Agrage olan nanopartiküller diğer büyük toksik maddeler gibi fonksiyon göstererek midyenin vücudunda birikime neden olmakta ve belirli organlarına zarar vermektedir. Yapılan çalışmalarda TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün sindirim kesesi ve solungaçlarda reaktif oksijen türleri ürettiği çeşitli çalışmalarla gözlemlenmiştir (Zhu ve ark. 2011). Bunun sonucunda antioksidant savunma sistemi hedef dokulardaki reaktif oksijen türevlerini etkisiz hale getirmeye çalışmakta, başarısız olduğu durumlarda ise dokularda dejenerasyonlar gerçekleşmektedir.

Suyu filtrasyonla vücuduna alan diğer bir canlı ise balıktır. Ancak solungaç sistemleri midyeden farklıdır. Bu da TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün balıklarda daha farklı yangılar oluşturmaya neden olmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin balık vücuduna girdikten sonra birikim yaptığı hedef organların solungaç, bağırsak, karaciğer ve beyin olduğu saptanmıştır (Handy ve ark. 2008).

Solungaçlardan çözülmüş metallerin dokuya geçişi ilgili iyon taşıma sistemleri veya hidrofobik membrandan difüzyonu ile gerçekleşmektedir (Campbell ve Stokes 1985). Metaller ve çeşitli iyonların solungaca geçişi epitelinin üzerindeki ince bir katman oluşan polianyonik mukus sayesinde. Polianyonik mukustan salınan  $\text{Cl}^-$  iyonları apikal alanda toplanarak membranın her iki tarafındaki katyon iyonlarını kendine çeker. Bu sayede elektrostatik bir denge oluşur. Oluşan bu dengeye Donnan Potansiyeli adı verilmektedir. Şekil 1.10'da Donnan potansiyelin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.10. Donnan Potansiyeli

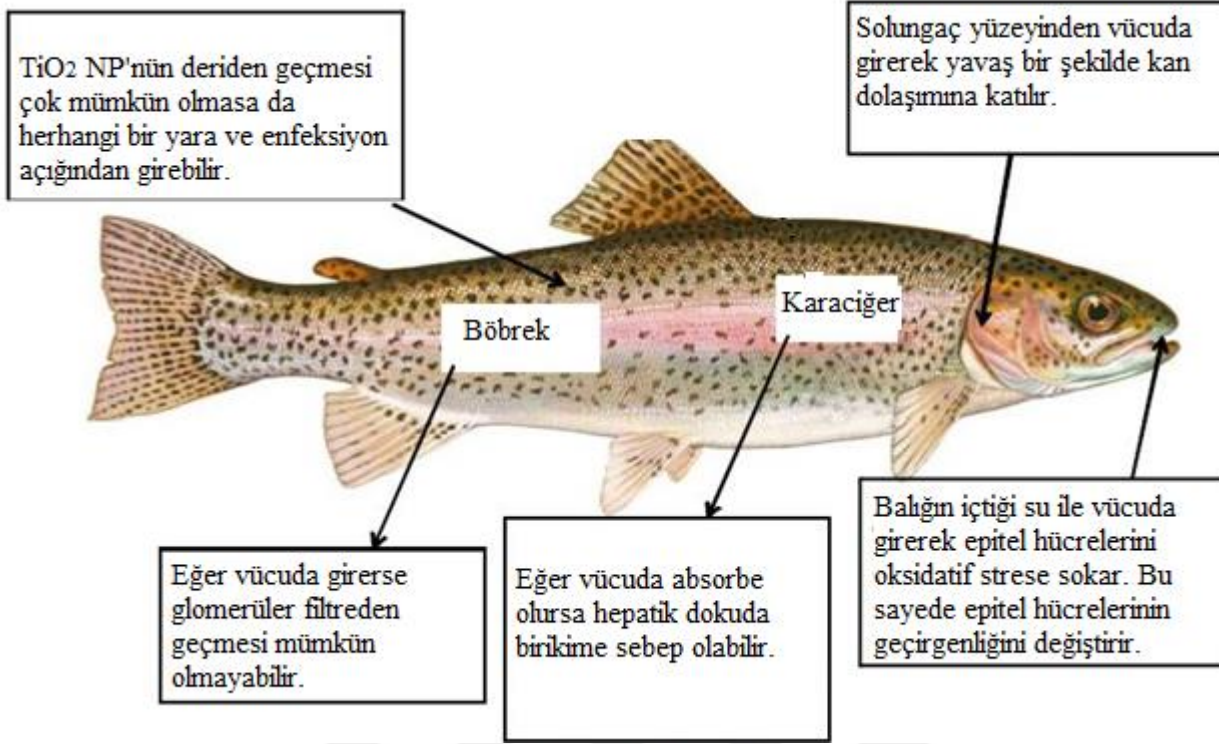
Metaller ve çeşitli iyonlar bu sayede iyon taşıyıcıları aracılığı ile hücrenin içine girerler (Handy ve ark. 2008). Ancak çözülmüş metallerin aksine nanopartiküllerin taşınması sırasında bir metal-ATPaz (örnek olarak Cu için CuATPaz) aktivitesi olmamaktadır. Bunun yerine apikal membranda partiküllerin endositozu gerçekleşmektedir (Shaw ve Handy 2011). Balıkların mukus salgısını artırarak mukuslarında bulunan mukoproteinlerin nanopartikülleri sararak toksik etkiyi azaltmaya çalışması yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Çeşitli deneylerde nanopartiküle maruz bırakılan balıkların mukus salgılamasının arttığı gözlemlenmiştir (Federici ve ark. 2007). Bu durum bir süre sonra dezavantaja dönüşmekte ve mukus salgısının yüksek ekspresyonu nedeniyle üretiminin azalmasına ve solungaçlara zarar vermesine neden olmaktadır. Ancak bu sistem sayesinde belirli bir süre için diğer dokuların nanopartikülden etkilenmesinin de önüne büyük miktarda geçilmiş olunur. Bunun sonucunda ise solungaçlarda nanopartikül agregasyonu ve birikimi gerçekleşir: Balıkların solungaç epitel yapısı memelilerdeki solunum epiteline göre daha sıkı bir yapıda olduğu için (McWilliams ve Potts

1978) nanopartiküller, hücre boşluklarından dokuya transfer olamayacak kadar büyüktürler. Sadece boyutlar göz önüne alındığında küçük moleküller ve atomlara göre nanopartiküllerin bağlanma noktalarından (gap junctions) geçişinin düşük bir ihtimal olduğu söylenebilir (Handy ve Eddy 2004). Bu bölgelerde biriken nanopartiküller fotokataliz özellikleri sayesinde kolaylıkla reaktif oksijen türleri üreterek solungaç lamellalarına zarar verebilir. Yapısal konformasyonu bozulan lamellalardan daha rahat geçebilen nanopartiküllerin vücuda girişi kolaylaşmış olur.

Hedef organlardan biri olan bağırsaklarından daha büyük molekülleri endositoz yolu ile dolaşıma kazandırabildiği için nanopartiküllerin bu yol ile vücuttaki diğer dokulara daha kolay ulaştığı düşünülmektedir (Moore 2006). Aynı zamanda hem mide hem de bağırsakta toplanarak agregat oluşturduğu da çeşitli çalışmalarca kanıtlanmıştır.

Diğer bir hedef organ olan karaciğer, metal granüllerinin toplandığı organdır (Lanno ve ark. 1987). Bu sebeple nanopartiküllerin de hepatik hücrelerde toplanması tahmin edilmekte ve çeşitli deneyler sonucunda da ortaya konmaktadır (Palaniappan ve Pramod 2011). Yapılan çeşitli histolojik gözlemler  $TiO_2$  nanopartikülüne maruz bırakılan bireylerin karaciğerlerinde sitoplazmik vakuolizasyon, apoptik hücreler ve nekrotik hücreler gibi çeşitli değişiklikler gözlemlenmektedir. Aynı zamanda yapılan biyokimyasal çalışmalar karaciğerin reaktif oksijen türlerine karşı antioksidant savunma elemanlarından olan SOD ve CAT aktivitesinin solungaç ve beyine göre 10 kat arttığı tespit edilmiştir (Hao ve ark. 2009). Bu durum karaciğerin  $TiO_2$  nanopartikülünün toksik etkisinin önüne geçebilmek için çeşitli yollarla bir yangı oluşturduğunu  $TiO_2$  nanopartikülünün ise karaciğer dokusuna patolojik etki ettiği sonucunu ortaya koymaktadır. Şekil 1.11'de  $TiO_2$  NP'nün yukarıda anlatıldığı gibi vücuda girebileceği olası organlar ve vücutta birikim ile ilgili olan organlar gösterilmektedir.

Bu çalışmaların yanında çeşitli deneyler farklı sonuçları da işaret etmektedir. Şöyle ki; bazı çalışmalarda sadece solungaçlarda birikim görülmesine rağmen (Boyle ve ark. 2013) aynı konsantrasyonla ve aynı türle yapılan diğer çalışmalarda ise karaciğer ve beyinde birikim gözlemlenmiştir (Chen ve ark. 2011A). Bunun gibi daha önce yapılan çalışmalar birbiri ile farklı sonuçlar ortaya koyduğu halde iç organların etkilenmesi dahil sub-letal toksisite etkisi birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir.



**Şekil 1.11.** TiO<sub>2</sub> NP'nün vücuda alımı ve birikimi ile ilgili olası yollar (Handy ve ark. 2008 makalesinden düzenlenmiştir.)

TiO<sub>2</sub> nanopartikülü yüzeyindeki elektriksiz potansiyel sebebiyle suda bulunan bazı metal menşeli partikülleri ve kirleticileri de kendi yapısına bağlayarak dokulara penetre olmasını kolaylaştırmaktadır. Çeşitli çalışmalar TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün arsenik, (Sun ve ark. 2009), kadmiyum (Zhang ve ark 2007), bakır ve çinko (Ramsden 2009) gibi diğer metallerle bağ kurarak kendi moleküler konformasyonuna dahil ettiğini ve bu sayede dokularda biriken ikincil metal miktarının arttığını gözlemlemişlerdir.

Balıklarda TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün beyin dokusunda birikimi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle koku duyu organının meydana getirdiği açıklık, solungaç açıklıkları ve endositoz-pinositoz yolları nanopartiküllerin beyin dokusuna ulaşmasını kolaylaştıran mekanizmalardır. Yapılan birçok toksikoloji çalışmasında beyinde Ti birikimi çeşitli yöntemlerle ortaya konmuştur. 8 hafta boyunca TiO<sub>2</sub> nanopartikülüne beslenme yolu ile maruz kalan gökkuşuğu alabalıklarında 4. haftadan itibaren beyin dokusunda nanopartikül birikmesi gözlemlenmeye başlamıştır (Ramsden ve ark. 2009). Laterizasyon ve yüzme ile ilgili becerilerde aksamalar TiO<sub>2</sub>'nin beyin dokusunda çeşitli değişikliklere yol açtığına işaret etmektedir. Yapılan çalışmalarda balıkların solunum ve yüzme frekansının arttığı ayrıca yüzme stilinde bozulmalar meydana geldiği ve yüzeye yakın bölgelerde küçük dairesel hareketler

yaptığı (Hao ve ark. 2009) gözlemlenmiş, vertikal düzlemde asılı kalma hareketleri (Simth ve ark. 2007) gibi davranışsal bozukluklar gözlemlenmiştir. Aynı zamanda beyin dokusundaki nöronlardaki apoptoz, mitokondrial şişme, kristaların kaybolması, nüklear membranda oluşan çöküntüler de TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün beyin hücrelerine zarar verdiğini göstermektedir (Sheng ve ark. 2016). Nanopartiküllerin epitel hücrelerinde reseptörleri engelleyerek koku alma duyusunda aksaklıklara neden olduğu bilinmektedir (Brog-Neczak ve Tjalve 1996). Beyinde meydana gelen bu bozukluklar davranışsal fonksiyonlar; tekrarlanan davranışsal kalıplar; yem alımı; saldırganlık; seksüel davranış; öğrenme; sirkadiyen ritim; uyuma-uyanma döngüsü; lokomotor sistemlerin olgunlaşması ve yüzme becerisi gibi fonksiyonların sekteye uğramasına neden olmuştur (Holscheneider ve ark. 2001). Hayati sistemleri düzenleyen beyindeki değişimler balıkların av-avcı ilişkisini etkileyebilmektedir. Bunun sonucu olarak da balığın popülasyonunda artma ya da azalma gözlemlenebileceği gibi bu değişim ekosistemdeki bütün canlıları etkileyecektir. Bütün bu bulgulara rağmen bazı çalışmalar TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün beyinde herhangi bir birikime sebep olmadığı da bildirilmiştir (Boyle ve ark. 2013).

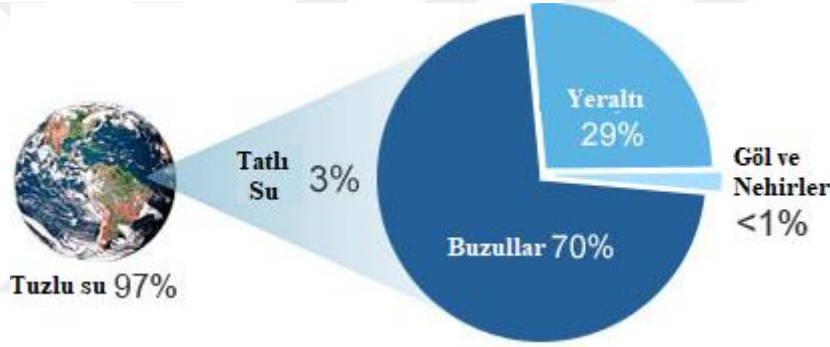
TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri immün sistemde de aksaklıklara neden olabilmektedir; şöyle ki kalsiyum iyonlarının varlığında TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri lipopolisakkaritlerle bağ yapabilmektedirler (Aswood ve ark. 2007). Bu yeteneği sayesinde bakteriler gibi immünotoksikantları taşıyarak patojen bakterileri canlının vücuduna sokabilmektedir.

TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün akuatik sistemde yaşayan canlılarda genotoksik etkilere de neden olduğu bildirilmiştir. DNA'da oluşan zararın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte DNA ve TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün direk karşılaşması durumunda TiO<sub>2</sub> NP'ü DNA'nın fosfat grubunu hedef almakta veya tamir enzimlerini inhibe ederek DNA zincirinde kırıklara yol açtığı düşünülmektedir (Hartwig 1998, Reeves ve ark. 2008). Bununla birlikte TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün ürettiği reaktif oksijen türleri de DNA hasarına sebep olan etkenlerden biri olduğu düşünülmektedir (Gurr ve ark. 2005; Veranth ve ark. 2007). Tüm bu bulgularla beraber mutageneze dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır (Zhu ve ark. 2007; Li ve ark. 2008). Ayrıca TiO<sub>2</sub>'e maruz bırakılan bireylerde ribozom strüktürü ve ribozomal aktivite ile alakalı olmak üzere 171 genin ekspresyon derecesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Griffith ve ark. 2009). Başka bir çalışmada ise bireylerin öğrenme ve hafıza ile ilişkili olan genlerinde bozukluk gözlemlenmiştir (Zheng ve ark. 2013).

TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün yüksek kullanım hacmi ve akuatik canlılardaki birikim akuatik sistemde gözlemlenen tek problem değildir. Bu probleme ek olarak küresel ısınmaya bağlı şekilde sularda artan CO<sub>2</sub> konsantrasyonları nedeniyle gelecekte dünyamızı ve akuatik canlıları yakından ilgilendirmektedir. Bu sebeple küresel ısınmanın akuatik canlılar üzerindeki etkilerinin iyice anlaşılması ve bu iki büyük problemin sinerjik etkisinin sonuçlarının tespit edilmesi akuatik ekosistemin devamı için hayati önem taşımaktadır.

## 1.2. Küresel Isınmanın Akuatik Sistem Üzerindeki Etkisi

Akuatik sistem dünyanın yüzde 71'ini kaplarken bu akuatik sistemin büyük bir bölümünü tuzlu sular; okyanus ve denizler oluşturmaktadır. Tatlısular ise yeryüzündeki su kütlesinin %0.8'ini ifade etmesine rağmen tatlısu ekosistemi tüm balık türlerinin %40'ına ev sahipliği yapmaktadır (Dudgeon ve ark. 2006). Şekil 1.12.'de dünyamızda suyun bulunma şekilleri ve yüzdeleri verilmektedir.



Şekil 1.12. Yeryüzünde suyun bulunma şekilleri.

Kapalı su sistemleri okyanuslardan farklı olarak karasal biyotik ve abiyotik sistemden daha çok etkilenmektedir. Tatlısu sistemlerine karasal sistemden yüksek miktarda karbon geçişi olmaktadır. Genel anlamda tatlısularda total CO<sub>2</sub> miktarını etkileyen temel faktörler;

1. Suyun kaynağı (yeraltı, boşaltım alanı vs.)
2. CO<sub>2</sub>'in tatlısuda kalma süresi, gaz transfer hızı (CO<sub>2</sub>'in sudan atmosfere buharlaşması ve tekrar suda çözünme hızı)
3. Su kütlesinin altında yatan jeoloji
4. Heterotrof ve ototrof aktivite arasındaki denge

Yaşayan organizmaların, organik materyallerin dekompozisyonu akuatik sistemi DOC (çözünmüş organik karbon) ile akuatik canlıların solunumu (karbonik asit - H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bikarbonat - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, karbonat - CO<sub>3</sub>, karbondioksit - CO<sub>2</sub>) akuatik sistemi çözünmüş inorganik karbon

(DIC) ile doymuş hale getirebilmektedir. Bu durum ise sucul sistemi atmosferdeki CO<sub>2</sub> değerlerinin üzerine çıkartır ve sistem net heterotrof (CO<sub>2</sub> üreten) pozisyona gelebilir (Sobek ve ark. 2003).

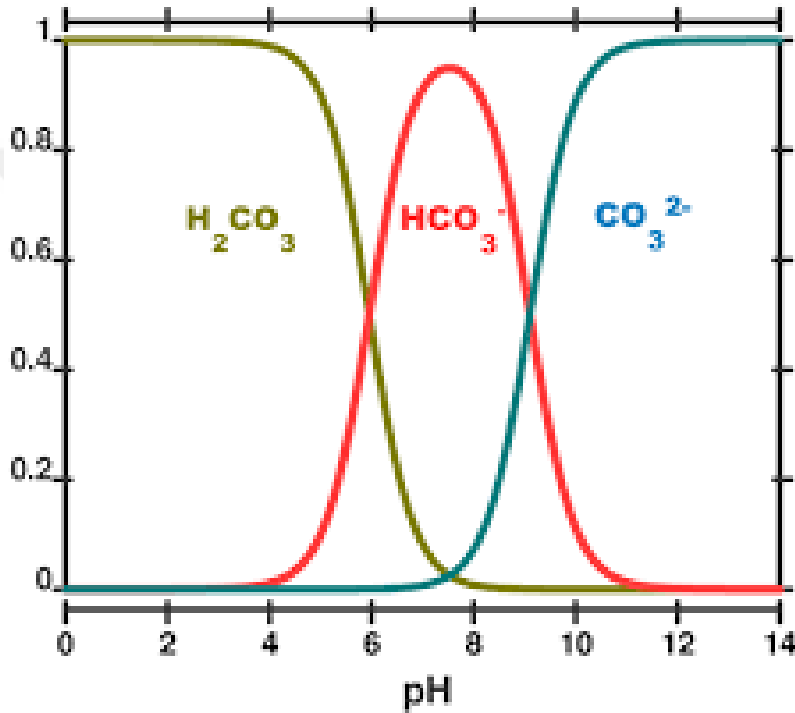
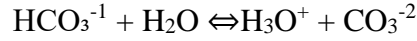
Tarımsal uygulamalar daha fazla karbonun tatlısu sistemlerine taşınmasına neden olur. Bu durum tatlısudaki kararsız karbon miktarını %30'dan %70'e çıkartmaktadır (Beyer ve ark. 1993). Bunla beraber tatlısuların bulunduğu bölgeye bağlı olarak yapraklarını döken bitkilerin miktarı ve çayır alanları gibi arazi özellikleri de tatlısulardaki CO<sub>2</sub> miktarını etkilemektedir. Kalsiyumca zengin bölgedeki tatlısularda CO<sub>2</sub> hızlıca CaCO<sub>3</sub> dönüştüğünden bu bölgelerde CO<sub>2</sub> miktarının düşük olması beklenmektedir.

Biyotik ve abiyotik faktörlerin etkileşmeleri ve karmaşıklığı nedeniyle tatlısulardaki CO<sub>2</sub> miktarı günlük, sezonluk dalgalanmalar gösterebildiği gibi atmosferdeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile kendi konsantrasyonu arasında da büyük çeşitlilik göstermektedir. Küresel çapta göllerle yapılan bir çalışmada tatlısularda bulunan CO<sub>2</sub> konsantrasyonları bulunduğu çevredeki CO<sub>2</sub> miktarının 1/3'ü ile 3 kat fazlası arasında değiştiği görülmüştür (Cole ve ark. 2007). 6,708 akarsu ve ırmak arasındaki örneklerin %95'inin CO<sub>2</sub> konsantrasyon miktarı atmosferik CO<sub>2</sub> miktarından yüksek çıkmıştır. Değerlendirilen 6,708 tatlısu sisteminin CO<sub>2</sub> konsantrasyon medyan değeri 2.300 µatm, ortalaması ise 3,100 µatm olarak belirlenmiştir (Raymond 2013). Özellikle lotik sistemlerde atmosferik değerlerin 10-15 katı yüksek değerlere çıkabilmektedir (Amazon River - Richey ve ark. 1980, Ottawa River – Telmer & Veizer 1999).

Sulardaki CO<sub>2</sub> miktarını etkileyen biyotik faktörlerin yanında 19. yüzyılın başlarında gerçekleşen Endistüriyel Devrim ve fosil yakıtlar ile yükselen karbon kullanımı da bu miktarı etkileyen en önemli abiyotik faktördür. Öyle ki havadaki CO<sub>2</sub> miktarı günümüzde en yüksek seviyeye ulaşmaktadır: Sanayi Devrimi başlangıçlarında atmosferdeki CO<sub>2</sub> miktarı 280 ppm iken günümüzde bu değer 405 ppm'e ulaşmıştır. Eğer CO<sub>2</sub> salınım ivmesi değişmezse bu yüzyılın sonunda atmosferik CO<sub>2</sub>'in 730-1020 ppm değerlerine ulaşması beklenmektedir (Raupach ve ark. 2007). Eğer havadaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu yüksek ise havadan suya, okyanustaki konsantrasyonu yüksekse sudan havaya CO<sub>2</sub> geçişi gözlemlenmektedir. Buna bağlı olarak bu yüzyılın sonunda okyanus pH'ı şuan ki değerlere kıyasla 0.3-0.4 birim düşecektir. 2300 yılında okyanus pH'ının 0.77 birim düşerek 7.6 değerlerinde olması ve sudaki CO<sub>2</sub>'in kısmi basıncının 1721µatm olması beklenmektedir (Caldeira ve Wickett 2005)

Küresel ısınma nedeniyle atmosferik CO<sub>2</sub>'in yükselmesi tatlı sularda karbonik asit (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) oluşumuna sebep olmaktadır. Karbonik asit ise bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ve hidronyum

( $\text{HCO}_3^-$ ) iyonlarına dönüşerek hidrojen iyonlarının salınmasına neden olmaktadır Şekil 1.13'te de görüldüğü üzere bu iyonların bulunma yoğunluğunun miktarı suyun pH derecesine göre değişiklik göstermektedir. Bazık sular daha yüksek miktarda  $\text{CO}_3^{2-}$  bulundururken asidik sular ise daha çok  $\text{H}_2\text{CO}_3$  bulundururlar (Wetzel 2001). Bu durum da küresel ısınma ile suyun kimyasal özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır.



