



## Determination the Effectiveness of the Cytotoxic Analysis on the Water Quality Assessments<sup>#</sup>

Nuray Emin<sup>1,3,a,\*</sup>, Ekrem Mutlu<sup>2,3,b</sup>, Ayşegül Emin Güzel<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Kastamonu University, 37150 Kastamonu, Turkey

<sup>2</sup>Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kastamonu University, 37150 Kastamonu, Turkey

<sup>3</sup>Materials Science and Engineering, Institute of Science, Kastamonu University, 37150 Kastamonu, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><sup>#</sup>This study was presented as an oral presentation at the 1<sup>st</sup> International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology (Antalya, TURJAF 2019)</p> <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 29/11/2019 Accepted : 12/12/2019</p> <p><b>Keywords:</b> Water quality Cytotoxicity Cell culture In vivo analysis İncesu Basin</p>	<p>In the studies carried out by us, IC50 value of water was determined by using mesenchymal stem cells and endothelial cell lines in in vitro cultures and positive and negative effect doses on the cells were determined. Depending on the results obtained, the effects on the whole organism, if necessary, can be examined in vivo on subjects. For this purpose, young wistar rats are divided into experimental groups (experimental and control) and their water needs are met with water samples obtained from the study area for 3 to 6 months. Blood and urine samples were taken from the subjects in each group at certain time points and the changes were recorded by analyzing the routine biochemistry and hemogram. In addition, the subjects in the sampling are sacrificed at monthly intervals and general examination of endogenous tissues are performed and liver, kidney and heart tissue samples are taken for histological and chemical analyzes. Some of the tissue samples are homogenized using a microwave and changes in elemental content are determined by ICP_OES. The other part is fixed in 10% formaldehyde and then 5 µm thin sections are examined histopathologically according to freeze sectioning method. These studies showed that although the known methods used in water analysis are very valuable, the water quality study carried out by cytotoxic analysis method provides reliability in terms of observing the direct effects of water quality on living tissue. In the present study, in vitro cytotoxicity studies for water samples taken from İncesu Basin are given as examples because of their striking results. Based on the obtained results, it is suggested that in vitro cytotoxicity tests should be added to routine water quality analyzes.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(2): 478-483, 2020

## Sitotoksik Analizlerin Su Kalitesi Değerlendirmeleri Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 29/11/2019 Kabul : 12/12/2019</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Su kalitesi Sitotoksosite Hücre kültürü In vivo analiz İncesu Havzası</p>	<p>Tarafımızdan yürütülen çalışmalarda in vitro kültürlerde mezankimal kök hücreleri ve endotelial hücre hatları kullanılarak suyun IC50 değeri tespit edilerek hücreler üzerindeki pozitif ve negatif etki dozları belirlenmektedir. Buradan elde edilen sonuçlara bağlı olarak, gerekli olması durumunda tüm organizmadaki etkileri deney hayvanları üzerinde in vivo olarak incelenebilmektedir. Bu amaçla genç wistar sıçanları deney gruplarına (deney ve kontrol) ayrılarak, su ihtiyaçları 3 ila 6 ay süre ile çalışma alanından temin edilen su örnekleri ile karşılanmaktadır. Belirli zaman noktalarında her bir gruptaki deneklerden kan ve idrar numunesi alınarak rutin biyokimya analizleri ile hemogramı analizlenerek değişimler kaydedilmektedir. Ayrıca aylık periyotlarla örnekleme denekler kurban edilerek endojen dokuların genel muayenesi yapılarak histolojik ve kimyasal analizler için karaciğer, böbrek ve kalp dokusundan örnekler alınmaktadır. Doku örneklerinin bir kısmı mikrodalga kullanılarak homojenizat haline getirilir ve element içeriğindeki değişimler ICP_OES ile tayin edilmektedir. Diğer kısmı ise %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra dondurularak kesit alma yöntemine göre 5 µm'lik ince kesitleri alınarak histopatolojik olarak incelenmektedir. Bu çalışmalar göstermişti ki su analizlerinde kullanılan bilindik yöntemler çok kıymetli olsa da sitotoksik analiz yöntemiyle yapılan su kalitesi çalışması su kalitesinin direkt canlı doku üzerinde etkilerinin gözlenmesi açısından güvenilirlik sağlamaktadır. Sunulan çalışmada, sonuçlarının çarpıcılığı nedeniyle İncesu Havzasından alınan su numuneleri için yürütülen in vitro sitotoksosite çalışmaları örnek olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında in vitro sitotoksosite testlerinin rutin su kalitesi analizlerine eklenmesi gerektiği önerilmektedir.</p>

<sup>a</sup> [nurayemin@kastamonu.edu.tr](mailto:nurayemin@kastamonu.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0859-2536>

<sup>c</sup> [ekrem-mutlu@hotmail.com](mailto:ekrem-mutlu@hotmail.com)

<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6000-245X>

<sup>e</sup> [eminguzel.a@gmail.com](mailto:eminguzel.a@gmail.com)

<sup>f</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1600-368X>



## Giriş

Canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için kullanabildikleri su miktarının, dünya üzerindeki toplam su miktarının yaklaşık yüzde biri kadar az olduğu düşünüldüğünde, kullanılabilir ve içilebilir su kaynaklarının korunması ve kirleticilerin etkilerinden uzak tutulması hem insanlar hem de diğer canlılar için ciddi önem arz etmektedir (Yılmaz ve Peker, 2013).