**Şekil 1.13.** Farklı pH değerlerinde karbonun bulunma şekilleri

Denizlerde küresel ısınmaya bağlı olarak artan  $\text{CO}_2$  konsantrasyonu ve beraberinde pH'ın düşmesi bu ortamda yaşayan canlılığı farklı şekillerde etkilemektedir.  $\text{CO}_2$  ve pH değerlerinin değişmesi, türler içindeki bireysel etkilerin yansira komünite özelliklerini, varyasyonunu da etkilemekte ve buna bağlı olarak popülasyon ve ekosistemde de değişiklikler meydana getirmektedir. Küresel ısınmanın denizel beslenme ağı, nutrient döngüsü ve verimlilik üzerinde de büyük etkisi bulunmaktadır.

### 1.2.1. Yüksek $\text{CO}_2$ 'in akuatik canlılar üzerindeki etkisi

Yükselen  $\text{CO}_2$ 'e bağlı olarak düşen pH değeri en başta aragonit ve kalsitin maddelerinin doymuşluk oranını düşürür. Bu durum mollusk (Munday 2011), ekinoderm (Gazeau ve ark. 2007) gibi kalsifiye olan türlerin kalsifikasyon oranının düşmesine neden olmaktadır. Bu

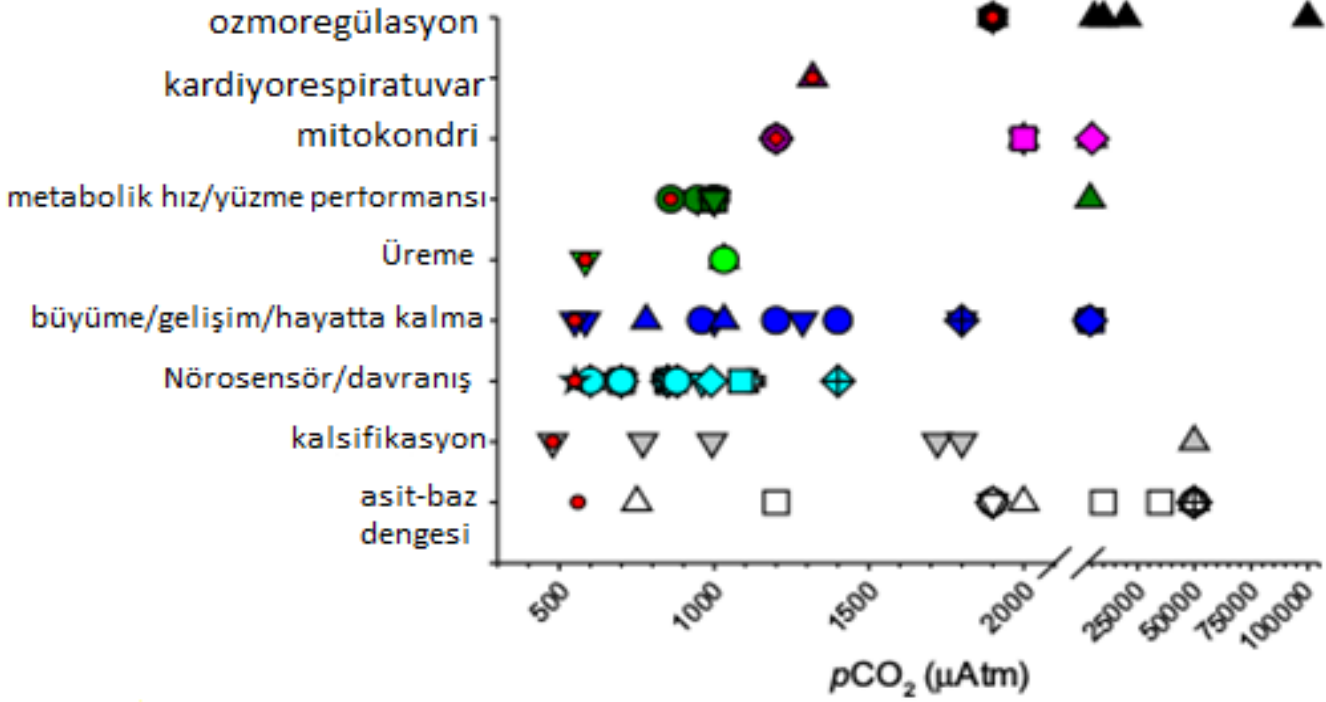


durumun büyüme oranında azalma ve hayatta kalma oranında azalma ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Yüksek CO<sub>2</sub> denizel yumuşakçalarda hareket yeteneği ve aktivite miktarını da etkilemektedir. Yüksek CO<sub>2</sub> değerlerinde yetişen yumuşakçaların hareketsiz şekilde daha fazla zaman harcadığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde yüksek CO<sub>2</sub> değerlerinde bireylerde yemek arama ve av ile baş etme becerisinde düşüş gözlemlenmiştir (Queiros ve ark. 2015). Anti-predatör davranışlar, beyindeki GABA<sub>A</sub> reseptörünün etkilenmesinden dolayı engellenmiştir. Protein sentezi, hücresel strese karşı oluşan tepki, enerji üretimi gibi hücre içi proseslerin de negatif etkilendiği bilinmektedir (Hasler ve ark. 2016).

Balıklar da diğer su canlıları gibi suyun filtrasyonu ile oksijen ihtiyacını karşılamaktadır. Bu sebeple yüksek CO<sub>2</sub>'in etkileri diğer canlılarda olduğu gibi vücut içi yapılarda hissedilmektedir. Ancak balıklar daha kompleks canlılar olduğu için yüksek CO<sub>2</sub>'in etkileri daha farklı olmaktadır. Bu sebeple balığın sağlıklı bir hayat sürmesi suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile yakından ilişkilidir. Suda gerçekleşen herhangi bir fiziksel ve kimyasal değişiklik solungaçlar sayesinde vücut içinde hissedilmekte ve sistemleri etkilemektedir. Ancak yukarıda anlatıldığı gibi tatlısu sistemlerinde CO<sub>2</sub> miktarının değişimleri sürekli yaşandığı için balıkların 2000µatm CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının altındaki CO<sub>2</sub> değerlerine toleransı olduğunu söylenebilir (Heuer ve Grosell 2014).

CO<sub>2</sub>'in denizel canlılar üzerindeki etkileri beş ana kategoride incelenebilir. Bu kategoriler ise;

- A. Asit-baz dengesi
- B. Metabolizma
- C. Büyüme ve Gelişim
- D. Nörosensör Sistemler
- E. Kalsifikasyon



- |                                    |                                     |  |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| △ kan asit-baz değerleri (3)       | ▲ hayatta kalma becerisi (2)        | ▲ enzimatik aktivite (2)                     |
| ▽ Hücre içi pH (1)                 | ▽ büyüme (6)                        | ▽ mitokondrial solunum (1)                   |
| ○ bağırsaklardan baz boşaltımı (2) | ● gelişim (4)                       | ● gen ekspresyonu (1)                        |
| □ gen ekspresyonu (3)              | ■ RNA:DNA (1)                       | ■ membran struktürü (1)                      |
| ◇ karbonik anhidraz (2)            | ◆ lipid miktarı (1)                 | ◆ anaerobik metabolizma ile ilgili kanıt (1) |
| ⊕ branşiyol asit boşaltımı (1)     | ◆ doku hasarı (1)                   | ◆ amino asit metabolizması (1)               |
| ▲ bağırsak CaCO <sub>3</sub> (1)   | ▲ üretim (1)                        | ▲ branşiyal gen ekspresyonu (6)              |
| ▽ otolit (5)                       | ▽ yavrulara etkisi (1)              | ▽ bağırsaklardaki sıvı kompozisyonu (1)      |
| ▲ işitsel (1)                      | ● üreme davranışları (1)            | ● branşiyal NKA aktivitesi (1)               |
| ▽ koku duyusu (8)                  | ▲ spontan aktivite (1)              | ▲ solunum (1)                                |
| ● aktivite/atılabilirlik (6)       | ▽ rutin O <sub>2</sub> alımı (6)    | ● en düşük test edilen pCO <sub>2</sub>      |
| ■ av/avcı (5)                      | ● maksimum O <sub>2</sub> alımı (4) |  |
| ◆ öğrenme/kavrama (3)              | ■ aerobik scope (2)                 |  |
| ◆ görme duyusu (2)                 |                                     |  |
| ★ habitat seçimi/yerleşim (5)      |                                     |  |
| ● stres (1)                        |                                     |  |

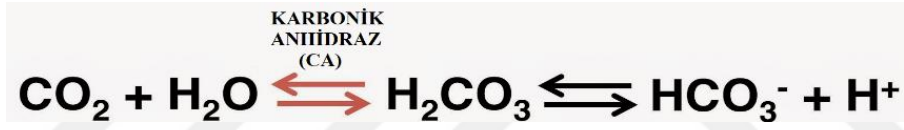
**Şekil 1.14.** CO<sub>2</sub>'in akuatik canlılar üzerinde gösterdiği olumsuz etkiler (Heuer ve Grosell 2014'den düzenlenmiştir.)

Şekil 1.14'te görüldüğü gibi 2000 µatm CO<sub>2</sub> konsantrasyon derişimlerinin üzerinde nörolojik davranışlar, büyüme, gelişim, hayatta kalma oranı, metabolik hız ve yüzme performansı gibi beceriler etkilenmektedir. Osmoregülasyon, mitokondrial aktivite ve metabolik yollar 1,900-1,200 µatm CO<sub>2</sub> değerlerinin altında test edilmediği için bu sistemlerin ne kadar hassas olduğu tam bilinmemektedir. CO<sub>2</sub>'e karşı en hassas noktaların asit-baz dengesini korumak adına otolit kalsifikasyonu ve GABA<sub>A</sub> reseptörlerindeki nöral

bozulmadır. Bunlara rağmen 5 major kategoriden 2'si ile ilgili etkiler bu yüzyılın ortasında ortaya çıkacak olan 600 µatm CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının altında gözlemlenmiştir.

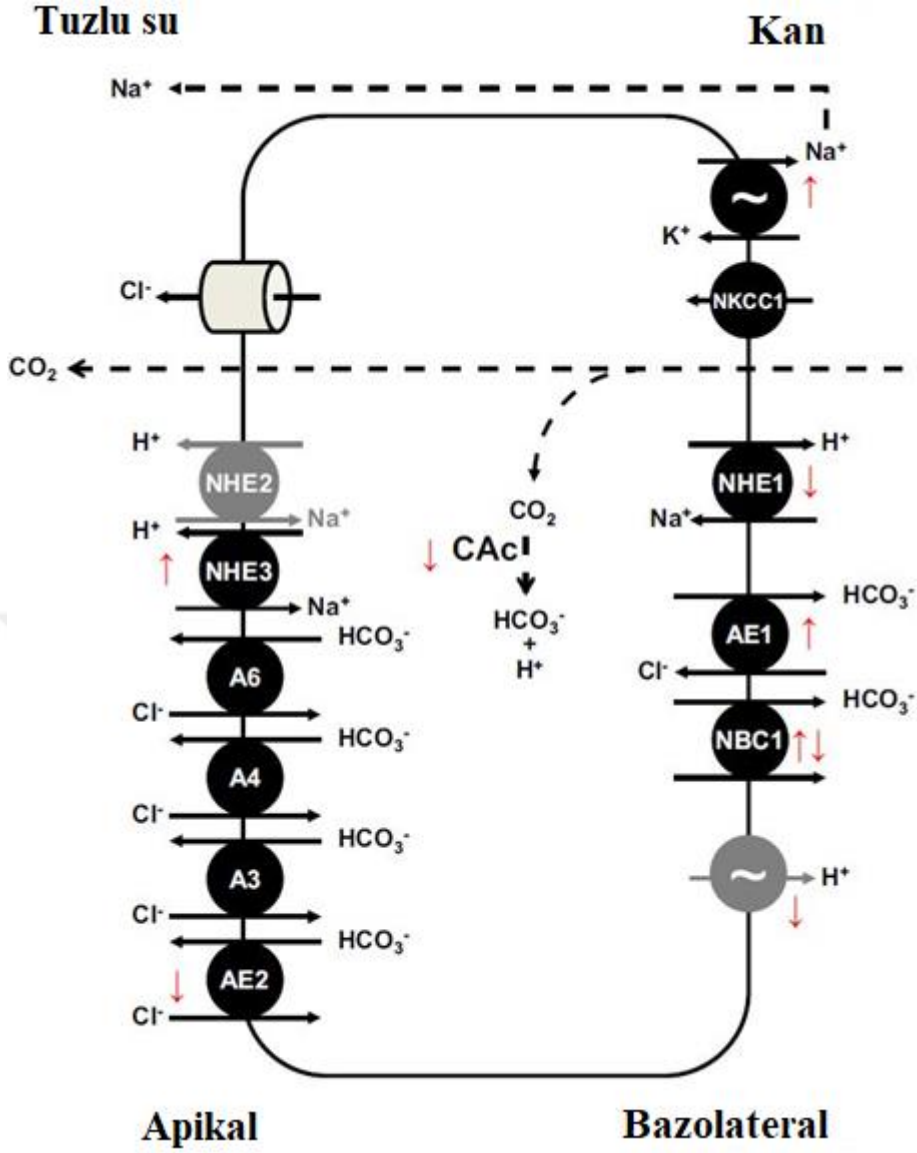
### pH regülasyonu

Kemikli balıklar sıcaklığa da bağlı olarak- ekstraselüler pH'yı (pHe) 7.7-8.1 arasında yani nötr-alkali bir seviyede tutmaya meyillidirler. Ters akıntı sayesinde solungaçlarda kan damarları ile su arasında değişim gerçekleşir. CO<sub>2</sub> suya atılarak kan plazmasında düşük CO<sub>2</sub> basıncı elde edilir. Bu sistem sayesinde sucül canlıların kan plazmasındaki CO<sub>2</sub> miktarı karasal canlılardan daha azdır (arteriyal pCO<sub>2</sub> ~2.600 µatm balık, ~53,000 µatm insan) (Perry ve Gilmour 2006; Evans ve ark. 2005). Balıkların asit-baz dengesindeki bozulmaya karşı verdiği temel cevap H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının atım oranındaki regülasyon ile plazma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> seviyesini ayarlamaktır (Marshall ve Grosell 2006; Perry ve ark. 2010). Solungaç epitelinin apikal ve basolateral membranlarındaki H<sup>+</sup> - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transfer yolları asit-baz regülasyonunun sağlanmasında önemli bir kapasiteye sahiptir. CO<sub>2</sub>'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formuna dönüşmesi karbonik anhidraz (CA) sayesinde katalizlenerek çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilir.



Balığın vücudunda oluşan pH düşüşünün önüne geçilmesi için solungaçlarda bulunan Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pompası veya Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pompası kullanılmaktadır. Bu iyon alışverişleri çeşitli protein (NHE1, NHE2, NHE3) ve protein ailelerinin düzenlemesi altında gelişmektedir. Bu durum H<sup>+</sup> iyonunun kan plazmasına geçişinin azaltılması için önem arz etmektedir. Hiperkapniyaya maruz kalan bireylerle yapılan çalışmalarda NHE1 proteinin downregülasyonu gözlemlenmiştir (Edwards ve ark. 2005).

Asit-baz dengesinin sağlanması için gerekli olan başka bir eleman ise Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesine bağlı olan Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> taşıyıcılarıdır. 6.000 µatm (Melzner ve ark. 2009) ve 10.000 µatm (Meehl ve ark. 2007) CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına maruz kalan bireylerin solungaç dokusunda Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Şekil 1.14'de bahsedilen transport sistemi ve yüksek asidik değerlerde bahsedilen sistemdeki downregülasyon ve upregülasyonlar gösterilmiştir.



**Şekil 1.15.** Denizel balıklarda asit-baz dengesi regülasyonu: Kırmızı oklar yüksek  $\text{CO}_2$  değerlerinde oluşacak inhibisyon ve ekspresyonları göstermektedir.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  transporter ( $\text{NKCC1}$ ),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPaz aktivitesi tarafından kontrol edilir.  $\text{CO}_2$  hidrasyonu karbonik anhidraz ( $\text{CAc}^1$ ) tarafından gerçekleştirir ve  $\text{H}^+$  ile  $\text{HCO}_3^-$  oluşur. (Heuer ve Grosell 2014'den düzenlenmiştir)

Çoğu çalışmada  $10.000 \mu\text{atm}$   $\text{CO}_2$  seviyelerinde bireylerin kandaki  $\text{CO}_2$  değeri anormal değerlere çıkmaya başlar. Ancak kısa sürede verimli ve tam bir pH düzenlemesi gerçekleştirilmiştir. Bu düzenleme için gereken süre türlere göre değişmesine karşın günler/saatler içinde gerçekleşmektedir. Bu düzenleme net asit atılımının artması ile ekstraselüler alandaki  $\text{HCO}_3^-$  iyonlarının tutulması yolu ile gerçekleştirilmiştir (Randall ve ark. 1982, Michaelidis ve ark. 2007, Perry ve ark. 2010). Ekstraselüler alandaki pH dengeye sokulmasına rağmen nöral davranış, otolit büyümesi ve osmoregülasyon üzerinde belirgin bir etkisi olduğu varsayılmaktadır.

İntraselüler pH'taki (pHi) en hafif değişim bile glikoliz redüksiyonu ve aerobik metabolizmada bozulmalara neden olur (Somero 1985; Hazel 1978). pHi regülasyonu çoęu dokuda  $Cl^-/HCO_3^-$  değişimi (Brauner & Baker 2009; Concepcion 2012) ya da  $Na^+/H^+$  arasındaki asit değişimi (Krumshabel ve ark 2011; Orłowski ve Grinstein 2004) sayesinde olur. Aynı zamanda katekolamin aktivasyonu sayesinde balık kan hücrelerindeki  $Na^+ /H^+$  değişim sayesinde gerçekleşmektedir (Baker ve ark. 2009). Bu mekanizmalar sayesinde intraselüler alandaki asidoz engellenmiş olur ancak hücrelerdeki  $Cl^-$  ve  $Na^+$  konsantrasyonlarının artması çeşitli nöral ve davranışsal sorunlara yol açabilmektedir.

### **Metabolizma**

Standart/bazal metabolik hız (SMR) ile maksimum metabolik hız (MMR) arasındaki fark "aerobik faaliyet kapsamı" olarak adlandırılır, oksijen tüketimi ile ölçülmektedir ve bu değerler hayvanın kondisyonu ve performansı hakkında fikir vermektedir (Clark ve ark. 2013).  $CO_2$ 'e maruz kalan bireylerde MMR'da yükseliş gözlenmektedir. Bu yükseliş stresörlerden ya da hafif asidozdan kaynaklanıyor olabilir. Bu durumda canlı katekolamin salınımını artırır ve intraselüler alandaki pH'ı düşürebilmektedir (Heuer ve Grosell 2014).

Eğer canlı vücudun ihtiyaç duyduğu oksijeni alamazsa dokularda hipoksi ortaya çıkmaya başlamaktadır. Solunum frekansında artış birçok tür için genel bir cevap olarak karşımıza çıkmaktadır. Osmoregülasyon için artan enerji ihtiyacı büyüme, üreme, otolit formasyonu ve protein sentezi için gerekli olan enerjiden harcanmaktadır (Kidder ve ark. 2006, Ishimatsu ve ark. 2008).

### **Nörosensör aktivite**

Normal  $CO_2$  koşullarında GABA reseptörü açıldığı zaman  $Cl^-$  ve  $HCO_3^-$  hücrenin içine akar ve polarizasyon gerçekleşir. Nöron dinlenme haline geçer. Bu sayede nöral aktivite sonlanır. Ancak yüksek  $CO_2$  konsantrasyonlarındaki nöron membranlarındaki  $Cl^-$  ve  $HCO_3^-$  gradientlerinin değişmesi GABA-A reseptörünün ters çalışmasına neden olmaktadır. Bu durum da depolarizasyon ile sonuçlanır. Depolarizasyon-polarizasyon arasındaki bu aksamalar canlıların davranışlarında değişime sebep olmaktadır (Nilsson ve ark. 2012). Bu değişimler;

1. Av-avcı dinamikleri
2. Stres Seviyesi
3. Laterizasyon
4. Biyoçeşitlilik (Munday ve ark. 2009; Munday ve ark. 2010)

5. Habitat tercihi (Devine ve Munday 2012a, Devine ve Munday 2012b)
6. Sosyal etkileşimler (Devine ve ark. 2012)
7. Yerleşme (settlement) tercihlerinde değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler popülasyon ve ekosistem dinamiklerini etkilemektedir.

Yüksek CO<sub>2</sub>'e maruz kalan bireylerde koku alma duyusunda gerileme ve buna bağlı olarak anti-predatör hareketlerde ve predatöre karşı oluşan streste önemli derecede gerileme görülmüştür . (Kitamura 2000; Ikuta 2001; Dixson ve ark. 2010). Aynı zamanda yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonları bireylerin lateralizasyonunda bozulmalar oluşturmaktadır. Lateralizasyon problemleri, öğrenme, uyaranlardan kaçış, birçok işi aynı anda yapabilme gibi davranışlarda aksaklık oluşturmaktadır (Jutfelt ve ark. 2013; Domenici ve ark. 2014). Ayrıca iç kulaktaki otolitleri aragonit (CaCO<sub>3</sub>) yapıda olup gelişimi CO<sub>2</sub> oranı yükseldiğinde ekstraselüler alanda pH seviyesini koruma amacıyla oluşan regülasyon mekanizmasından etkilenebilir (Payan ve ark. 1997). Bu durum balığın asit-baz dengesi regülasyonunu korumak adına otolitlerde CaCO<sub>3</sub> birikimine sebep olabilmektedir.

Küresel ısınmaya bağlı olarak yükselen CO<sub>2</sub> konsantrasyonları ve nanoteknoloji ile hayatımıza giren TiO<sub>2</sub> NP'lerinin doğaya karışma miktarı her geçen gün daha da artmaktadır. Bu sebeple günümüzde bu iki etkenin doğaya ve buna bağlı olarak akuatik ekosisteme verdiği etkilerin derinlemesine incelenmesi gerekmektedir. Bu sebeple bu çalışmada yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonları ile TiO<sub>2</sub> NP'nün beraber gentoksisite ve sitotoksisitede sinerjik bir etki gösterip göstermediği incelenmek istenmektedir.



## 2.MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1.Araştırma Materyali ve Temini

Şekil 2.1. de görülen *Carassius auratus* bireyleri deneyde kullanılan balık türüdür. Bu deneyde Japon balıklarının seçilmesinin nedeni hipoksiyaya karşı dirençli bir balık olmasıdır (Roesner ve ark. 2008). Özellikle yüksek dozdaki CO<sub>2</sub> deneylerinden az etkilenmesi ve en az mortality ile karşılaşılması amacı ile deney Japon balıkları üzerinden dizayn edilmiştir. Aynı zamanda japon balıkları model organizma olması nedeni ile yapılan başka bilimsel çalışmalar da karşılaştırma yapabilme adına kolaylık sağlamaktadır.