Ekosistemler barındırdıkları su varlığı ve kalitesiyle insana hizmet ederler (Kocataş, 1997). Son yüzyılda nüfus artışı, kentleşme, hızla artan endüstrileşme, atık suların arıtılmaması, sanayi atıklarının kontrolsüz doğaya bırakılması, ormanların bilinçsizce tahribatı, yanlış tarım uygulamaları, ülkelerin yanlış su politikaları kullanılabilir su miktarının azalmasına ve içilebilir suyun kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bütün bunlar insana hizmet eden ekosistemlerin dengesini bozmakta ve hızlı bir su ve çevre kirliliğine neden olmaktadır.

Noktasal veya noktasal olmayan kirlilik kaynaklarından kirleticilerin alıcı ortamını su oluşturmaktadır. Atık sular; nehir, göl, gölet ve deniz gibi alıcı ortamlara ulaştığında, su sütununun, sedimentin biyolojik ve fiziko-kimyasal yapısında oldukça önemli değişikliklere neden olmaktadır (Taş, 2006). Çok hassas ekolojik karaktere sahip olan, genellikle içme suyu temini ve sulama suyu amaçlı kurulan göletler de bu kirleticilere maruz kalabilmektedir (Mutlu ve ark., 2013). Yüzeysel su kaynaklarının büyük bir kısmı, özellikle ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde endüstriyel, tarımsal ve evsel atıkların deşarj edildiği alanlar olmakla birlikte içme, kullanma, sulama ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan kaynaklar durumundadır (Kükre ve Mutlu, 2019).

Bu kaynakların kullanım biçimini belirlemede, yüzey sularının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin bilinmesi önem teşkil etmektedir. Yararlanılabilir su potansiyeli, suyun miktarı ile birlikte kalitesini de ifade etmektedir. Suyun niceliği ile birlikte niteliğinin de bilinmesi, düzenli kontrol edilmesi günümüz dünyasında bir zorunluluk teşkil etmektedir. Bu amaçla yapılan su kalitesi çalışmalarında, parametrelerin ölçümleri ve su kalitesinin belirlenebilmesi için gravimetrik, elektrokimyasal, immünojenik ve bakteriyolojik testler uygulanmaktadır (MEB, 2011).

Bu testlerin, yerine göre hepsi ya da bir kısmı su analizlerinde kullanılmaktadır. Ancak, suyun canlılar tarafından doğrudan ve/veya dolaylı, sürekli kullanımına bağlı olarak gelişebilecek akut ve/veya kronik hastalıkları belirleyecek çalışmalar yapılmamaktadır (Mutlu, 2019). Bu eksiklik değerlendirilerek, su kalitesi analizlerine ilave olarak, suyun canlılar tarafından kullanımına bağlı olarak memeli organizmadaki değişimlerin tespitine yönelik yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir.

Tıbbi cihaz ve malzemeler için ISO-EN-10993 nolu standart kapsamında uygulanan in vitro ve in vivo sitotoksik analizler su kaynaklarının sitotoksitesinin tespiti amacıyla tarafımızdan kullanılmaya başlanmıştır (Emin, 2016). Bu kapsamda 20 alt başlıktan oluşan ISO-EN-10993 nolu standardın 5. alt başlığı hücreye dayalı sitotoksik analizler, uluslararası kabul gören kit ölçümleri ile kalitatif ve kantitatif olarak gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı testler (MTT, XTT vd.) yaygın olarak kullanılmaktadır (Koç ve ark., 2008; Emin ve ark., 2008).

Su kalitesinin fiziko-kimyasal olarak belirlenmesi su havzasının kullanım potansiyelini belirlemede faydalı olmaktadır. Aynı zamanda suyun tarım arazilerinde veya su kaynağından yararlanan canlılar üzerine, dolaylı veya doğrudan insanlar üzerine, olan etkisini belirleyebilmekte suyun kullanım alanları hakkında bize bilgi verebilmektedir. Ancak doğrudan suyun canlılar üzerine etkisini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu eksikliği gidermek üzere suyun canlılar üzerine etkilerini doğrudan belirlemek amacıyla yapılabilecek çalışmalardan birinin sitotoksik analizler olduğu tarafımızdan değerlendirilerek yeni bir yaklaşım denenmiştir. Bu yaklaşım doğrultusunda, in vitro memeli hücre kültürleri üzerinde su numuneleri reaktif madde olarak denenecek IC50 değeri yada biyoyumluluk dozu, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı kitler kullanılarak tespit edilmeye çalışılmaktadır.