Şekil 2.1. *Carassius auratus*

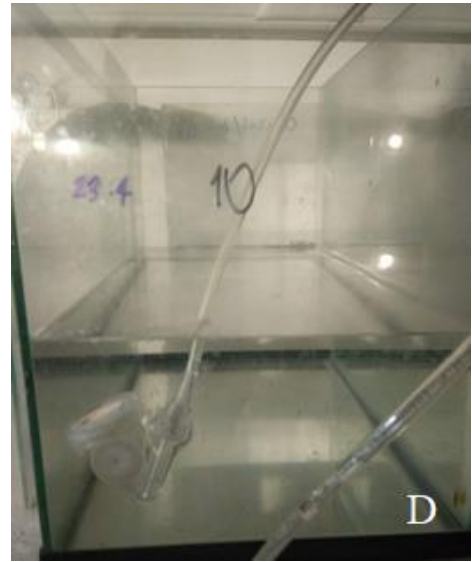
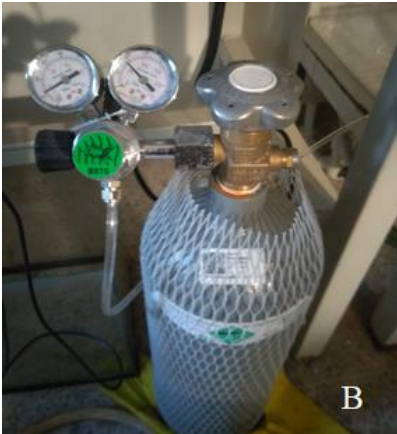
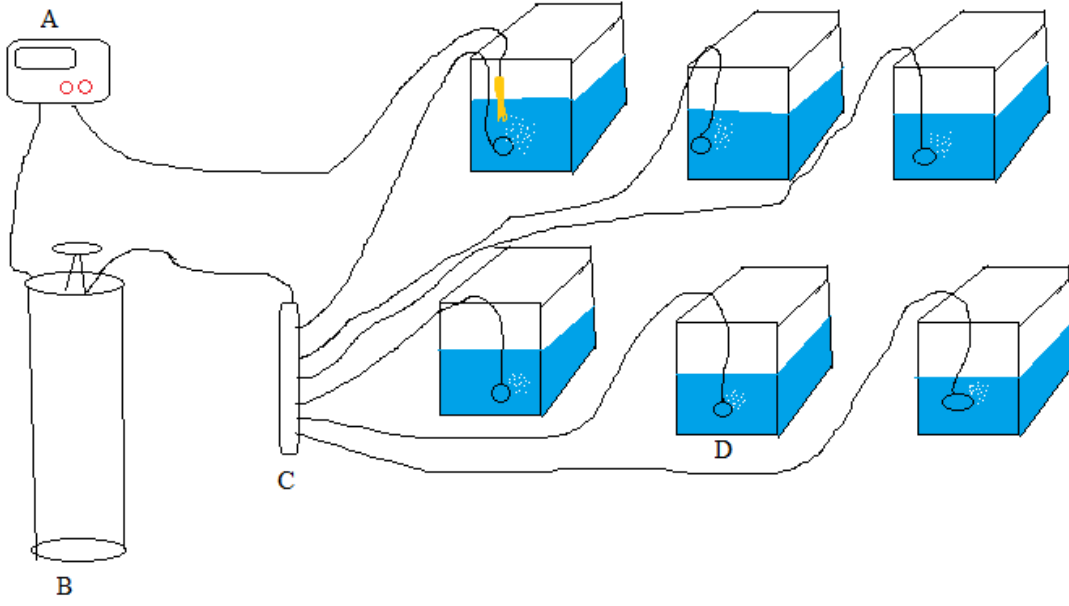
*Carassius auratus* bireyleri deney için ticari bir firmadan alınmış ve deneyin başlamasından bir ay önceden laboratuvara getirildi. Laboratuvara alıştırmaya sürecinde tüm balıkların ortalama 9±1 cm boylarında ve 11±2 g ağırlıklarda olacak şekilde seçildi ve deney grupları herhangi bir hastalık belirtisi tespit edilmeyen sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Balıklar on beşerli gruplara bölünerek 40 L kapasitesi olan akvaryumlara konuldu. Akvaryumlar dinlendirilmiş-havalandırılmış çeşme suyu ile 20L hacimnde dolduruldu. Tüm balıklara doğal fotoperiyot uygulandı. Akvaryum suyu sıcaklığı 24±1 °C, oksijen konsantrasyonu 8.3 mg/L olarak ölçüldü. Balıklar sabah ve akşam olmak üzere iki kere ticari yem ile beslendi. Günlük su pH değeri ve su sıcaklığı takip edilerek her su değişimi esnasında suyun sertliğine bakıldı. Su değişimleri üç günde bir gerçekleştirildi. Su değişimlerinde akvaryumun suyunun %80'i değiştirildi. Hava taşı yardımıyla suya sürekli olarak oksijen verilerek hipoksiya durumu önleildi. Balıkların strese girmemesi için akvaryumların dibine taş dökülerek ortam doğallaştırıldı.



## 2.2. CO<sub>2</sub> Sistemi

Akvaryumlara küresel ısınma sonucu artan CO<sub>2</sub> değerlerinin simülasyonu için uygun bir düzenek hazırlandı. İstenilen CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının sağlanması için BKS marka 5 LT CO<sub>2</sub> tüpü ticari bir firmadan edinildi. CO<sub>2</sub> tüpü ile akvaryumlar arasındaki bağlantı Milwaukee MC122 pH Controller ile gerçekleştirildi: kontrol panelinden çıkan prob akvaryumlardaki pH'ı ölçerek suyun pH'ının istenilen düzeyde tutması sağlandı. Konsantrasyonun sabit kalmasını sağlamak için kontrol panelinden çıkan başka bir kablo tüpe bağlanarak pH'ın yükselmesi durumunda tüpe sinyal göndererek tüpün CO<sub>2</sub> salınımını başlatmakta ve durum sudaki pH'ın istenilen noktaya düşmesine kadar devam etmektedir. CO<sub>2</sub> tüpünden çıkan pnömatik hortum 6'lı dağıtıcı ve dağıtıcı bağlantı elemanları sayesinde 6 farklı akvaryuma dağıtılmıştır. Akvaryuma girişlerin bulunduğu hortum uçlarına ISTA marka CO<sub>2</sub> difüzör damla sayacına takılarak CO<sub>2</sub> 'in suda çözünmesi kolaylaştırılmıştır. Suyun pH seviyesi ve sıcaklık Milwaukee PH55 PH Meter ile günde altı kere, Salifert marka KH/Alkalinity testi ile de suyun sertliği her akvaryum değişiminde takip edilmiştir. Bahsedilen düzenek Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.

HACH marka titrasyon cihazı ve CO<sub>2</sub> reagent seti ile sudaki değişen pH seviyeleri takip edilmiştir. Yapılan titrasyon deneyleri ile her pH'a karşılık suda çözülmüş CO<sub>2</sub> miktarı mg/L cinsinden hesaplanmıştır. Yapılan deneyler sırasında akvaryumların sıcaklıkları ve oksijen miktarlarının aynı olmasına dikkat edildi. CO<sub>2</sub> ve pH ilişkisini tespit edebilmek için yapılan deneyler sonucunda 24 °C'de 7.2 pH seviyesinde suda çözünen CO<sub>2</sub> miktarı 20 mg/L belirlenmiştir. Aynı deneyler sonucunda 6.7 seviyesindeki pH'ın ise 30 mg/L CO<sub>2</sub> 'e denk geldiği belirlenmiş ve deney süresince bu iki çözünürlük kullanılmıştır.



**Şekil 2.2.** Deney için dizeyn edilen CO<sub>2</sub> düzeneği. **A.** Sudaki pH'ı CO<sub>2</sub> tüpü yardımı ile istenilen pH'ı sabit tutan controller, **B.** CO<sub>2</sub> tüpü, **C.** CO<sub>2</sub>'i akvaryumlara dağıtan pnömatik hortumlar ve dağıtıcı, **D.**CO<sub>2</sub>'i akvaryuma veren difüzör.

### 2.3. TiO<sub>2</sub> Uygulanması

TiO<sub>2</sub> NP, “US Research Nanomaterials” firmasından temin edilmiştir. %99,5 saflıkta Anataz formunda olan TiO<sub>2</sub> NP 5 nm çapına sahiptir. Toz şeklinde bulunan TiO<sub>2</sub> NP beyaz ve kokusuz olarak temin edildi. Zeta potansiyel analizi ve tane büyüklüğü analizi için Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’ne (DAYTAM) tarafından gerçekleştirildi.

Nanopartikülün istenilen yoğunlukta hazırlanması için stok çözelti (1mg/mL) hazırlandı. Bunun için 0,05 gr TiO<sub>2</sub> NP tartılarak 50 mL distile suya tamamlandı. Hazırlanan stok çözelti kullanılmak istendiği zaman agrage olan partiküllerin suda çözünmesini sağlamak amacı ile öncelikle VWR marka ultrasonik banyoda 20dk sonike edildi ve ardından vorteks ile karıştırıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli denizlerdeki TiO<sub>2</sub> konsantrasyonunun 0.1 ile 16 µg/L arasında olduğu tahmin edilmektedir (Müeller ve Nowack, 2008; Gottschalk ve ark. 2009; Johnson ve ark. 2011). Uygulanacak dozların günümüz sucul sistemlerdeki toksik değere yakın olması, günümüz akuatik toksikolojisine dönük gerçekçi bir çıkarım yapılmasına yardımcı olması sebebiyle balıklara 5 µg/L, 10 µg/L ve 20 µg/L olmak üzere üç farklı TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonu uygulandı. Belirlenen değerler daha önce yapılan çalışmalarda denizlerinde yüzey suyundaki TiO<sub>2</sub> NP değerine yakın değerlerde olmasına dikkat edilmiştir.

TiO<sub>2</sub> NP’nün farklı pH noktalarında farklı elektrostatik özelliği olduğu için ortamın pH’ı önce istenilen noktaya getirildi. Ardından stok nanopartikül çözeltisi deney konsantrasyonlarına göre akvaryum suyu seyreltildi. TiO<sub>2</sub> NP agrage olma özelliği nedeniyle akvaryum suyu 3 günde bir ve %80’i uygulanan çözünmüş nanopartikül konsantrasyonlara göre hazırlanmış akvaryum suyu ile değiştirildi. Böylece deney boyunca akvaryum suyundaki nanopartikül seviyelerinde değişiklik olmaması için semi-statik koşullar sağlandı.

Farklı CO<sub>2</sub> seviyeleri ve TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonları, yine üç farklı süre belirlenerek *Carassius auratus* bireylerine uygulanmıştır. Buna göre deney grupları ile kontrol grupları süre olarak 1 hafta, 2 hafta ve 3 hafta boyunca toksik etkilere maruz bırakıldı.

Bu tez çalışmasında yer alan tüm deney grupları iki tekrarlı olarak yürütülmüş ve aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

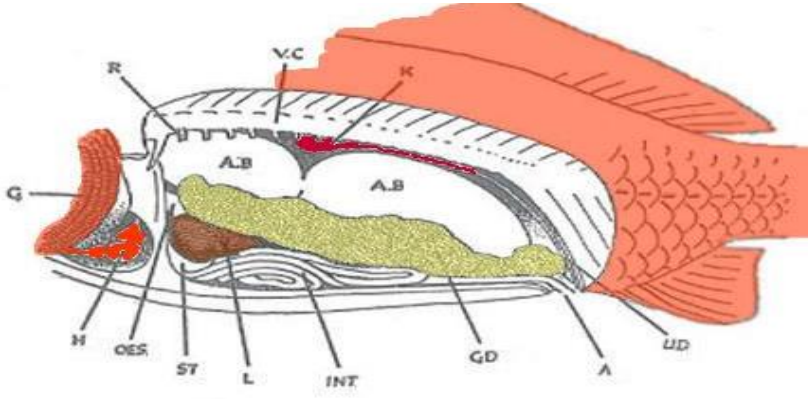
Karbondioksit seviyesi		Uygulanan TiO <sub>2</sub> nanopartikülü	Comet Analizi	Mikronukleus Analizi	Histopatoloji
20mg/L CO <sub>2</sub>	1.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
	2.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
	3.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
30mg/L CO <sub>2</sub>	1.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
	2.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
	3.Hafta	5 µg/L	X	X	X
		10 µg/L	X	X	X
		20 µg/L	X	X	X
Pozitif Kontrol	1.Hafta		X	X	X
	2.Hafta		X	X	X
	3.Hafta		X	X	X
Negatif Kontrol			X	X	X

**Tablo 2.1.** Tez çalışmasındaki tüm deney grupları.

#### 2.4. Örneklerin Alınması

Bu çalışmada kullanılan Japon Balıkları (*Carassius auratus*) Sigma Aldrich marka MS222 anestezi 50mg/L oranında uygulanması sureti ile bayıltıldı. Balıkların solungaçlarındaki nefes alma refleksi gözlemlenmeye kadar bekletildi ve ardından anestezi etkisindeki canlı daha önceden sudan-1 ve agar ile kaplanmış petri kabına alındı.

İlk olarak Comet ve mikronükleus analizi için 0.5 mL'lik heparinize şırınga ile kaudal venden kan alındı. Alınan kanın 1 damlası Mikronükleus testi için lama yayılmış, 60 µl kan ise Comet analizi (Singh ve ark. 1988) için daha önceden hazırlanan buzda bekletilmiş 1 mL PBS (fosfat tamponlu su çözeltisi) ile seyreltildi. Kan alma işlemi tamamlandıktan sonra histolojik analizler için balık tekrar anestezi suya konarak diseksiyon sırasında herhangi bir komplikasyonun gelişmesi önlenmeye çalışıldı. Ardından balık tekrar sudan alınarak diseksiyon gerçekleştirildi. Diseksiyon sırasında canlıların karaciğerleri ve solungaçları Şekil 2.3.'de gösterilen iç anatomi klavuzundan yararlanılarak alındı ve %10 nötral formaldehite konularak tespit işlemi başlatıldı.



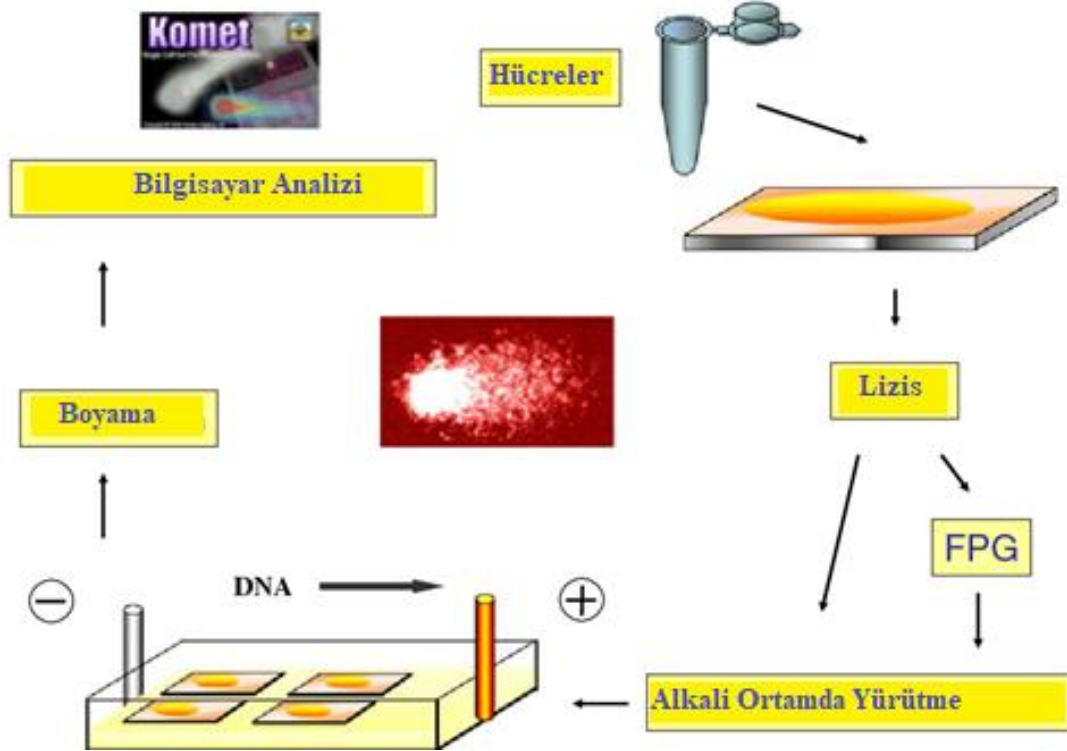
**Şekil 2.3.** *Carassius auratus* bireylerinin iç organ anatomisi. **R**:kaburga, **A.B**:solunum kesesi, **U.D**:idrar yolu, **G**:solungaç, **H**:kalp, **OES**:özafagus, **L**:karaciğer, **INT**:bağırsak, **ST**:mide, **GD**:gonad, **A**:anüs, **K**:böbrek, **VC**.vertebra

## 2.5. Comet Analizi

Bu çalışmada yüksek CO<sub>2</sub> seviyeleri ve farklı konsantrasyonlarda TiO<sub>2</sub> NP'nün balığın DNA'sına verdiği muhtemel zararı ölçmek için comet analizi yapıldı. Comet analizi [Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (SCGE)] elektroforetik ortamda lizise uğramış aynı hücrelerin artı kutuptan eksi kutupa doğru hareket ettirilmesi ve ardından floresan boya ile boyanan DNA fragmentlerinin aldıkları hasara göre farklı seviyede ışımaya yapmaları ilkesine dayanmaktadır. Comet analizi için elektroforetik ortamda yürütülen hücreler öncelikle lam üzerine sabitlenerek comet tankına koyulmaktadır. Comet analizinin basamakları Şekil 2.4.'te şematik halde gösterildiği şekilde uygulandı.

- Önceden yüksek kaynama derecesine sahip agaroz (HMA) ile kaplanan lamlar hazırlanıp bir gece önceden kuruması için bırakıldı.
- *Carassius auratus* bireylerinden kan alınması ve PBS ile karıştırılarak kan hücrelerinin bir süre daha canlılığının korunması sağlandı.
- 400 µl düşük kaynama derecesine sahip agaroz (LMA) ile 120 µl PBS+kan solüsyonu karıştırılarak HMA ile kaplanmış lamların üzerine yayıldı ve lamel ile kapatılarak 10 dakika boyunca kan hücrelerinin HMA içeren lama yapışmaları beklendi. Ardından lamel dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Böylece hücreler lam üzerindeki agar içerisine gömüldü.
- Hücrelerin zarlarının bütünlüğünün bozulması ve DNA'nın serbest kalabilmesi için +4°C'de Lizis solüsyonunda hazırlanmış lamlar bir saat bekletildi.

- Lamlar elektroforez için hazırlanmış solüsyonda 30 dakika tutularak DNA'ların ortama alışması sağlandı ve ardından comet tankına yerleştirilerek DNA'ların yarım saat boyunca 15 volt, 300 mA akımda elektroforetik ortamda yürütmesi sağlandı.
- Çalışmada alkali Comet analizi için yüksek pH(=13) koşullarında uygulanan elektroforezden sonra lamlar nötralizasyon solüsyonunda ve +4°C 'ye koyularak DNA'ların nötralize olması beklendi.
- Üstüne 75 µl EtBr damlatılan lamlar floresan mikroskopta X20'lik objektifte incelenerek her gruba ait iki yüz hücre sayıldı ve görüntülendi.
- Kaydedilen hücreler Canon 640 dijital kamerasi ile fotoğraflandı ve Kameram Comet Görüntü İşleme ve Analiz yazılımı ile analiz edilerek % DNA kuyruk ve Olive kuyruk momenti hesaplandı. Tüm hesaplamalarda her bir balık için 2 lam hazırlanarak her lamdan 100 comet görüntüsü kullanıldı.



**Şekil 2.4.** Comet analizinin şematik gösterimi

Alkali Comet analizinde kullanılan solüsyonların hazırlanışı Tablo2.1.'de gösterilmektedir.

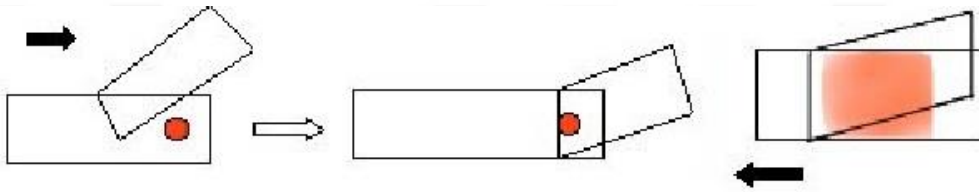
**Tablo2.2.** Comet analizi için gereken kimyasallar, hazırlanışı ve kullanım amacı.

<b>Solüsyon İsmi</b>	<b>İçerik</b>	<b>Hazırlanışı</b>	<b>Kullanım amacı</b>
<b>HMA</b> (Yüksek kaynama dereceli agaroz)	0,65gr HMA 100mL distile su	HMA ile distile su karıştırılarak mikrodalga fırında kaynayana kadar bekletilir. Sıcak bir şekilde tamlar içine daldırılıp çıkartılır ve lamin ters kısmı silinerek kurumaya bırakılır.	Alkali Comet analizi için hücrelerin tutanabilmesi için.
<b>LMA</b> (Düşük kaynama dereceli agaroz)	0,65gr LMA 100mL distile su + PBS	İçerikler karıştırılarak mikrodalga fırında kaynayana kadar bekletilir.	Balık periferik kan hücrelerinin HMA kaplı lamlara 2. katman agar jel ile sandviç şeklinde gömülmesi için.
<b>Lizis Çözeltisi</b>	<b>Stok:</b> 2,5M NaCl (146,1gr) 100mM EDTA (37,2gr) 10mM Tris baz (1,2gr) <b>Çalışma çözeltisi:</b> 100mL DMSO 10mL Triton-X	Stok çözelti için gereken katı kimyasallar 700mL dH <sub>2</sub> O ile karıştırılır. Ardından pH NaOH yardımı ile 10'a getirilir. Ardından son hacim 890mL'ye tamamlanarak +4C getirilir.  Kullanılmadan önce stok çözeltinin üzerine DMSO ve Triton-X yarım saat önce eklenerek buzdolabında soğumaya bırakılır.	Hücre membranlarının parçalanarak nükleus içindeki DNA'nın ortaya çıkması için.
<b>Elektroforez Çözeltisi</b>	<b>Stok:</b> 10N NaOH (400gr) 200mM EDTA (14,89)	İki ayrı şişenin birinde 1000mL dH <sub>2</sub> O ile NaOH çözülür. Diğerinde ise 200mL dH <sub>2</sub> O EDTA çözülür. Ardından EDTA çözeltisinin pH'ı NaOH yardımı ile 10'a ayarlanır. Çalışmaya başlamadan önce NaOH çözeltisinden alından 30mL solüsyon ile EDTA çözeltisinden alınan 5mL solüsyon karıştırılarak son hacmi dH <sub>2</sub> O ile 1000mL tamamlanır. (Son hacmin pH'ı ölçülerek 13ten büyük olmasına dikkat edilmelidir.)	Tek iplik DNA kırıkları ve alkali labil bölgelerin elektroforezi ile fragmentlerin ayrılması için.
<b>Nötralizasyon Çözeltisi</b>	0,4M 63,04gr Tris-HCl 1000mL dH <sub>2</sub> O	Tris-HCl bir miktar suda çözülür. Ardından NaOH ile pH 7,5 ayarlanır. Ardından solüsyon 1000mL'ye tamamlanır.	Oluşabilecek artefaktların azaltılması için.
<b>Boyama Çözeltisi</b>	<b>Stok:</b> EtBr (200gr) dH <sub>2</sub> O 1000mL	dH <sub>2</sub> O'da çözülen 200gr distile su buzdolabında saklanır. Kullanılmadan önce içerisinden 200mL alınarak 800mL dH <sub>2</sub> O ile çözümlenerek çalışma çözeltisi hazırlanır.	DNA spesifik bir boya ile DNA'nın boyanarak görüntülenmesi için.

## 2.6. Mikronukleus Yöntemi

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (Demirel ve Zamani 2002). Mikronükleus frekansının yüksek olması hücre içindeki kromozom düzensizliklerin arttığını göstermekte ve bu da genetik hasarın ciddiyetiyle ilgili bize bilgi vermektedir.

Mikronükleus yöntemi için balıkların kaudal yüzgeçlerinin altından alınan kan daha önceden %99 Etil alkolde bekletilerek temizlenmiş lamlara yayma kan preparatı yapılacak şekilde yayıldı. Bunun gerçekleşmesi için kan damlasının damlatıldığı noktaya başka bir lam 45°lik açıyla konularak lamın aksi yönüne doğru çekildi.



**Şekil 2.5.** Mikronükleus sayımı için yayma kan preparatı uygulamasının şematik gösterimi

Yayılan kanın kuruması için on dakika beklenerek aşağıdaki prosedür uygulandı.

- Kan yayılmış lamlar %99 derişimde hazırlanan etil alkolde on dakika bekletildi.
- Hematoksilen (Hematoxylin Solution, Mayer's, Sigma Aldrich, MHS16-500ML) solüsyonunda 15 dakika bekletildi.
- 15 dakika boyunca dH<sub>2</sub>O ile boya akıtıldı.
- 20 dakika eozin gimsa solüsyonunda bekletildi. Bu solüsyonu hazırlamak için 5 mL gimsa solüsyonu (EosineY- Solution %0.5 Aqueous For Microscopy, Merck, 109844) 100 mL PBS(fosfat baline serum) eklendi dH<sub>2</sub>O ile çözüldü ve ardından kullanıldı.
- 20 saniye boyunca dH<sub>2</sub>O tutularak fazla boyanın hücrelerden uzaklaşması sağlanır.
- 2 dakika ksikolde bekletildi.
- 2 dakika asetonda bekletildi.
- Entellan ile lamların üstü lamelle kapatıldı. Ve kuruması için bir saat beklendi.

Hazırlanan preparatlar X40 objektif ile incelenerek Mikronükleus bulunan hücreler kaydedildi. Toplam 1000 hücre gözlemlenerek içinde mikronükleusa sahip hücrelerin oranı %MN= MN içeren hücre sayısı/Toplam hücre sayısı formülüne göre hesaplandı. Ancak



Mikronükleus tayin etmede oluşan çeşitli zorlukların aşılabilmesi için aşağıdaki basamaklara da dikkat edilmiştir:

1. Mikronükleus çapı ana nükleus çapının 1/3 ile 1/6'sı arasında olmalıdır.
2. Ana nükleus ile bağlantılı olmaması ve sınırlarının ana nukleustan net olarak ayırt edilmesi gerekmektedir.
3. Ana nukleus ile aynı oranda boyanmış olması gerekmektedir.
4. Mikronukleusun yuvarlak şekle sahip olması gerekmektedir.
5. Mikronukleusun ışığı kırmamasına dikkat edilmelidir (Fenech, 2000).

## 2.7. Histopatolojik İnceleme

Balıklarda disseksiyon esnasında alınan organlar %10 nötral Formalin solüsyonuna konuldu. Doku sıvısı ve kanın fiksatifin kalitesini bozmaması için 10 dakika ön fiksasyon yapıldı. Daha sonra kullanılan fiksatifin iyi nüfuz etmesi için tüm organlar 48 saat boyunca fiksatifte bekletildi ve parafine gömülmek üzere aşağıdaki dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemlerinden geçirildi (Şekil 2.6).

Karaciğer ve solungaç dokuları;

- %50 etil alkolde 30 dakika,
- %70 etil alkolde,
- %80 etil alkolde,
- %90 etil alkolde,
- %100 etil alkolde 60 dakika,
- Ksilol içerisinde 10 dakika (2 defa)
- Etüvde 1/1 hacimde ksilol/parafin çözeltisinde 10 dakika,
- Etüvde eritilmiş sıvı parafin içerisinde 12 saat,

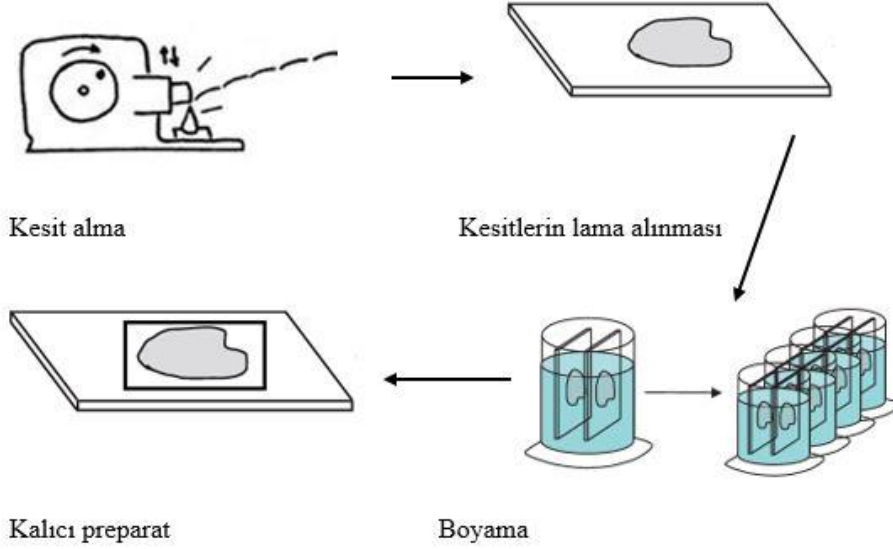


**Şekil 2.6.** Histolojik kesit alırken doku, fiksasyon, dehidratasyon, şeffaflaştırma ve parafinizasyonu temsil eden şematik gösterim.

58°C’de etüvde bekletilen dokuların içerisinde parafinin nüfuz etmesi sağlandı. Ardından dokular parafin bloklar şekline getirilerek mikrotomla kesilmeye hazırlandı. Mikrotomla kalınlığı 7 mikron olacak şekilde 18 deney grubuna ve kontrollere ait olan karaciğer, solungaç örneklerinin kesitleri alındı. Alınan kesitler daha önce albümin Mayer ile kaplanmış lamların üzerine yapıştırıldı. Örnekler ısıtıcı tablada bir gün bekletilerek lamlara tespiti gerçekleştirildi.

Hazırlanan doku kesitlerinin boyanması için aşağıdaki prosedür uygulandı. Uygulanan prosedürün şematik hali Şekil 2.7.’de gösterilmektedir.

- Ksilol I içerisinde 7 dakika,
- 1/1 Hacimde Ksilol/Alkol çözeltisinde 7 dakika,
- %100 etil alkolde 15 dakika,
- %96’lık etil alkolde 10 dakika,
- %80’lik etil alkolde 5 dakika,
- %70’lik etil alkolde 5 dakika,
- %50’lik etil alkolde 5 dakika,
- Akarsuda 5 dakika,
- Hematoksilin boyasında (Hematoxylin Solution, Mayer’s, Sigma Aldrich, MHS16-500ML) 5 dakika,
- Akarsuda 5 dakika,
- Eozin solüsyonunda (EosineY- Solution %0.5 Aqueous For Microscopy, Merck, 109844) 5 dakika,
- Distile sudan birkaç kez geçirerek boyanın uzaklaştırılması sağlandı,
- %80’lik etil alkolde 1-2 dakika,
- %90’lık etil alkolde 1-2 dakika,
- %100 etil alkolde 10 dakika,
- %100 etil alkolde 5 dakika,
- Ksilolde 10 dakika,
- Asetona bir iki defa dalıp çıkartıldı,
- Kurutma kağıdına alınır ve entellan damlatılarak lamelke üstleri kapatılarak kalıcı preparat hazırlandı.



**Şekil 2.7.** Histopatolojik analiz sırasında kesit alma, kesitlerin lama alınması, boyama ve kesit hazırlama aşamalarının şematik gösterimi

İncelemeye hazır olan preparatlar ışık mikroskobunda x40 objektifte incelenerek çeşitli patolojik bulgular tespit edildi.

## 2.8. Pozitif ve Negatif Kontroller

Negatif kontrol için daha önceden dinlendirilmiş temiz suyun içine hava taşı konarak hazırlanmış akvaryum düzenekleri kullanılmıştır. Balıklara günde iki kez yem verilmiştir.

Pozitif kontroller için genotoksik ve kansorejen olduğu ispatlanmış bir kimyasal olan Etil Metan Sülfonat (EMS) kullanılmıştır. Uygulama dozu olarak 5 mg/L olacak şekilde uygulandı. Yapılan hesaplamalar ile 20 litre suya 83 µl konularak deney düzeneği hazırlanmıştır.

## 2.9. İstatistik Hesaplamaları

Comet analizlerinin anlamlı ifadeleri için SPSS programı kullanıldı. Comet analiz sonuçlarının sayısal değerleri yapılan normalite testinin sonucunda normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Normal dağılım olmadığı için grupların birbiri ile karşılaştırılması için Kruskal-Wallis analizinden yararlanılmıştır. Güven aralığı  $p < 0.05$  olarak belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. TiO<sub>2</sub> Nanopartikülü Karakterizasyonu

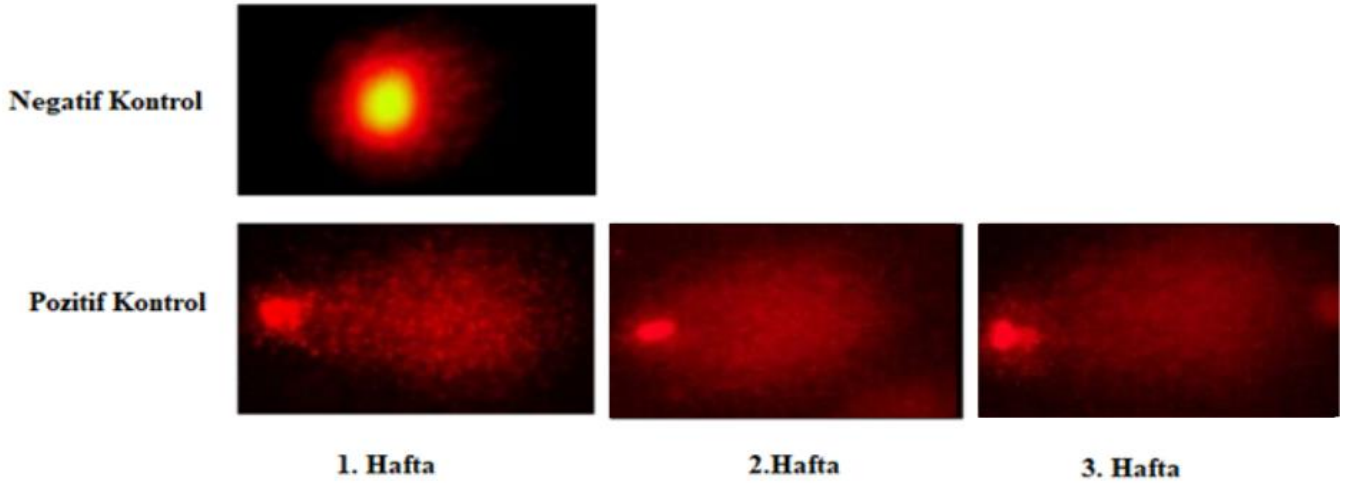
Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (DAYTAM) zeta potansiyel ve parçacık boyutu analizi için yollanan TiO<sub>2</sub> NP'nün sonuçları aşağıdaki tablodaki gibidir;

**Tablo 3.1.** TiO<sub>2</sub> NP'nün karakterizasyon analizi sonuçları

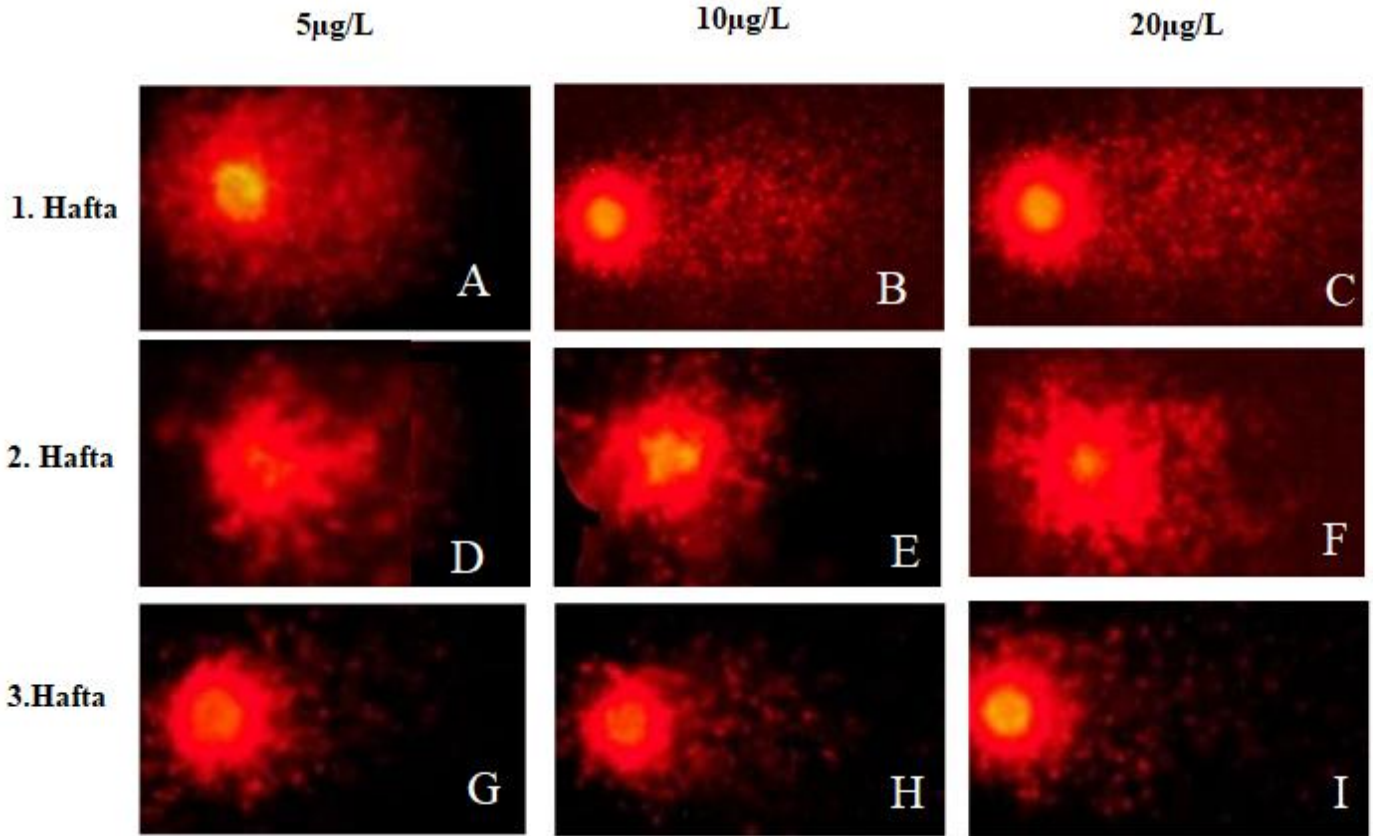
Zeta potansiyeli (mV)	-19,3
İletkenlik (mS/cm)	0,0232
Z-Average (Parçacık büyüklüğü)(d.nm)	1234

#### 3.2. Comet Analizi

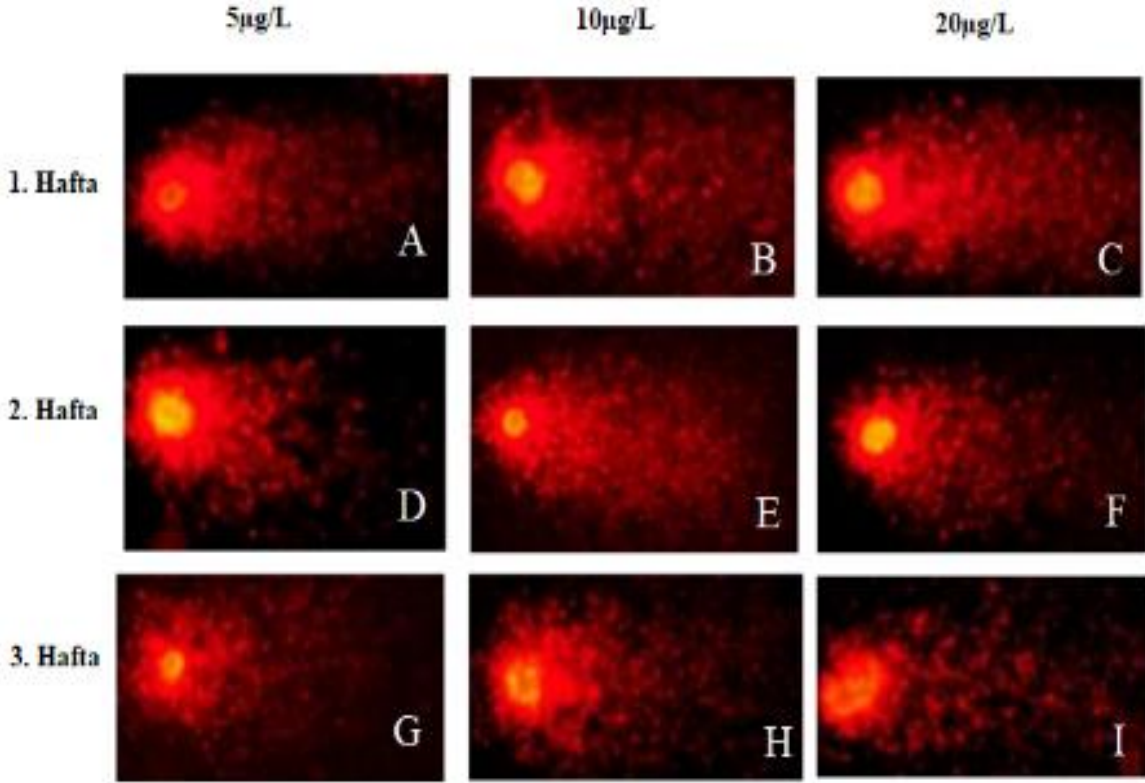
Comet analizinin sonuçları her grup için 200 comet görüntüsü analizi yapıldıktan sonra hesaplandı. Deneyle iki tekrar yapılmıştır ve her deney grubundan 3 adet balığın kanı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Comet analiz programında her bir DNA kuyruk ve gövde oranları hesaplanarak kuyruk % DNA ve olive kuyruk momentleri bulunmuştur. Kuyruk % DNA değeri, kuyruğun toplam yoğunluğunun hücrenin toplam yoğunluğuna oranı (birlikte baş ve kuyruk) olarak tanımlanmaktadır (Mozaffarieh ve ark. 2008). Olive kuyruk momenti ise ölçülebilen en küçük göç eden DNA miktarını ve DNA'dan kopan parçaların miktarını ölçmekte kullanılan bir parametredir. Yapılan ölçümlerde standart sapmalar dikkate alınarak grafikler oluşturulmuştur. Negatif, pozitif kontrol ve deney gruplarının comet görünümleri Şekil 3.1., 3.2, ve 3.3.'de, grafikleri Şekil 3.4 ve 3.5.'te gösterilmektedir. Comet kuyruklarının olive momenti ve kuyruk % DNA'sının sayısal ifadeleri tablo 3.2., Tablo 3.3., Tablo 3.4., ve Tablo 3.5.'de gösterilmektedir.



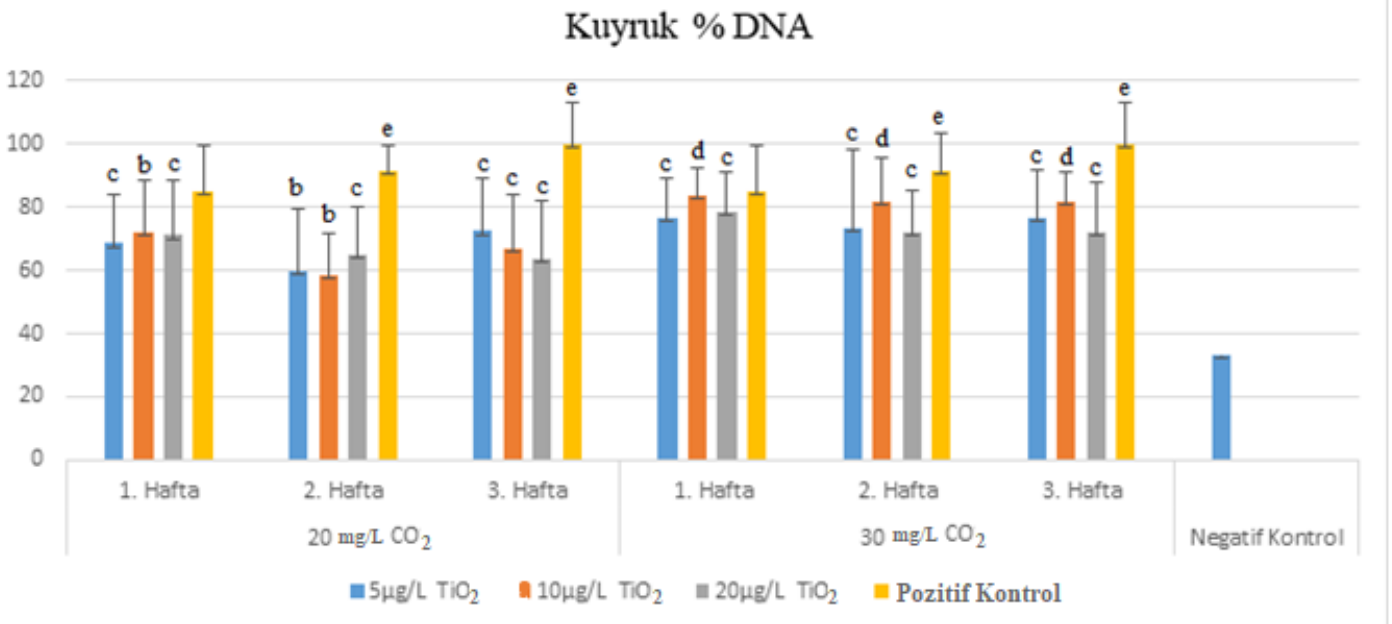
Şekil 3.1. Comet analizi negatif ve pozitif kontrol (5 mg/L EMS)



Şekil 3.2. 20 mg/L CO<sub>2</sub>'e maruz kalan bireylerin farklı TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonları ve sürelerinde ortaya çıkan DNA hasarları **A**: 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 hafta **B**: 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 hafta **C**: 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 hafta, **D**: 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 hafta **E**: 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 hafta **F**: 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 hafta, **G**: 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 hafta **H**: 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 hafta **I**: 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 hafta

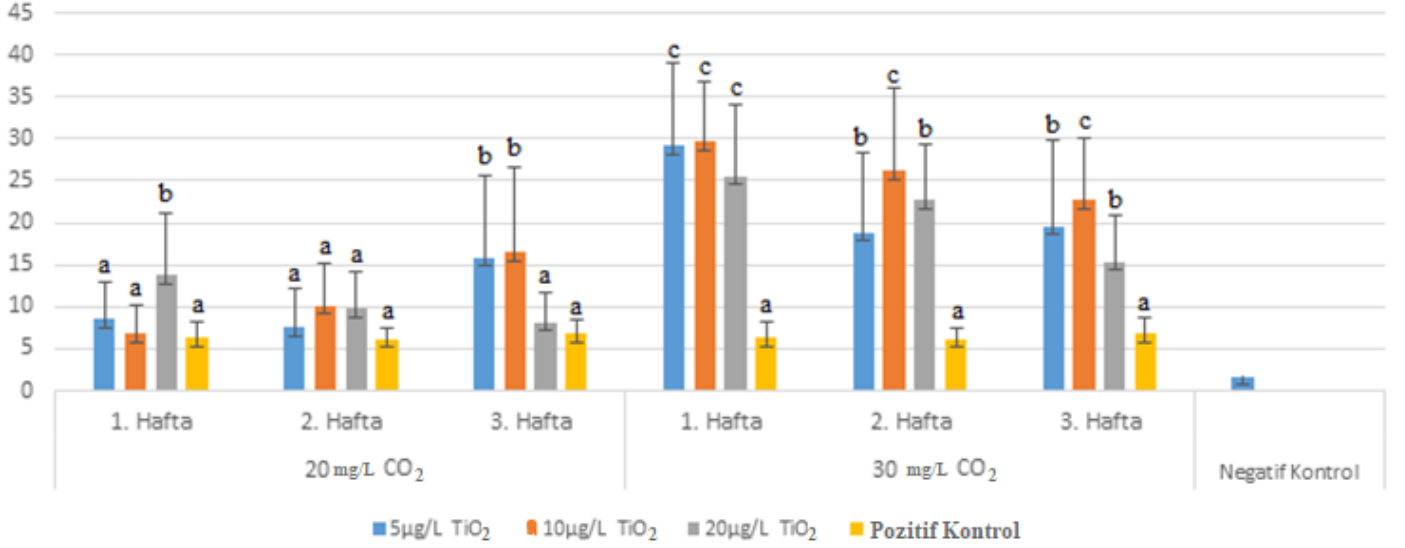


**Şekil 3.3.** 30 mg/L CO<sub>2</sub>'e maruz kalan bireylerin farklı TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonları ve sürelerinde ortaya çıkan DNA hasarları **A:** 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 Hafta **B:** 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 Hafta **C:** 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 1 Hafta, **D:** 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 Hafta **E:** 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 Hafta **F:** 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 2 Hafta, **G:** 5 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 hafta **H:** 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 Hafta **I:** 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP, 3 Hafta



**Şekil 3.4.** *Carasius auratus* bireylerinde negatif ve pozitif kontrollerle beraber 20 mg/L ve 30 mg/L CO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> seviyelerinde ortaya çıkan kuyruk % DNA değerleri ve standart sapmaları. (P<0.05).

### Olive Kuyruk Momenti



**Şekil 3.5.** *Carasius auratus* bireylerinde negatif ve pozitif kontrollerle beraber 20 mg/L ve 30 mg/L CO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> seviyelerinde ortaya çıkan kuyruk % DNA değerleri ve standart sapmaları (P<0.05)

**Tablo 3.2.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber kuyruk % DNA analiz sonuçları

TiO <sub>2</sub>	20 mg/L CO <sub>2</sub>		
	1.Hafta	2.Hafta	3.Hafta
5 µg/L	68,5±15,4	59,9±19,7	72,4±16,8
10 µg/L	71,9±16,4	58,7±12,9	67,1±17,2
20 µg/L	71,1±17,6	65,2±14,8	63,8±18,4
Kontrol (+)	85,3±14	91,3±8,4	100±13
Kontrol (-)	33,1±16,6	33,1±16,6	33,1±16,6

**Tablo 3.3.** 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber kuyruk % DNA analiz sonuçları

30 mg/L CO <sub>2</sub>			
TiO <sub>2</sub>	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta
5 µg/L	29,1±9,9	18,8±9,6	19,6±10,2
10 µg/L	29,6±7,3	26,16±10	22,7±7,3
20 µg/L	25,6±8,4	22,7±6,7	15,4±5,4
Kontrol (+)	6,3±1,9	6,1±1,3	6,82±1,9
Kontrol (-)	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5

**Tablo 3.4.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber olive kuyruk momenti analiz sonuçları

20 mg/L CO <sub>2</sub>			
TiO <sub>2</sub>	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta
5 µg/L	8,5±4,5	7,5±4,8	15,8±9,9
10 µg/L	6,8±3,3	10,1±5	16,5±10
20 µg/L	13,8±7,3	9,7±4,5	9,7±3,5
Kontrol (+)	6,3±1,9	6,1±1,3	6,1±1,7
Kontrol (-)	1,7±0,5	1,7±0,5	1,7±0,5

**Tablo 3.5.** 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonlarına ait comet görüntülerinin standart sapmalarla beraber olive kuyruk momenti sonuçları

30 mg/L CO <sub>2</sub>			
TiO <sub>2</sub>	1. Hafta	2.Hafta	3.Hafta
5µg/L	76,6±12,7	73,4±24,6	76,6±15,5
10µg/L	83,9±8,3	82±13,7	81,6±9,3
20µg/L	78,4±13	71,9±13,2	72,3±15,4
Kontrol (+)	85,5±14	91,3±12	100±13
Kontrol (-)	33,1±16,6	33,1±16,6	33,1±16,6



Comet analizi uygulaması sonucu kuyruk % DNA değerleri kıyaslandığında 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan grubun CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak her hafta birbiri içinde anlamlı bir artış göstermektedir (p<0,05). 5 ve 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak aynı uygulama süresi içerisinde anlamlı bir artış görülmemekle birlikte sayısal olarak comet analizlerinin ortalamaları yüksek çıkmaktadır (p>0,05). Nanopartikül uygulanan bütün gruplar negatif kontrole göre anlamlı bir fark ile genotoksik etkiye sebep olduğunu ispatlamıştır (p<0,05). Bununla beraber kuyruk % DNA değeri en düşük olan grup 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda 5 µg/L TiO<sub>2</sub>'in 2 hafta uygulanması ile gözlemlenen gruptur ve kuyruk % DNA değeri 59,9 olarak hesaplanmıştır. % Kuyruk değeri en yüksek gözlemlenen grup 30 mg/L CO<sub>2</sub> uygulanan gruptaki 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP'nü 1 hafta süreyle uygulayan gruptur ve kuyruk % DNA değeri 83,9 olarak kaydedilmiştir (Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.).

Uygulanan dozların gerçek senaryolara yakın olması amaçlandığı için TiO<sub>2</sub> NP uygulanan deney gruplarının konsantrasyonların birbirine yakın olması, deney grupları arasında önemli derecede genotoksik fark oluşmasının önüne geçmiş olabileceği düşünülmektedir. 20µg/L TiO<sub>2</sub> NP'nün uygulandığı grupların kendi arasında en yüksek toksisite göstermesi beklenirken gözlemlenmemiş olması en yüksek dozun konsantrasyon yoğunluğu nedeniyle agrage olma potansiyelinin daha fazla olması olarak düşünülmektedir. CO<sub>2</sub> sebebiyle değişen pH'ın uygulanan nanopartikülün etkinlik derecesini değiştirmesi de canlılardaki toksik etkiyi değiştirmektedir. TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin farklı pH değerlerinde farklı çözünürlük göstermesi çeşitli çalışmalarda gözlemlenmiştir (Schimit ve Vogelsberger 2009; French ve ark. 2009).

Yapılan comet analizinde olive kuyruk moment değerleri incelendiğinde 30 mg/L CO<sub>2</sub>'e maruz bırakılan grupların 20 mg/L CO<sub>2</sub>'e göre daha yüksek genotoksik hasar verdiği açıkça gözlemlenmektedir. (Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.) 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonu uygulanan gruplarda yine en yüksek genotoksisitenin 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP'ne ait olduğu tespit edilmiştir. Bu yüksek genotoksisite tüm zaman periyotlarında diğer TiO<sub>2</sub> NP doz grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde yüksektir (P<0,05). 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz bırakılan deney gruplarında da 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan deney gruplarının en yüksek genotoksisiteye ait olduğu gözlemlenmektedir. Bu toksisite istatistiki olarak anlamı olmasa da sayısal değerler olarak yüksek olduğu Comet analizi programınca tespit edilmiştir (P>0,05)

Uygulanan bütün deney gruplarının pozitif kontrole göre istatistiki olarak anlamlı olarak fazla genotoksisiteye sahip olması dikkat çekicidir ( $P < 0,05$ ). Bunlarla beraber en yüksek genotoksisite gösteren grup 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonu uygulanan grupların içerisinde 1 hafta süre ile 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan deney grubunda olive kuyruk momenti 29,6 olarak gözlemlenmiştir. En düşük genotoksisiteye sahip grup ise 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonu uygulanan grupların içerisinde 1 hafta süre ile 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan deney grubunda ise olive kuyruk momenti 6,8 olarak tespit edilmiştir.

TiO<sub>2</sub> NP'nün çeşitli analizlerle toksik olduğu gözlemlenmiş, oksidatif stresi arttırdığı (Reeves ve ark. 2008; Hao ve ark. 2009; Xiong ve ark. 2011) nörotoksik özelliğinin olduğu (Wang ve ark. 2007; Sheng ve ark. 2016) ve DNA'ya zarar verdiği çeşitli (Trouiller ve ark. 2009, Huang 2009) çalışmalar ile desteklenmiştir. Aynı zamanda comet analizlerinde de genotoksik etki yarattığı diğer çalışmalarda da desteklenmiştir (Clemente ve ark. 2013; Gurr ve ark. 2005). Bununla beraber genotoksik etki yaratması ancak TiO<sub>2</sub> NP dozajları arasında anlamlı bir fark olmaması bu çalışma dışında birçok çalışmada da ortaya konmuştur. Örnek olarak hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada dozlar arasında 64 kat fark olmasına rağmen dozlar arasında anlamlı bir genotoksik hasar gözlemlenmemiştir ancak göreceli olarak yükseldiği söylenebilmektedir (Du ve ark. 2019). Aynı sonuç *Carassius auratus* hücre hattı ile yapılan bir çalışmada da gözlemlenmiştir. Çalışmada dozlar arasında 100 kat fark olmasına rağmen anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Reeves ve ark. 2008). Ancak TiO<sub>2</sub> NP'nin *T. Cardinus* türü balığa enjeksiyon ile uygulandığı bir çalışmada 1,5 µg/g ve 3µg/g dozları kullanılmasına rağmen 72. Saatte uygulanan comet analizinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Vignardi ve ark. 2015). Bu durum ise solungaçlar sebebiyle oluşturulan bariyer sistemi ve hücre içine alım mekanizmalarının TiO<sub>2</sub> NP'nün genotoksisitesini azaltma yönünde bir avantajı olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan çalışmada süreye bağlı olarak genotoksite etkisinde bir artış gözlemlenmemiştir. Bunun sebebi balıkların adaptasyon yeteneğinin yüksek olması ve duruma kendisini adapte edebilmesi ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu duruma benzer olarak bazı çalışmalarda da genotoksiteye zamana bağlı artışı gözlemlenmemiştir (Rocco ve ark. 2015).

Yüksek CO<sub>2</sub>'in balıklar üzerinde çeşitli etkileri araştırılsa da DNA üzerinde herhangi bir hasar oluşturduğuna dair bir çalışma bulunamamasıyla beraber yüksek CO<sub>2</sub>'in çeşitli serbest radikallerin oluşumuna etkisi olduğu bildirilmiştir (Strobel 2013). Oluşan serbest radikaller hücrelerde karbon merkezli çeşitli radikaller oluşturabilmektedir. Bununla beraber reaktif

oksijenler elektron almak üzere lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girmektedirler (Sezer ve Keskin 2014). *Carassius auratus* ile yapılan 8 saatlik akut bir deneyde anoksiya durumunun glutathione seviyesini %17 düşürdüğü, süperoksit radikallerinin oluşumunu önleme ile görevli katalaz ve glutathione peroksidaz aktivitesini yükselttiği gözlemlenmiştir. Aynı deneyde lipit peroksidaz radikalının ise %114 arttığı gözlemlenmiştir (Lushchak ve ark. 2011). Membranda bulunan integral veya periferik proteinleri ile tepkimeye girerek lipid peroksil (LOO•) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine en aktif ve hasara sebep olan OH• radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir (Burçak ve Andican 2004). Bununla beraber yüksek CO<sub>2</sub>'in solungaç lamellerindeki iyon ve elementlerin kan dolaşımına geçmesini sağlayan çeşitli proteinlerin ekspresyon miktarını etkilediği ve aynı zamanda lamellere patolojik zarar vererek dokuların işlevini yüksek verimle yapmasını engellediği bilinmektedir (Cameron ve Iwama 1989; Esbaugh ve ark. 2012, Edwards ve ark. 2005, Tsenk ve ark. 2013, Hamilton ve ark. 2017). Solungaçlardan süzülen suyun içindeki çeşitli elemanların alımından sorumlu çeşitli yolakların CO<sub>2</sub>'ten etkilenmesi TiO<sub>2</sub> NP gibi çeşitli zararlı maddelerin de canlının vücuda kontrolsüz bir şekilde alımına neden olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular yüksek CO<sub>2</sub>'in dolaylı yoldan DNA hasarlarına katkısı olduğunu göstermektedir.

### 3.3. Mikronukleus Testi

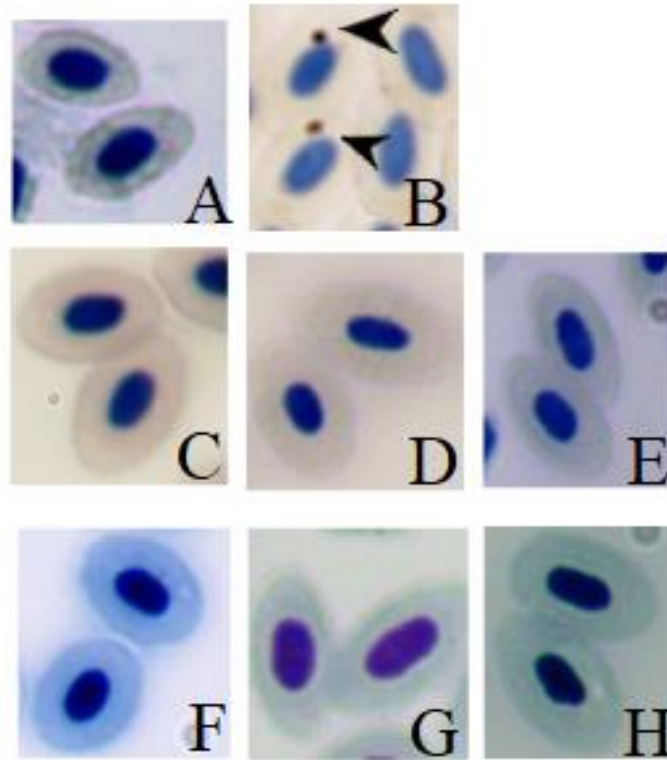
Kromozom kırıkları canlı vücudunda meydana gelen doğal bir olaydır ve genellikle tekrar birleşerek onarılabilmektedir. Ancak bazı durumlarda bir hücrede birden fazla kırık oluşabilmektedir. Bu durum kromozomların tamiri ve düzenlenmelerini engellemeye meyillidir. Bu şekilde kromozom kırıklarını meydana getiren mutajenik ajanlar genellikle kromozom kırıkları ile gen mutasyonlarını indüklemektedir (Saldamlı ve Uygun 2014). Bu durumda da kopan kromozomların onarımı gerçekleşmemekte ve mikronukleus oluşumu gözlemlenmektedir.

DNA'da oluşan harabiyet ve DNA tamir genlerinde meydana gelen hatalar mikronukleus frekansını arttırabilmektedir. Bu gibi durumlar çeşitli gen ekspresyonu derecelerini değiştirebilmekte ve buna bağlı olarak kromozomlarda yeni düzenlemelere neden olabilmektedir (Huerta ve ark. 2014). Bu sebeple artan reaktif oksijen türleri hücre içinde DNA'ya hasar vererek mutajenik etki yaratabilmektedir. Özellikle TiO<sub>2</sub> NP'nün kendisinin singlet oksijen üretmesi ve aynı zamanda hücrenin de bu ajana karşı da reaktif oksijen üretmesi DNA için zararlı sonuçlar doğurabilmekte, bu sebeple mikronukleus frekansını

arttırabilmektedir. Çeşitli *in vitro* çalışmaları bu görüşü desteklemektedir (Sadiq ve ark. 2012; Shukla ve ark. 2013).

Çalışmada yapılan mikronükleus testinde incelenen 1000 eritrosit aynı deney grubuna ait üç farklı *Carassius auratus* bireyinden elde edilmiştir. İnceleme ışık mikroskobundan gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlarda herhangi bir grupta anlamlı sayıda mikronükleus gözlemlenmemiştir. Bahsedilen mikronükleus testinin sonuçları Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.6.** Farklı konsantrasyon ve sürelerde TiO<sub>2</sub> NP ile yüksek CO<sub>2</sub>'in Mikronükleus oluşumuna etkisi (siyah ok). **A:** Negatif kontrol. **B:** Pozitif kontrol. **C:** 1 Hafta, 20mg/L CO<sub>2</sub>, 5µg/L TiO<sub>2</sub> NP. **D:** 2 Hafta, 20mg/L CO<sub>2</sub>, 10µg/L TiO<sub>2</sub> NP. **E:** 3 Hafta, 20mg/L CO<sub>2</sub>, 20µg/L TiO<sub>2</sub> NP. **F:** 1 Hafta, 30mg/L CO<sub>2</sub>, 5µg/L TiO<sub>2</sub> NP. **G:** 2 Hafta, 30mg/L CO<sub>2</sub>, 10µg/L TiO<sub>2</sub> NP. **H:** 3 Hafta, 30mg/L CO<sub>2</sub>, 20µg/L TiO<sub>2</sub> NP.

Bahsedilen bulgulara ek olarak gruplar arasında da anlamlı bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Yapılan literatür araştırmalarında da buna benzer sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Avrupa Levreği'ne 1 mg/L TiO<sub>2</sub> NP ve 0.1 mg/L CdCl<sub>2</sub>'ün birlikte uygulandığı çalışmada negatif kontrolle kıyaslandığında herhangi bir kromozomal farklılığa rastlanmamış ve bu sebeple apoptotik hücrelerde negatif kontrole kıyasla herhangi bir artış olmadığı sonucunda varılmıştır (Santonastaso ve ark. 2015). 1 mg/L, 10 mg/L ve 100 mg/L

TiO<sub>2</sub> NP'ü 96 saat boyunca *Piarcartus mesapotemic* bireyelerine uygulanmış ve mikronükleus oluşumu gözlemlenmemiştir. Deneyde eritrosit nükleuslarında çeşitli morfolojik değişiklikler gözlemlense de dozlara bağlı bir korelasyon görülememiştir (Clemente ve ark. 2013). Başka bir çalışmada ise 21 gün boyunca 100 mg/L TiO<sub>2</sub> NP maruz bırakılan *Piarcartus mesapotemic* bireyelerine Mikronükleus testi uygulanmıştır. Testin sonuçlarında mikronükleus oluşumu gözlemlenmemiştir (Fraceto ve ark. 2014). Bununla beraber *Carassius auratus* deri hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmada 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 100 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP verilmiştir. Bunun sonucunda mikronükleus sonuçları anlamlı çıkmıştır (Reeves ve ark. 2008).

Bu sonuçlar mikronükleus oluşumunun önlenmesinde hücrel olmaktan çok organizmanın tamamını ilgilendiren çeşitli yolların görev almış olma ihtimaline işaret etmektedir. Aynı zamanda oluşan DNA hasarının kromozom kırıklarının tamirinin önüne geçecek derecede büyük ölçekte gerçeklememesi de mümkündür. Tamir edilmeyen kromozom kırıkları hücre bölünmesinin G<sub>1</sub> evresinde her iki kromatidde de gerçekleşerek meydana gelmektedir. Birleşmeyen kırık sonucu oluşan asentrik parçalar hücre bölünmesinin metafazında kaybolabilir. Kaybolmadığı durumlarda ise mikronükleus oluşumu görülür (Mamur ve ark. 2018).

Bu bilgiler ışığında yüksek CO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> NP'nün uygulanan konsantrasyonları sonucu oluşan reaktif oksijen türler ve mutajenik ajanlar *Carrissus auratus* bireyelerinin eritrositlerinde mikronükleus oluşumuna neden olmadığı düşünülebilir.

### 3.4. Davranış Farklılıkları

30 mg/L CO<sub>2</sub>'e maruz bırakılan *Carassius auratus* bireyelerinin fiziksel aktivitelerinin zaman içerisinde azaldığı, 3 haftanın sonunda ise hareket kapasitelerini minimumda tuttukları gözlemlenmiştir. Bununla beraber aynı grupta solunumun hızlandığı da gözlemlenmiştir. CO<sub>2</sub> sebebiyle kanın pH değeri düşmekte ve bireyeler solunum hızını arttırarak kandaki düşük pH'ı kompanse etmeye çalışmaktadır. Ancak solunum sırasında tekrar vücuda alınan CO<sub>2</sub>, kandaki asit-baz düzenlemesi ile ilgili sorunları tekrarlatmaktadır (Gilmour 2001). Solunumun artması oksijen ve CO<sub>2</sub> dışında çeşitli iyonların alımı ve atımını da hızlandıracağı için bireyeler osmoregülasyonun düzenlenmesi adına daha fazla enerji harcamaktadır (Sardella ve Brauner 2007). Suyun ve buna bağlı olarak da kanın pH'ının değişmesi homoestazi için daha fazla enerji gerektirmektedir. Buna bağlı olarak da üreme, büyüme gibi hayati olmayan çeşitli fonksiyonların yavaşlaması kaçınılmazdır (Ern ve Esbaugh 2016). Deney grubunda gözlemlediğimiz yüzme frekansının azalması ve zamanla durması da yukarıda anlatılan

nedenlerle açıklanabilmektedir. Ventilasyonun artması ve yüzme aktivitesinde görülen düşüş çeşitli çalışmalarda da ortaya çıkmıştır (Deigweiher ve ark. 2010; Enzor ve ark. 2013). Bütün bunların yanında nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçebilmesi sebebiyle nörotoksositeye sebep oldukları bilimektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda TiO<sub>2</sub> NP'nün beyinde biriktiğini ortaya koymuştur ve bununla beraber beyindeki çeşitli iyon pompalarının aktivitesini de etkilediği bilinmektedir (Ramsden ve ark. 2009). Aynı zamanda buna bağlı olarak laterizasyon problemleri de çeşitli balık türlerinde gözlemlenmiştir (Boyle ve ark. 2013). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda yüzme fitnessındaki düşüşün altında yatan mekanizmanın aydınlanması için daha fazla çalışma gerekmektedir.

Gözlemlere dayanan incelemeler sonunda bulunan başka bir olgu ise çeşitli deney gruplarında artan mukus salgısı olmuştur. 3 hafta boyunca 20 mg/L CO<sub>2</sub> uygulanan gurptaki bireylerin üzerini örten mukus tabakasında ve onunla beraber 2 hafta ve 3 hafta uygulanan 30 mg/L CO<sub>2</sub> deney düzeneklerinde bulunan *Carassius auratus* bireylerinde de mukus salgısının arttığı gözlemlenmiştir. Buna benzer bulgu TiO<sub>2</sub> NP ile yapılan başka bir deneyde daha gözlemlenmiştir (Federici ve arl. 2007) ve vücudun savunma sisteminin akriyasyonu olarak tarafımızca değerlendirilmiştir.

### **3.5. Histopatolojik Analiz**

Histolojik analiz için her deney grubundan diseksiyon sonrası muhafaza edilen solungaç ve karaciğer dokuları daha önce anlatılan işlemlerden geçirilerek hematoksilen ve eozin boyaları ile boyanmıştır. Ardından entellan ile kapatılarak mikroskopta incelenmiştir. Negatif deney grubu ve EMS uygulanarak oluşturulan pozitif kontrol grubu da bu işlemlerden geçirilerek karşılaştırma yapılmıştır. Pozitif kontrol 5 mg/L EMS kullanılarak dizayn edilmiştir. İncelenen tüm preparatlar ve değerlendirilen bulgular sonucunda solungaç ve karaciğer dokularında çeşitli histopatolojik bulgular tespit edilmiştir. Karaciğer ve solubngaç dokularından elde edilen sonuçların özetlendiği tablolar Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.'deki gibi özetlenmektedir.

Solungaçlarda en çok gözlemlenen patolojik bulgu hiperplazi ve füzyon olmuştur. Hiperplazi hücre sayısındaki artıştan kaynaklanan doku büyümesi olarak tanımlanırken füzyon sekonder lamellerin birleşerek tek bir yapı haline gelmesi olarak tanımlanabilmektedir. Hiperplazi ve füzyonun ardından en çok gözlemlenen histopatolojik bulgu hipertrofi olmuştur. Hipertrofi ise hücrelerin büyüklüğü sebebiyle doku büyümesine verilen isimdir 20 ve 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonları karşılaştırıldığında iki grup arasında patolojik olarak anlamlı bir fark

gözlemlenmemektedir. Ancak her iki CO<sub>2</sub> grubunda da 2. Haftada uygulanan 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP uygulanan gruplarda görülen histopatolojik değişimlerin, diğer gruplara göre daha yüksek frekansta gözlemlendiği söylenebilir. . Bu durum Comet analizinde çıkan DNA hasarları tablosu ile korelasyon sağlamaktadır. Balıklar asit baz dengesini sağlayabilmek için sudan gerekli iyonları solungaçları aracılığı ile alması sebebiyle yüksek CO<sub>2</sub>'in solungaçlara büyük ölçüde histopatolojik zarar vermemesi, beklenen sonuçlarla paralellik göstermektedir: İki farklı CO<sub>2</sub> konsantrasyonu arasında histopatolojik olarak büyük bir fark gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte sucul canlılara TiO<sub>2</sub> NP uygulanarak dokulardaki histopatolojik hasarların takibi çeşitli bilim insanları tarafından yapılmıştır: 0,1, 0,5 ve 0,7 mg/L TiO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan bireylerin solungaçlarında primer lamellerinde Hiperplazi ve sekonder lamellerde ödem ve anevrizma gözlemlenmiştir. Federici ve arkadaşları çalışmasının sonunda solungaçlarda gözlemlenen hasarın bu kadar büyük olmasının sebebinin TiO<sub>2</sub> NP'nün hücre içinden absorbasyon ile geçmediği, bunun yerine yüzeyden absorbasyon ile birikebilmiş olabileceği üzerinde durmuştur (Federici ve ark. 2007). Yapılan başka çalışmada ise 100 ve 200 mg/L verilen balıkların solungaçlarında ödem, kalınlıkta artış, Hiperplazi, füzyon, sitoplazma vakuolizasyonu gözlemlenmiştir (Hao ve ark. 2009). Chen ve ark. 2011'de yaptığı çalışmada 1, 2, 3, 4, 5, 7 mg/L TiO<sub>2</sub> NP ile muamele edilen balıklarda primer lamelde hiperplaziye benzer kalınlaşmalar, füzyon ve dejenere olmuş lameller gözlemlenmiştir

Tablolardan da görüldüğü üzere solungaçlarda oluşan hasarlar, karaciğerde oluşan hasarlardan daha dramatiktir. Elde edilen doku görüntülerin resimleri ise Şekil 3.7., Şekil 3.8., Şekil 3.9., Şekil 3.10, Şekil 3.11., Şekil 3.12, Şekil 3.13 Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te gösterilmektedir.

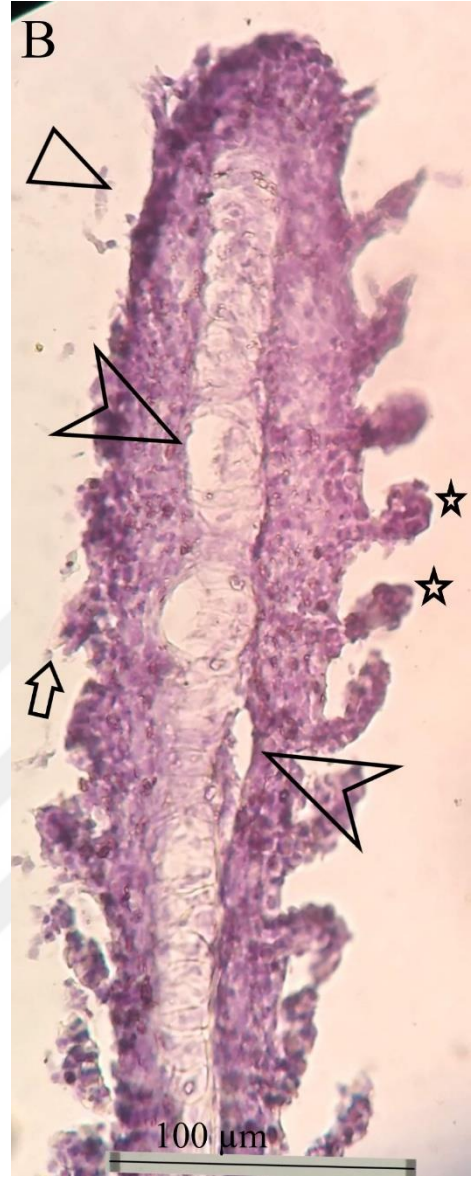
**Tablo 3.6.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı dozlardaki (µg/mL) TiO<sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu solungaçlarda meydana gelen histopatolojik bulgular

Gruplar	Hiperplazi	Hipertrofi	Primer Lamel Kalınlaşması	Disorganizasyon	Füzyon	Lamel Kısalması	Lamel Epitelyumunda Avrılma	Anevrizma	Nekroz
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++	+	-	+	++	+	+	+	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++++	++	+	+	+++	+	+	+	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	++	+	++	+	++	+	+	+	+
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++++	+	++	+	+++++	+	++	+	++
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++++	++	++	+	+++	++	++	+	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	++++	++	++	+	+++	+	+	+	++
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	++	+	+	++	+	+	+	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	+	++	+	+++++	+	+	+	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3Hafta	+++	+	++	+	++++	+	+	+	++

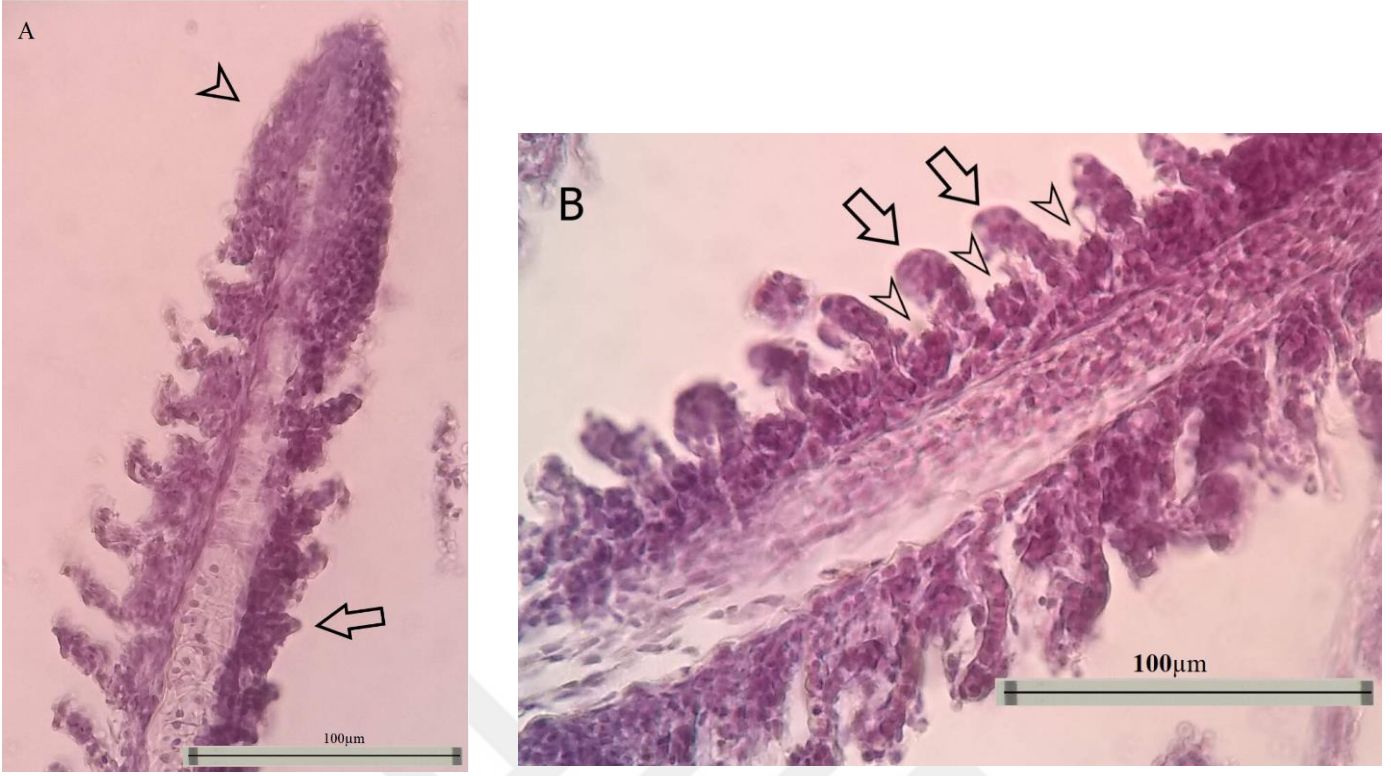


**Tablo 3.7.** 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı dozlardaki (µg/mL) TiO<sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu solungaçlarda meydana gelen histopatolojik bulgular

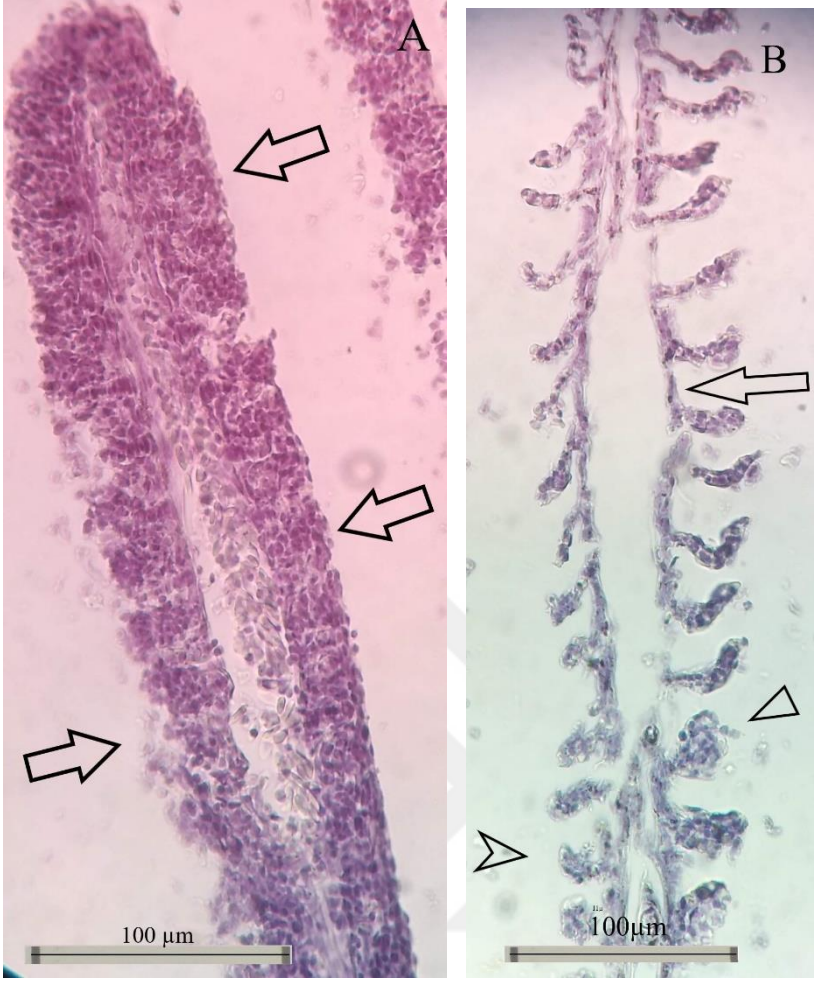
Gruplar	Hiperplazi	Hipertrofi	Primer Lamel Kalınlaşması	Disorganizasyon	Füzyon	Lamel Kısalması	Lamel Epitelyumunda Ayrılma	Anevrizma	Nekroz
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	++	+	-	+	+	+	+	+	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++	++	+	+	++	+	+	+	+
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++++	++	+	+	++++	+	+	+	+
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++	++	++	+	++	++	+	+	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++++	+++	+++	+	++++	++	+	++	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++	+++	+	+	++	++	+	+	+
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	+	+	+	++++	++	+	+	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	++	++	+++	+	+++	+	+	+	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3Hafta	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+	++



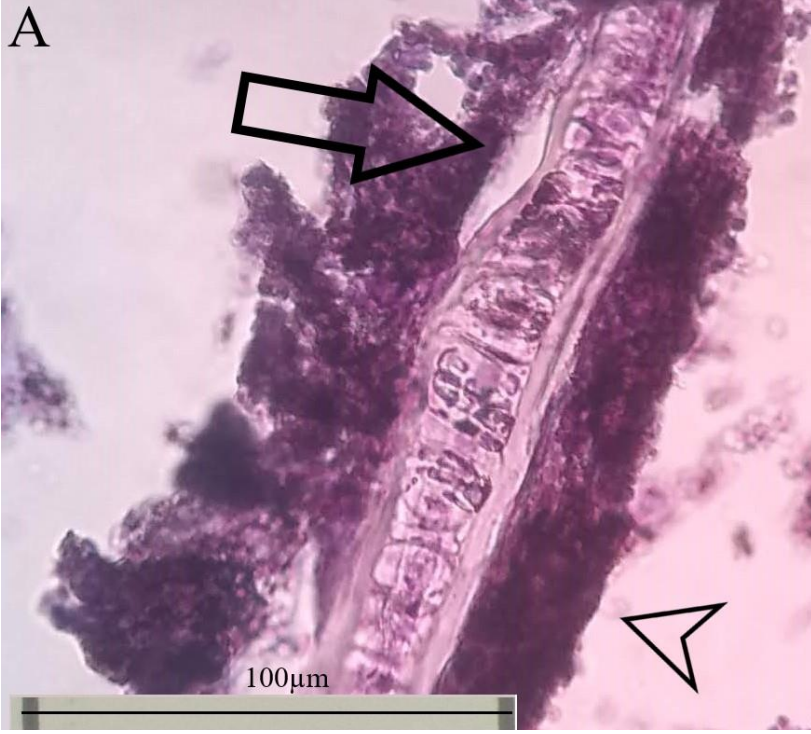
**Şekil 3.7.**Solungaç Pozitif ve negatif kontroller. A. Negatif kontrol, ikincil lamellalar ▲ ,birçil lameller ▲ B. 5 mg/L EMS ile oluşturulan pozitif kontrol. Hipertrofi ☆ ,birçok lamelin füzyonu △ , lamel epitelyumunda ayrılma ▲ .H&E boyama.



**Şekil 3.8.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna bir hafta maruz kalan bireyler **A.** 5 µg/mL TiO<sub>2</sub>'ye maruz kalan bireyler lamel ↑ kısılması ve füzyon ↓ **B.** 10 µg/mL TiO<sub>2</sub>'ye maruz kalan bireylerde meydana gelen hipertrofi ↑ , Hiperplazi ↓ . H&E boyaması.



**Şekil 3.9.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna iki hafta maruz kalan bireyler **A.** 5 µg/mL TiO<sub>2</sub>'ye maruz kalan bireyde füzyon **B.** 10 µg/mL TiO<sub>2</sub>'ye maruz kalan bireylerde lamel kalınlaşması, **↑** Hipertrofi **△** anevrizma **△** . H&E boyaması.



**Şekil 3.10.** 1 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalan bireyler **A.** 5 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP ile muamele sonucu lamel epitelyumunda ayrışma  $\uparrow$  , füzyon  $\blacktriangle$  **B.** 20 µg/mL TiO<sub>2</sub> ile muamele edilen bireylerde birden çok olarak iki-üç sekonder lamelin birleşmesi ile oluşan füzyonlar gözlemlenmektedir. H&E boyaması.



**Şekil 3.11.** 3 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalan bireyler **A.** 10 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP maruz kalan bireylerde anevrizma ↑ ve kısalmış ikincil lamellalar ▲ **B.** 20 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP maruz kalan bireylerde lamellaların ayrışması → , Hiperplazi ▲ H&E boyaması.

Karaciğer dokusunda gözlemlenen anormalilerin frekansı solungaçlarla kıyaslandığında daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi CO<sub>2</sub>'in karaciğer dokusuna direkt etki etmemesi ve kullanılan TiO<sub>2</sub> dozlarının düşük olması olabilmektedir.

Karaciğer dokusunda en sık gözlemlenen patolojik bulgu Hepatositte hipertofi ve vakuolizasyondur. Hepatositin Hipertrofi olması hepatosit hücrelerinin büyümesi nedeni ile dokunun büyümesi olarak tanımlanabilir. Vakuolizasyon ise dokularda oluşan boşluklar olarak tanımlanabilmektedir. Karaciğer dokusunda patolojik bulgular en çok 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda 2 haftalık deneyde ve 20 µg/L TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonunda ve 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda 2 haftalık deneyde ve 10 µg/L TiO<sub>2</sub> NP konsantrasyonunda gözlemlenmiştir.

Bulunan histopatolojik bulgular diğer yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. 100 ve 200 mg/L TiO<sub>2</sub> NP kullanılarak yapılan çalışmada karaciğerde sitoplazmik vakuolizasyon, nekrotik hücreler gözlemlenmiştir (Hao 2009). Şuanki yapılan çalışmada da vakuolizasyon, nükleus şeklinin bozukluğu, nükleus hipertrofisi, hepatosit hipertrofisi, melanomakrofaj agregatları, damar dejenerasyonları, sinüzoid'de kan hücreleri gibi çeşitli histopatolojik farklılıklar gözlemlenmiştir.

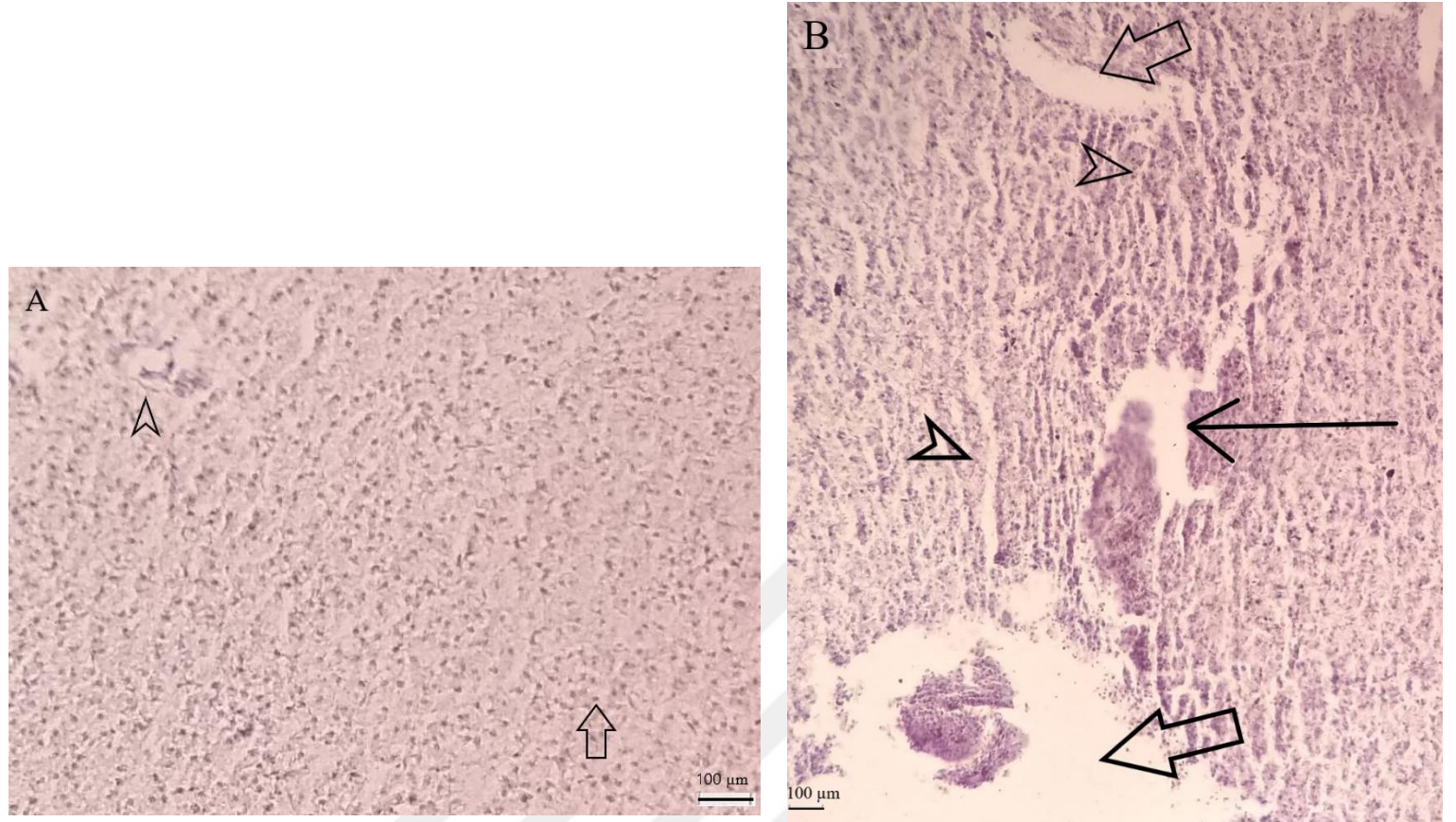
**Tablo 3.8.** 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı dozlardaki (µg/mL) TiO<sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik bulgular

Gruplar	Hepatositte Hipertrofi	Bozuk Şekilli Nükleus	Nükleusta Hipertrofi	Vakuolizasyon	Damar Dejenerasyonu	Sinüzoid'te Kan Hücreleri	Melanomakrofaj Aggregatları
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++	+	+	+	+	++	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	++	-	+	+	+	++	+
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++	-	+	++	+	++	+
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++	-	+++	++	-	-	-
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	++	-	-	++	++	+	-
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	++++	+	++	+++	++	+	++
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	++++	-	+	++++	+	++	+
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	+	++	++	++	+	+
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3Hafta	+++	+	++	+++	++	+	+

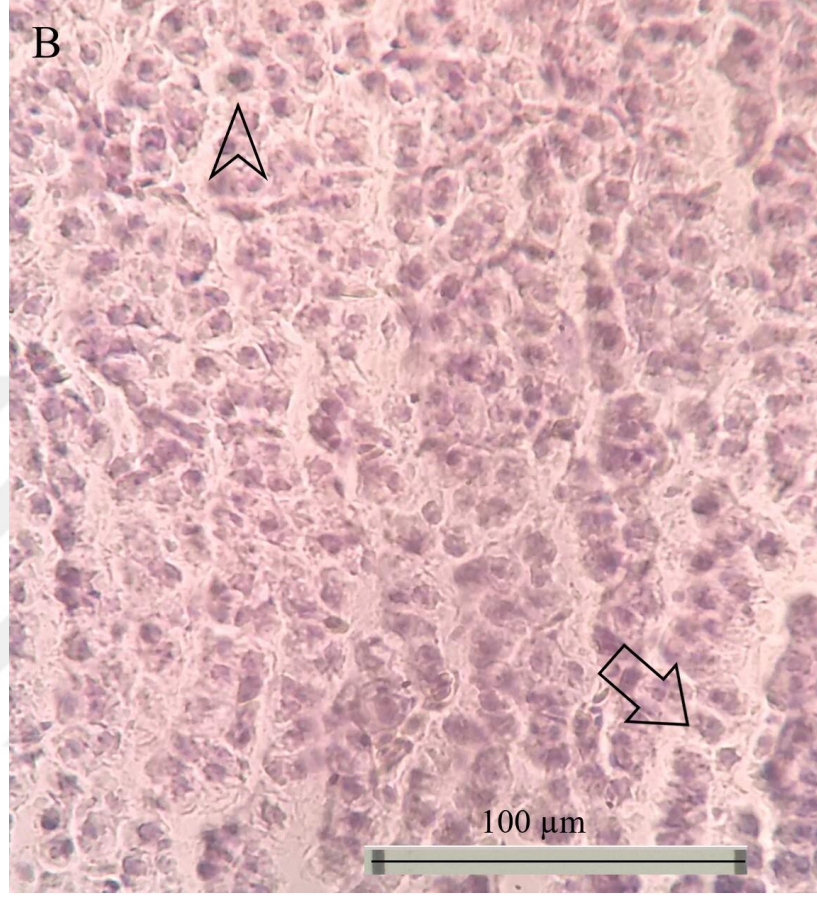
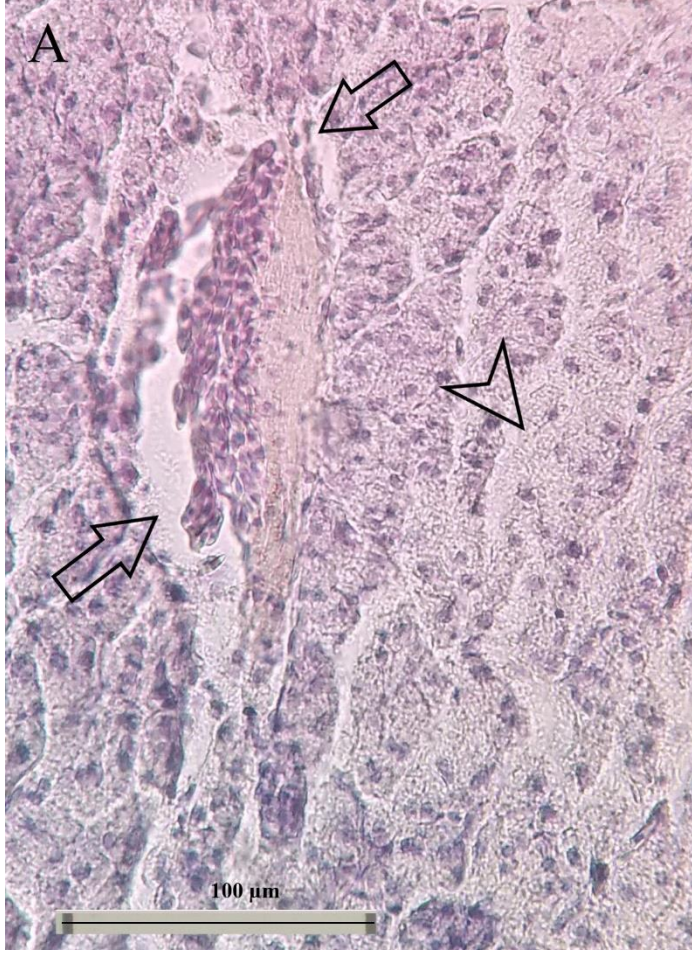


**Tablo 3.9.** 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda farklı dozlardaki (µg/mL) TiO<sub>2</sub> NP'nün farklı sürelerde uygulanması sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen histopatolojik bulgular

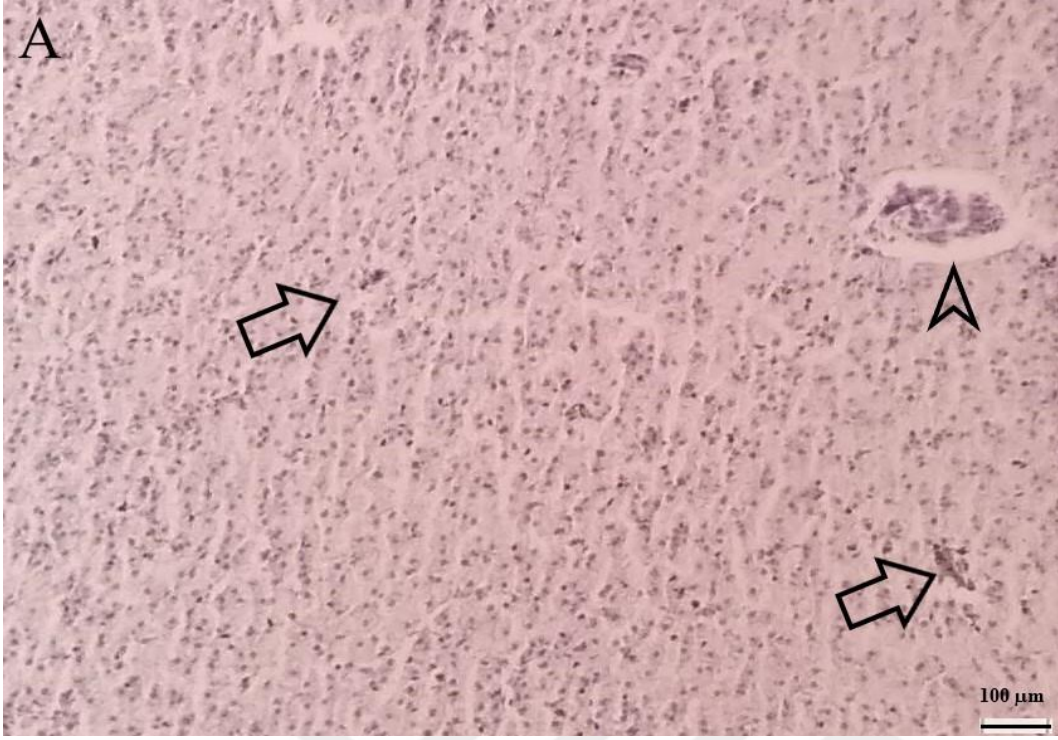
Gruplar	Hepatositte Hipertrofi	Bozuk Şekli Nükleus	Nükleusta Hipertrofi	Vakuolizasyon	Damar Dejenerasyonu	Sinüzoid'te Kan Hücreleri	Melanomakrofaj Agregatları
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	++	-	+	+	+	+	-
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	++++	+	-	++++	+++	+	+
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 1 Hafta	+++	+	-	++	+	+	++
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++	+	-	+++	+	+	-
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	+++	-	-	+++	++++	+	++
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 2 Hafta	++++	+	-	++++	-	-	++
5µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	+	++	+++	-	++	
10µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3 Hafta	+++	+	+	+++	+	-	+
20µg/mL TiO <sub>2</sub> , 3Hafta	++++	+	++	+++	-	-	+



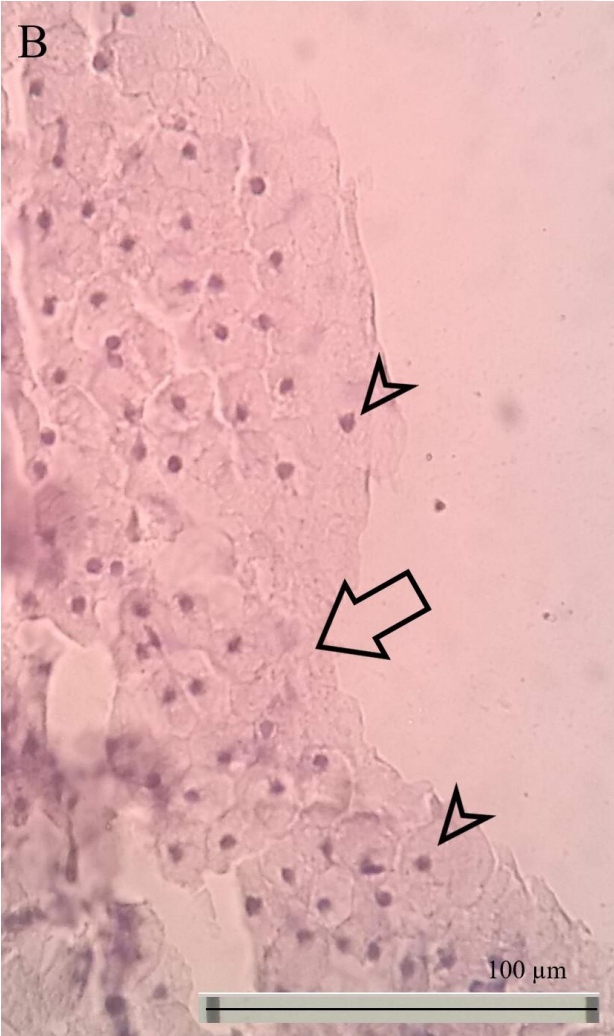
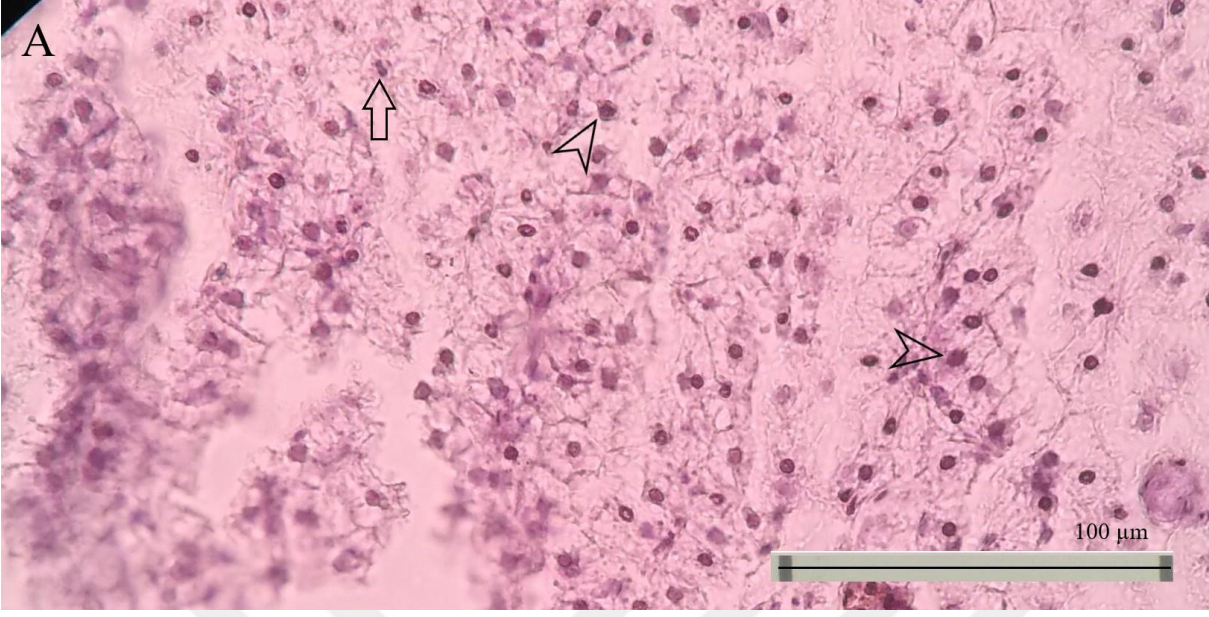
**Şekil 3.12.** Karaciğer negatif ve pozitif kontroller. **A.** Negatif kontrol, damar  $\blacktriangle$  , hepatosit hücresi  $\blacktriangleright$  **B.** Pozitif kontrol (5 mg/L EMS) dejenere olmuş damar  $\blacktriangleright$  , nekroz  $\blacktriangle$  , dejenere olmuş karaciğer dokusu  $\rightarrow$  . H&E boyama.



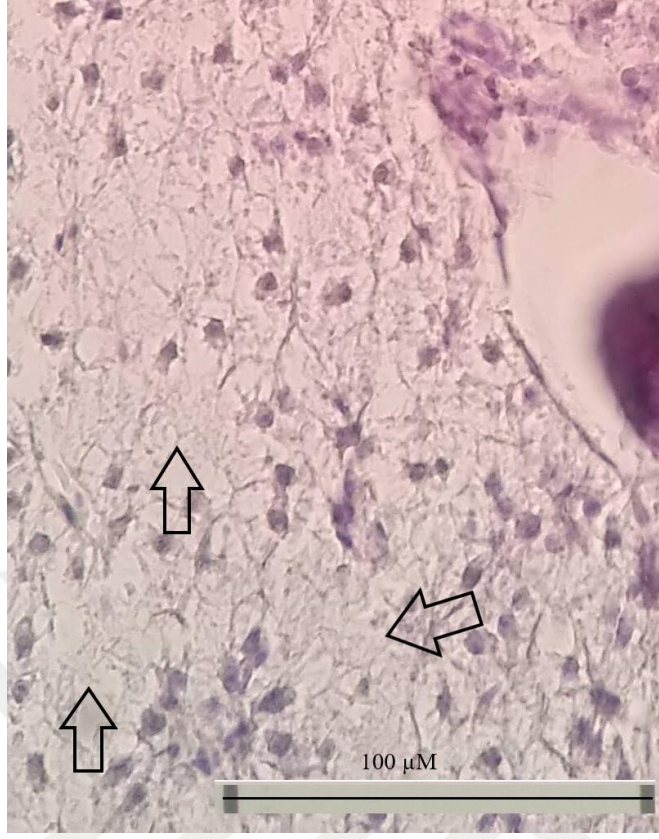
**Şekil 3.13.** 1 Hafta boyunca 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireyler **A.** 5 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP ile muamele edilmesi sonrası damar dejenerasyonu  $\uparrow$  ve Vakuolizasyon  $\blacktriangle$  **B.** 10 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP'e maruz kalması bozuk şekilli nükleus  $\uparrow$  ,nükleusta hipertrofi  $\blacktriangle$  . H&E boyaması.



**Şekil 3.14.** 3 Hafta boyunca 20 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireyler **A.** 10 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP uygulanan grupta sinüzoidlerin etrafında kan hücreleri ↑ , damar dejenerasyonu ▲ **B.** 20 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP uygulanan bireylerde melanomakrofaj agregatları ↑ H&E boyaması. x100 büyütme.



Şekil 3. 15. 2 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireyler **A.** 5 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP ile hazırlanan deneyde bozuk şekilli nükleus ↑ , nükleus hipertrofisi ▲ **B.** 20 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP ile hazırlanmış olan deneyde vakuolizasyon ↑ , hepatosit hipertrofisi ▲ H&E boyaması.



**Şekil 3. 16.** 3 Hafta boyunca 30 mg/L CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kalmış bireylerden 10 µg/mL TiO<sub>2</sub> NP ile hazırlanan deneyde vakuolizasyon ↑ H&E boyama.

#### 4. SONUÇLAR

İnsan nüfusunun hızlı artışı, teknolojik gelişmeler ve bu gelişmeler sonucu oluşan atıklar her geçen gün doğayı ve canlıları tehdit etmektedir. Doğaya geri dönen atıkların çeşitli ve miktarının fazla olması bu toksik ajanların canlılar üzerindeki etkisinin tam bilinmemesine neden olmaktadır. Akuatik sistemde bu tez konusunu kapsayan iki etkenin birbiri ve çevre ile etkileşimi sırasında çeşitli başlıklar altında toplanabilmektedir. Bunlar ise;

1) Özellikle karbon emisyonu sonucu atmosfere yayılan ve bu şekilde sucul sistemlere giren CO<sub>2</sub> miktarı her geçen gün artmakta ve sudaki toksik ajanlarla beraber büyük tehdit oluşturmaktadır. Özellikle doğaya dönen miktarı trilyon tonları bulan TiO<sub>2</sub> NP'nün suda bulunma miktarı ile birleştiği zaman canlıların üzerindeki etkileri iyice araştırılmalıdır.

2) Doğal ortamda bulunan güneş etkisi de düşünüldüğü zaman, TiO<sub>2</sub> NP'nün fotokatalitik etkisi sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin su kimyası ve sucul canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

3) Özellikle CO<sub>2</sub>'in ortamın pH'ını asidiğe kaydıracağı düşünülürse farklı pH'larda TiO<sub>2</sub> NP'nün fizikokimyasal özelliklerindeki değişimler de sucul ekosistemdeki toksik etkiyi değiştirebilmektedir.

4) Aynı zamanda çeşitli elemenleri tutarak onların da canlı vücuduna girmesini sağladığı düşünülürse CO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> NP arasındaki ilişkinin su toksikolojisi için önemli su götürmezdir.

Yapılan bu tez çalışmasında TiO<sub>2</sub> NP genotoksitesini ve sitotoksitesinin CO<sub>2</sub> seviyesine bağlı olarak arttığı comet analizi deneyi, mikronükleus deneyi ve histopatolojik incelemeler sonucu ortaya çıkmıştır. *Carassius auratus* bireylerinde genotoksik etki yarattığı, DNA'ya zarar verdiği ortaya konmuştur. Aynı zamanda incelenen dokular, hücresel boyutta çeşitli anormallerin tespitinin yapılmasını sağlamıştır. Bu incelemelerle beraber yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonları ve TiO<sub>2</sub> NP'nün sinerjik etki yaratarak organizmalara daha fazla zarar verdiği tarafımızca gözlemlenmiş ve bu sinerjik etkinin altında yatan mekanizmaların açığa çıkmasında yardımcı olunmaya çalışılmıştır.

Yüksek CO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> NP'nün toksik etki yarattığı bilirse de dokularda biriken TiO<sub>2</sub> NP miktarında herhangi bir sinerjik etkinin olup olmadığı veya dokularda gelişen serbest radikallerin anti-oksidant sistemindeki cevabı bilinmemektedir.

Küresel ısınma sonucu doğaya dönen CO<sub>2</sub> miktarı ve teknolojik gelişmeler sonucu doğaya karışan nanopartikül miktarı her geçen gün artmakta ve doğayı kirletmektedir. Bu iki ajanın etkilerinin derinlemesine araştırılması gelecekteki su ekosisteminin yaşatılması ve korunması için büyük önem arz etmektedir.





## KAYNAKLAR

- Adams, L. K., Lyon, D. Y., ve Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19), 3527–3532.
- Ashwood, P., Thompson, R.P.H., Powell, J.J. (2007) Fine particles that adsorb lipopolysaccharide via bridging calcium cations may mimic bacterial pathogenicity towards cells. *Exp Biol Med* 232,107–117.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R., Bottero, J.Y., (2006) In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxicological study. *Environmental Science and Technology* 40 (14), 4367–4373.
- Australian Government, (2006) Safety of Sunscreens Containing Nanoparticles of Zinc Oxide or Titanium Dioxide. <http://www.tga.gov.au/npmuds/sunscreen-zotd.html>
- Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghisassi, F.E., Coglianò, V., (2006) Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* 7, 295–296.
- Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., (2013) Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ. Pollut.* 186, 257–271.
- Barmo, C., Ciacci, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., Canesi, L., (2013) In vivo effects of n-TiO<sub>2</sub> on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 9(18), 132–133.
- Baker, D.W., Matey, V., Huynh, K.T., Wilson, J.M., Morgan, J.D., Brauner, C.J. (2009) Complete intracellular pH protection during extracellular pH depression is associated with hypercarbia tolerance in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1868–R1880.
- Bermudez, E., Mangum, J.B., Wong, B.A., Asgharian, B., Hext, P.M., Warheit, D.B., Everitt, J.I., (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 77, 347–357.

- Beyer, L., Fründ, R., Schleuß, U. ve Wachendorf, C. (1993). Colluvisols under cultivation in Schleswig-Holstein. 2. Carbon distribution and soil organic matter composition. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.*, 156, 213–217.
- Borg-Neczak K, Tjalve H (1996) Uptake of Hg-203(2+) in the olfactory system in pike. *Toxicol Lett* 84,107–112.
- Boyle, D., Al-Bairuty, G.A., Ramsden, C.S., Sloman, K.A., Henry, T.B., Handy, R.D., (2013) Subtle alterations in swimming speed distributions of rainbow trout exposed to titanium dioxide nanoparticles are associated with gill rather than brain injury. *Aquat. Toxicol.* 126, 116–127.
- Brauner, C.J., Baker, D.W. (2009) *Patterns of Acid-Base Regulation During Exposure to Hypercarbia in Fishes*. Berlin: Springer.
- Burçak, G., ve Andican, G. (2004). Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(4), 159-169.
- Caldeira, K. and Wickett, M. E. (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean, *J. Geophys. Res.*, 110.
- Cameron, J.N., Iwama, G.K. (1989) Compromises between ionic regulation and acid-base regulation in aquatic animals. *Can J Zool* 67, 3078–3084.
- Campbell, P.G.S., Stokes, P.M. (1985) Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can J Fish Aquat Sci* 42:2034–49.
- Chen, J., Dong, X., Xin, Y., ve Zhao, M. (2011). Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. *Aquatic Toxicology*, 101(3–4), 493–499.
- Chen, J., Poon, CS., (2009) Photocatalytic construction and building materials: from fundamentals to applications. *Build Environ* 44:1899–906.
- Chen, Q., Zhang, Z.J., (1998) Size-dependent superparamagnetic properties of MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel ferrite nanocrystallites. *Applied Physics Letters* 73 (21), 3156.
- Chen, T.H., Lin, C.Y., Tseng, M.C., (2011A) Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Pollution Bulletin* 63, 303e308.

- Cho, W.S., Kang, B.C., Lee, J.K., Jeong, J., Che, J.H., Seok, S.H., (2013) Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. Part. Fibre Toxicol. (10), 1-10.
- Chung, IM., Rajakumar, G., Gomathi, T., (2017) Nanotechnology for human food: advances and perspective. Front Life Sci 10(1), 63–72.
- Clark, T.D., Sandblom, E., Jutfelt, F. (2013) Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. J Exp Biol 216, 2771–2782.
- 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-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. Science of the Total Environment, 463–464, 647–656.
- Clemente, Z., Castro, V. L., Jonsson, C. M., Fraceto, L. F. (2012). Ecotoxicology of Nano-TiO<sub>2</sub> An Evaluation of its Toxicity to Organisms of Aquatic Ecosystems. International Journal of Environmental Research, 6(1), 33–50.
- Cole, J.J., Prairie, Y.T., Caraco, N.F., McDowell, W.H., Tranvik, L.J., Striegl, R.G. (2007) Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. Ecosystems, 10, 171–184.
- Concepcion, A.R., Lopez, M., Ardura-Fabregat, A., Medina, J.F. (2012) Role of AE2 for pH<sub>i</sub> regulation in biliary epithelial cells. Front Physiol 4, 413.
- Czajka, M., Sawicki, K., Sikorska, K., Popek, S., Kruszewski, M., Kapka-Skrzypczak, L. (2015). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. Toxicology in Vitro, 29(5), 1042–1052
- Deigweier, K., Hirse, T., Bock, C., Lucassen, M., Pörtner, H.O. (2010) Hypercapnia induced shifts in gill energy budgets of Antarctic notothenioids. J Comp Physiol B 180, 347–359.
- Demirel, S., Zamani, A. (2002) Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı.
- Devine, B. M., Munday P. L., Jones G. (2012a) Rising CO<sub>2</sub> concentrations affect settlement behaviour of larval damselfishes. Coral Reefs 31, 229–238.

- Devine, B. M., Munday, P.L. (2012b) Habitat preferences of coral-associated fishes are altered by short-term exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *Marine Biol* 1–8.
- Devine, B.M., Munday, P.L., Jones, G.P. (2012c) Homing ability of adult cardinalfish is affected by elevated carbon dioxide. *Oecologia (Berl)* 168, 269–276.
- Dixson, D. L., Munday, P. L. Jones, G. P. (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecol. Lett.* 13, 68–75.
- Domenici, P., Allan, B. J. M., Watson, S.A., McCormick, M. I., Munday, P.L. (2014) Shifting from right to left: The combined effect of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on behavioural Lateralization in a Coral Reef Fish. *Plos one*, 9(1), e87969
- Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., (1997) Effects of Particle Exposure and Particle-elicited Inflammatory Cells on Mutation in Rat Alveolar Epithelial Cells. *Carcinogenesis* 18, 423–30.
- Du, X., Gao, S., Hong, L., Zheng, X., Zhou, Q., Wu, J. (2019). Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the mouse lymphoma assay and the Ames test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 838(October 2018), 22–27.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 163–182.
- Edwards, S.L., Wall, B.P., Morrison-Shetlar, A., Sligh, S., Weakley, J.C., Claiborne, J.B. (2005) The effect of environmental hypercapnia and salinity on the expression of NHE-like isoforms in the gills of a euryhaline fish (*Fundulus heteroclitus*). *J Expl Zool A Comp Expl Biol* 303A, 464–475.
- Enzor, L. A., Zippay, M. L., Place, S. P. (2013). High latitude fish in a high CO<sub>2</sub> world: Synergistic effects of elevated temperature and carbon dioxide on the metabolic rates of Antarctic notothenioids. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 164(1), 154–161.
- Ern, R., Esbaugh, A. J. (2016) Hyperventilation and blood acid–base balance in hypercapnia exposed red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 186(4), 447–460.

- Esbaugh, A. J., Heuer, R., Grosell, M. (2012). Impacts of ocean acidification on respiratory gas exchange and acid-base balance in a marine teleost, *Opsanus beta*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(7), 921–934.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P. (2005) The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 85, 97–177.
- Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1), 81–95.
- Federici, G., Shaw, B. J., Handy, R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 415–430.
- Fenech, M. (2000) The in vitro Micronucleus Technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Fraceto, L. F., Castro, V. L., N.Maia, A. H., Clemente, Z., Jonsson, C. M., Feitosa, L. O., Lima, R. (2014) Biomarker Evaluation in Fish After Prolonged Exposure to Nano-TiO<sub>2</sub>: Influence of Illumination Conditions and Crystal Phase. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(7), 5424–5433.
- French, R. a., Jacobson, A. R., Kim, B., Isley, S. L., Penn, R. L. E. E., Baveye, P. C. (2009). Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 43(5), 1354–1359.
- Fujishima, A., Hashimoto, K. ve Watanabe, T., (1999). *TiO<sub>2</sub> Photocatalysis, Fundamentals and Applications*, BKC, Inc Publishers, Japan.
- Furrer, G., Phillips, B. L., Ulrich, K. U., Pöthig, R., Casey, W. H. (2002). The origin of aluminum flocs in polluted streams. *Science*, 297(5590), 2245–2247.
- Gazeau, F., Quiblier C., Jansen, J. M., Gattuso, J.-P., Middelburg, J. J., Heip, C. H. R. (2007) Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification, *Geophys. Res. Lett.*, 34, L07603.
- Gilbert, B. (2005). Molecular-Scale Processes Involving Nanoparticulate Minerals in Biogeochemical Systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59(1), 109–155.

- Gilmour, K. M. (2001). The CO<sub>2</sub> pH ventilatory drive in sh. *Glass*, 219–240.
- Gottschalk, F., Sondere, T., Schols, R., Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials for Different Regions. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9216–9222.
- Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environ.Pollut.* 181, 287–300.
- Greenwood, N. N., Earnshaw, A., (1984) *Chemistry of the Elements*. Pergamon Press. 1117-19. Oxford, A.B.D.
- Griffitt, R. J., Hyndman, K., Denslow, N. D. and Barber, D. S. (2009). Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Science*, 17 (2), 404-415.
- Gupta, S., Moulik, SP., (2008) Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. *J Pharm Sci* 97, 22–45.
- Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y. (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213, 66–73.
- Hamilton, P. B., Rolshausen, G., Uren Webster, T. M., Tyler, C. R. (2017). Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1712).
- Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., Tyler, C. R. (2008). Manufactured nanoparticles: Their uptake and effects on fish - A mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, 17(5), 396–409.
- Handy, R.D., Eddy, F.B. (2004) Transport of solutes across biological membranes in eukaryotes: an environmental perspective. In: van Leeuwen HP, Koester W *Physicochemical kinetics and transport at chemical–biological interphases*, IUPAC series. John Wiley, Chichester, pp 337–356.

- Hao, L., Wang, Z., Xing, B. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub>nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Sciences, 21(10), 1459–1466.
- Hartwig, A., (1998) Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett. 102-103, 235–239
- Hasler, C. T.,ButmanD., Jeffrey, J. D., Suski, C. D. (2016) Freshwater biota and rising pCO<sub>2</sub> Ecology Letters. 19, 98–108.
- Hazel, J.R., Garlick, W.S., Sellner, P.A.(1978) Effects of assay temperature upon pH optima of enzymes from poikilotherms-test of imidazole alphasat hypothesis. J Comp Physiol A 123, 97–104.
- Heuer, R. M., Grosell, M. (2014) Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 307, R1061–R1084.
- Holschneider DP, Chen K, Seif I, Shih JC. (2001) Biochemical, behavioral, physiologic, and neurodevelopmental changes in mice deficient in monoamine oxidase A or B. Brain Res Bullet 56, 453–462.
- Huang, S., Chueh, P. J., Lin, Y. W., Shih, T. S., Chuang, S. M. (2009). Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure. Toxicology and Applied Pharmacology, 241(2), 182–194.
- Huerta, I., Barasoain, M., Télez, M., Longa, M., Muga, J., Barrenetxea, G., Ortiz-Lastrad, E., Gonzálezd, J., Criado, B. and Arrieta, I., (2014) Genotoxic evaluation of five Angiotensin II receptor blockers: In vivo and in vitro micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 767, 1-7.
- Ikuta, K., Munakata, A., Aida, K., Amano, M. Kitamura, S. (2001) Effects of low pH on upstream migratory behavior in land-locked sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*. Wat. Air Soil Pollut. 130:99–106.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M. Kikkawa, T. (2008) Fishes in high CO<sub>2</sub> acidified oceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. 373:295–302.

Johnson, A.C., Bowes, M.J., Crossley, A., Jarvie, H.P., Jurkschat, K., Jørgensen, M.D., Lawlor, A.J., Parkd, B., Rowland, P., Spurgeon, D., Svendsen, C., Thompsone, I.P., Barnese, R.J., Williams, R.J., Xu, N. (2011) An assessment of the fate, behaviour and environmental risk associated with sunscreen TiO<sub>2</sub> nanoparticles in UK field scenarios. *Sci Total Environ* 409, 2503–2510.

Judy, J. D., Unrine, J. M., Bertsch, P. M. (2011). Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain, *45(2)*, 776–781.

Jutfelt, F., Bresolin de Souza, K., Vuylsteke, A., Sturve, J. (2013) Behavioural disturbances in a temperate fish exposed to sustained high-CO<sub>2</sub> levels. *PLoS One* 8.

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., ... Boller, M. (2008). Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 156(2), 233–239.

Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z., (2010) Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1962–1967.

Kidder, G.W., Petersen C.W., Preston .R.L. (2006) Energetics of osmoregulation: I. Oxygen consumption by *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* 305A, 09–317.

Kirk, J.T.O. (1994) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*: 2nd Edition. Cambridge

Kitamura, S. Ikuta, K. (2000) Acidification severely suppresses spawning of hime salmon (land-locked sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*). *Aquat. Toxicol.* 51, 107–113.

Kosmulski, M. (2009). pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 337, 439–448

Krumschnabel, G., Manzl, C., Schwarzbaum, P.J. (2001) Regulation of intracellular pH in anoxia-tolerant and anoxia-intolerant teleost hepatocytes. *J Exp Biol* 204, 3943–395.

Kuang, DM., Peng, C., Zhao, Q.(2010) Tumor-activated monocytes promote the expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol* 185, 1544–1549.



Kumar, J., Bansal, A., (2013). Photocatalysis by Nanoparticles of Titanium Dioxide for Drinking Water Purification : A Conceptual and State-of-Art Review, 764, 130–150.

Lanno, R.P., Hicks, B., Hilton, J.W. (1987) Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper. *Aquat Toxicol* 10,251–263.

Li, S., Zhu, H., Zhu, R., (2008) Impact and mechanism of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on DNA synthesis in vitro. *Sci China Ser B Chem* 51, 367–72.

Liu, H. H., & Cohen, Y. (2014). Multimedia environmental distribution of engineered nanomaterials. *Environmental Science and Technology*, 48(6), 3281–3292.

Long, T.C., Saleh, N., Tilton, R.D., Lowry, G.V., Veronesi, B., (2006) Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 40 (14), 4346–4352.

Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. a, Pike, T. W., Blount, J. D., Lindström, J., Metcalfe, N. B. (2011). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation, 100–107.

Mamur, S., Ataseven, N., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. (2018) Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve potasyum sorbat karışımının genotoksik potansiyelinin mikronukleus testi ile belirlenmesi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 1–11.

Márquez-Ramírez, S.G., Delgado-Buenrostro, N.L., Chirino, Y.I., Iglesias, G.G., López-Marure, R., 2012. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology* 302, 146–156.

Marshall, W. S., Grosell, M.(2006) Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. *Physiology of Fishes* (3rd ed.), edited by Evans D and Claiborne JB. Boca Raton, FL: CRC

Matés, J.M., (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83–104.

- McWilliams, P.G., Potts, W.T.W. (1978) Effects of pH and calcium concentrations on gill potentials in brown trout, *Salmo trutta*. *J Comp Physiol* 126:277–286.
- Meehl, G.A., Stocker, T.F., Collins, W.D., Friedlingstein, P., Gaye, A.T., Gregory, J.M., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J.M., Noda, A., Raper, S.C.B., Watterson, I.G., Weaver, A.J., Zhao, Z.C. (2007) Global Climate Projections. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change 2007*, Cambridge, UK: Cambridge University.
- Melzner, F., Gobel, S., Langenbuch, M., Gutowska, M.A., Portner, H.O., Lucassen, M. (2009) Swimming performance in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) following long-term (4–12 months) acclimation to elevated seawater P(CO<sub>2</sub>). *Aquat Toxicol (Amst)* 92, 30–37.
- Mert, H.E., (2006) TiO<sub>2</sub>'nin Fotokatalitik Aktivitesinin Arttırılması, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Michaelidis, B., Spring, A., Portner, H.O. (2007) Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Mar Biol* 150, 1417–1429.
- Moore, M.N. (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ International* 32, 967–976.
- Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgül, S., Golubnitschaja, O., Flammer, J. (2008). Comet assay analysis of single-stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular Vision*, 14(August), 1584–1588.
- Mu, L., Sprando, R., (2010) Application of nanotechnology in cosmetics. *Pharm Res* 27:1746–1749.
- Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, Meekan M, Ferrari MC, Chivers DP. (2010) Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 12930–12934.
- Munday, P .L., Hernaman, V., Dixson, D. L., Thorrold, S. R. (2011) Effect of ocean acidification on otolith development in larvae of a tropical marine fish *Biogeosciences*. 8, 1631–1641.

- Munday, P.L., Crawley, N.E., Nilsson, G.E. (2009) Interacting effects of elevated temperature and ocean acidification on the aerobic performance of coral reef fishes. *Mar Ecol Prog Ser* 388, 235–242.
- Murr, L. E., Esquivel, E. V., Bang, J. J., De La Rosa, G., Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Chemistry and nanoparticulate compositions of a 10,000 year-old ice core melt water. *Water Research*, 38(19), 4282
- Mutlu, Ö. (2015) Çinko Oksit Nanoparçacıklarının (ZnO-NP) İnsan Dermal Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Proteomik Yaklaşımla Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Müller, N.C., Nowack, B.(2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol* 42(12), 4447–53.
- Nilsson, G. E., Dixon, D. L., Domenici, P., McCormick, M. I., Sorensen, C., Watson, S. A., Munday, P. L. (2012) Near-future carbon dioxide levels alter fish behaviour by interfering with neurotransmitter function. *Nature Clim Change* 2, 201–204.
- NRC, (1999). National Research Council, Toxicity of Military Smokes and Obscurants. National Academy Press, v. 2. Retrieved December 23, 2010 from [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=9621&page=1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9621&page=1).
- Oberdörster, G., Ferin, J., Gelein, R., Soderholm, S.C., Finkelstein, J., (1992) Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 97, 193–199.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., Elder, A.C., (2000) Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. Health Effects Institute Research Report 96
- Orlowski, J., Grinstein, S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Arch* 447, 549 –565.
- Osier, M., Oberdörster, G., (1997) Intratracheal inhalation vs. intratracheal instillation: differences in particle effects. *Fund. Appl. Toxicol.* 40 (2), 220–227.
- Palaniappan, P. R., Pramod, K. S. (2011). Raman spectroscopic investigation on the

microenvironment of the liver tissues of Zebrafish (*Danio rerio*) due to titanium dioxide exposure. *Vibrational Spectroscopy*, 56(2), 146–153.

Payan, P., Kossmann, H., Watrin, A., MayerGostan, N., and Boeuf, G. (1997) Ionic composition of endolymph in teleosts: Origin and importance of endolymph alkalinity, *J. Exp. Biol.*, 200:1905–1912.

Perry, S. F., Braun, M. H., Genz J., Vulesevic, B., Taylor, J., Grosell, M., Gilmour, K. M. (2010) Acid-base regulation in the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*): an aglomerular marine teleost. *J Comp Physiol B Biochem Systemic Environ Physiol* 180, 1213–1225.

Perry, S. F., Gilmour, K. M. (2006) Acid-base balance and CO<sub>2</sub> excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Resp Physiol Neurobiol* 154, 199 –215.

Peters, K., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J., Gatti, A.M., Monari, E., (2004) Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 321–325.

Pitkethly, MJ. (2004) Nanomaterials—The driving force. *Nanotoday* 7, 20–29.

Queirós, A.M., Fernandes, J.A., Faulwetter, S., Nunes, J. (2015) Scaling up experimental ocean acidification and warming research: from individuals to the ecosystem. *Glob Change Biol.* 21, 130–143.

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(7), 939–951.

Randall, D. J., Perry, S.F., Heming, T.A.. (1982) Gas transfer and acid-base regulation in salmonids. *Comp Biochem Physiol* 73B, 93–103.

Raupach, M. R., Marland, G., Ciais P., Le Quere, C., Canadell, J. G., Klepper, G., and Field, C. B.(2007) Global and regional drivers of accelerating CO<sub>2</sub> emissions, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104.

Raymond, P. A., Hartmann, J., Lauerwald, R., Sobek, S., McDonald C., Hoover M., (2013) Global carbon dioxide emissions from inland waters, *Nature*, 503, 355–359.

- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N., (2008) Hydroxyl radicals (\*OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.* 640, 113–122.
- Richey, J.E., Brock, J.T., Naiman, R.J., Wissmar, R.C. Stallard R.F. (1980) Organic carbon: oxidation and transport in the Amazon River. *Science*, 207, 1348–1351.
- Riisgård, H.U., (1988) Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of northeast American bivalves. *Marine Ecology Progress Series* 45, 217–223.
- Robichaud CO, Uyar AE, Darby MR, Zucker LG, Wiesner MR. (2009) Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4227-4233.
- Rocco, L., Santonastaso, M., Mottola, F., Costagliola, D., Suero, T., Pacifico, S., Stingo, V. (2015) Genotoxicity assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 223–230
- Rocco, M.C., Bainbridge, W., (2001) *Societal Implications of Nanoscience and Nanotechnology*. Kluwer Academic Publishers, 3(6), 353-360.
- Rocco, M.C., Williams, R.S., Alivisatos, P., (1999) *Nanotechnology Research Directions: Vision for Nanotechnology in the Next Decade*, IWGN Workshop Report, U.S. National Science and Technology Council, Washington, D.C
- Rocco, MC. (2003) Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol*, 14,337–346.
- Roesner, A., Mitz, S. A., Hankeln, T., Burmester, T. (2008). Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*. *FEBS Journal*, 275(14), 3633–3643.
- Sadiq, R., Bhalli, J. A., Yan, J., Woodruff, R. S., Pearce, M. G., Li, Y., Chen, T. (2012) Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> anatase nanoparticles in B6C3F1 male mice evaluated using Pig-a and flow cytometric micronucleus assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1–2), 65–72.
- Saldamlı, İ., Uygun, Ü. (2014). *Gıda Katkı Maddeleri*, Ankara. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 625-668.

- Santonastaso, M., Monaci, F., Corsi, I., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Rocco, L., Nigro, M. (2015). n-TiO<sub>2</sub> and CdCl<sub>2</sub> 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.
- Sardella, B.A., Brauner, C.J. (2007) The osmo-respiratory compromise in fish: the effects of physiological state and the environment. In: Fernandes MN, Rantin FT, Glass ML, Kapoor BG (eds) *Fish Respiration and Environment*. Science Publishers., pp 147–165.
- Schmidt, J., Vogelsberger, W. (2009). Aqueous long-term solubility of titania nanoparticles and titanium(IV) hydrolysis in a sodium chloride system studied by adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Solution Chemistry*, 38(10), 1267–1282.
- Sezer, K., Keskin, M. (2014). Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü Role of the Free Oxygen Radicals on the Pathogenesis of the Diseases, 28(1), 49–56.
- Shaw, B. J., Handy, R. D. (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environment International*, 37(6), 1083–1097.
- Sheng, L., Ze, Y., Wang, L., Yu, X., Hong, J., Zhao, X., Ze, X., Liu, D., Xu, B., Zhu, Y., Long, Y., Lin, A., Zhang, C., Zhao, Y., Hong, F., (2015) Mechanisms of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced neuronal apoptosis in rat primary cultured hippocampal neurons. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 103, 1141–1149.
- Sheng, L., Wang, L., Su, M., Zhao, X., Hu, R., Yu, X., Hong, J., Liu, D., Xu, B., Zhu, Y., Wang, H., Hong, F., (2016) Mechanism of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 31 (2), 163–175.
- Shukla, R. K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A. K., Singh, S., Dhawan, A. (2013) TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. *Nanotoxicology*, 7(1), 48–60.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., (2007) Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic toxicology*, 82, 94–109.

- Sobek S., Algesten G., Bergstrom A.-K., Jansson M. Tranvik L.J. (2003) The catchment and climate regulation of pCO<sub>2</sub> in boreal lakes. *Global Change Biol.*, 9, 630–641.
- Somero, G.N., White, F.N. (1985) Enzymatic consequences under aphastat regulation. In: *Acid-Base Regulation and Body Temperature*.
- Strobel, A., Leo, E., Pörtner, H. O., Mark, F. C. (2013). Elevated temperature and pCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of notothenia rossii. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 166(1), 48–57.
- Sun, H., Zhang, X., Zhang, Z., Chen, Y., Crittenden, J. C. (2009). Influence of titanium dioxide nanoparticles on speciation and bioavailability of arsenite. *Environmental Pollution*, 157(4), 1165–1170.
- Şam, E. D., Ürgen, M., Tepehan, F. Z. (2008). TiO<sub>2</sub> fotokatalistleri (212), 81–92.
- Tarhan, Ö., Gökmen, V., Harsa, Ş., (2010) Nanoteknolojinin Gıda Bilim ve Teknolojisi Alanındaki Uyhulamaları. *Gıda*, 35(3),219-225.
- Telmer, K. Veizeri J. (1999) Carbon fluxes, pCO<sub>2</sub> and substrate weathering in a large northern river basin, Canada: carbon isotope perspectives. *Chem. Geol.*, 159, 61–86.
- Thiruvengadam, M., Rajakumar, G., Min, I. (2018). Nanotechnology : current uses and future applications in the food industry. *3 Biotech*, 1–13.
- 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(22), 8784–8789.
- Tseng, Y. C., Hu, M. Y., Stumpp, M., Lin, L. Y., Melzner, F., Hwang, P. P. (2013). CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification differentially affects development and molecular plasticity along life history of fish (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 165(2), 1190–1130.
- Veranth, J.M., Kaser, E.G., Veranth, M.M., Koch., M., Yost, G.S. (2007) Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol* 4:2.

- Vignardi, C. P., Hasue, F. M., Sartório, P. V., Cardoso, C. M., Machado, A. S. D., Passos, M. J. A. C. R., Phan, N. V. (2015) Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquatic Toxicology*, 158, 218–229.
- Wang, J.J., Sanderson, B.J.S., Wang, H.(2007) Cyto- and genotoxicity of ultrafin TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.* 628, 99–106.
- Wang, R., Hashimoto, K., Fujishima, A., Chikuni, M., Kojima, E., Kitamura, A., Shimohigoshi, M. ve Watanabe, T., (1997). Light-Induced Amphiphilic Surfaces, *Nature*, 388, 431–432.
- Ward, J.E., Shumway, S.E., (2004) Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 300, 83–130.
- Warheit, D.B., Brock, W.J., Lee, K.P., Webb, T.R., Reed, K.L., (2005) Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO<sub>2</sub> particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicol. Sci.* 88 (2), 514–524.
- Watanabe, T., Nakajima, A., Wang, R., Minabe, M., Koizumi, S., Fujishima, A., Hashimoto, K. (1999) Photocatalytic activity and photoinduced hydrophilicity of titanium dioxide coated glass. *Thin Solid Films* 351:260–263
- Wei, C., Lin, W.-Y., Zainal, Z., Williams, N.E., Zhu, K., Kruzic, A.P., Smith, R.L., Rajeshwar, K., (1994) Bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. *Environ. Sci. Technol.* 28, 934–938.
- Wetzel, R.G. (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems* Third Edition, Elsevier Academic Press.
- Winkler, J. (2003). Titanium Dioxide. *European Coatings Literature*.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1444–1452.
- Yoo-iam, M., Chaichana, R., Satapanajaru, T.,(2015) Toxicity , bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae ( *Chlorella sp.* ), water flea ( *Moina*



*macrocopa* ), blood worm ( *Chironomus spp.* ) and silver barb. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(4), 257-264.

Ze, X., Su, M., Zhao, X., Jiang, H., Hong, J., Yu, X., Liu, D., Xu, B., Sheng, L., Zhou, Q., Zhou, J., Cui, J., Li, K., Wang, L., Ze, Y., Hong, F., (2016) TiO<sub>2</sub> nanoparticle-induced neurotoxicity may be involved in dysfunction of glutamate metabolism and its receptor expression in mice. *Environ. Toxicol.* 31 (6), 655–662.

Zhang, X., Hongwen, S., Zhang, Z., Niu, Q., Chen, Y., Crittenden, J.C., (2007) Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere* 67, 160–166.

Zheng, L., Zhao, X., Gui, S., Sang, X., Su, J., Guan, N., Zhu, L., Sheng, L., Hu, R., Cheng, J., Cheng, Z., Sun, Q., Wang, L., Hong, F., (2013) Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere* 92, 1183–1189

Zhu, R.R., Wang, S.L., Zhang, R., Sun, X.Y., (2007). A Novel Toxicological Evaluation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on DNA Structure. *Chinese Journal Of Chemistry*, 25(7), 958–961.

Zhu, X., Zhou, J., Cai, Z., (2011) TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: impact on the toxicity of tributyltin to abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryos. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3753–3758.

Zuelli F., Belser, E., Schmid, D., Liecht, C., Suter, F., (2006) Preparation and Properties of Coenzyme Q10 Nanoemulsions. *Cosmetic Sci Technol*, 40 – 46.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Irmak Bilgiseven  
**Doğum Yeri ve Tarihi:** İstanbul, 08.10.1992  
**Yabancı Dili:** İngilizce  
**E-Posta:** [irmak.bilgiseven@marmara.edu.tr](mailto:irmak.bilgiseven@marmara.edu.tr)

### Öğrenim Durumu

Derece	Bilim/Program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen	Kadıköy Lisesi	2010
Üniversite	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2015
Üniversite	Sağlık Kurumları İşletmeciliği	Anadolu Üniversitesi	2015

### Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Kaluç, N., Gülsoy, N., Mutlu, Ö., Bilgiseven, I. (2019) Comparative evaluation of genotoxic potential of different types of Quantum Dot nanoparticles and Cadmium Chloride salts on primary cultured hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*), 2nd International Conference On Innovations In Natural Science & Engineering.

Bilgiseven, I., Gülsoy, N. (2019). Genotoxic Assessment of Elevated CO<sub>2</sub> Levels With Nano TiO<sub>2</sub> particle on Goldfish (*Carassius auratus*), 4th Eurasian Conference on Civil and Environmental Engineering (ECOCEE), 2019, Istanbul, Turkey