## Materyal ve Yöntem

Sitotoksikite çalışmaları ISO-EN-10993 standardı 5. alt başlığına uygun olarak biyomalzeme, ilaç vb. maddelerin canlı hücreler ile in vitro, in vivo, vb. koşullarda etkileştirilmesi ve hücrelerin yaşayabilme etkilerinin tespitine dayalı olarak gerçekleştirilmektedir. Bu analizler sonucunda test edilen materyalin sitotoksik ya da biyoyumlu olduğu sonucu alınmaktadır. Sitotoksik maddeler hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini bozarak hücre ölümüne neden olurken, biyoyumlu olan maddeler ise hücrelerin metabolik faaliyetlerine herhangi bir olumsuz etki yapmamaktadır.

Bu amaçla Kastamonu Üniversitesi'nde Su Kalitesi Laboratuvarı ile Doku Mühendisliği, Biyomalzeme ve Kök Hücre Laboratuvarı koordinasyonu ile su kalitesi analizlerinde yeni bir yöntem olan sitotoksik analiz çalışmalarına başlanmıştır.

Su kalitesi analizlerinde yeni bir yaklaşım olarak kullanılan sitotoksikite analizleri Laboratuvarımızda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olup, test edilen su örneklerinin içeriğine göre farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu analizlerde suyun muhtemel sitotoksik etkisi memeli hücre kültürlerinde test edilmektedir. Elde edilen in vitro sitotoksikite sonuçlarına göre suyun tüm organizmadaki etkileri gerekli görülürse deney hayvanları üzerinde in vivo olarak incelenmektedir.

Bu amaçla su numunesi, ISO-EN-10993'ün 5. alt başlığına göre, öncelikle in vitro hücre kültürlerinde test edilerek sitotoksik özellikleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Çalışma kapsamında su numunesi, sitotoksik bir madde muamelesi görmektedir. Suyun muhtemel sitotoksik veya biyoyumluluk etkisi memeli hücre kültürlerinde, hücre canlılığına dayalı şekilde test edilmektedir. Böylece suyun hücreler üzerindeki etkilerinden yola çıkılarak, su kaynağından dolaylı veya doğrudan yararlanan insanlar ile diğer canlılar üzerine olan etkisi belirlenmeye çalışılmaktadır.

In vitro çalışmalarda mezankimal kök hücreleri ve endotelial hücre hatları kullanılarak suyun maksimum etki dozu olan IC50 değeri ile birlikte hücreler üzerindeki pozitif ve negatif etki dozları belirlenmektedir. In vitro çalışmalarda, vücutta farklı dokulara, önemli olarak bağ ve karaciğer dokusuna farklılaşabilme, bu dokuları tamir

edebilme özelliği nedeniyle daha çok mezankimal kök hücreler tercih edilmektedir. Sonuçta bu hücreler üzerine olan etkileri birden fazla doku için genelleme yapabilmemize imkân sağlamaktadır.

Elde edilen in vitro sitotoksitesine sonuçlarına göre suyun tüm organizmadaki etkileri deney hayvanları üzerinde in vivo olarak incelenebilmektedir. Bu amaçla Kastamonu Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesinde, temin edilen genç wistar sıçanları denek olarak kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda su kalitesi üzerine yürütülen projeler kapsamında gerçekleştirilen sitotoksik analizlere örnek olarak, elde edilen farklı sonuçları nedeniyle, Kastamonu'nun Taşköprü ilçesinde bulunan İncesu Göleti'nde yapılan su kalitesinin değerlendirilmesi ve in vitro sitotoksik analizleri çalışması seçilmiştir. Bu çalışmanın haricinde devam eden 3 araştırma projesinde daha in vitro yaklaşımın yanı sıra in vivo çalışmalar da yapılmaktadır. Bu projelerden iki tanesi Doğa Koruma ve Milli Parklar tarafından desteklenmektedir. Bu çalışma, özellikle elde edilen sitotoksik bulguların su kalitesi SWORM sınıfları ile tam uyumlu olmaması açısından şüpheli bir örnek oluşturduğu için seçilmiştir.

Doğa turizmi, tarım, hayvancılık ve doğal kaynak değerleri bakımından İncesu Havzası önemli bir konumda bulunmaktadır. Kastamonu'ya 54 km, Taşköprü'ye 12 km mesafede bulunan İncesu göleti, Taşköprü'nün İncesu Köyü sınırlarındadır. 3,22 hm<sup>3</sup> depolama hacmi olan ve Taşköprü ilçesinde bulunan tarım arazileri ve bahçeleri sulama amacı ile kullanılan Gölet'in temel akarsu kaynağı İncesu Deresi'dir (Resim 1.).

Öncelikli olarak çalışma bölgesinde tespit edilen 3 istasyondan, yüzey suyu örnekleri alınarak, fiziksel ve kimyasal analizleri yapılmış ve elde edilen verilerin mevsimsel olarak değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir. Yönetmeliğe göre en kirli ay olarak kabul gören aylardan, Kasım ayında numuneler alınarak sterilizasyon işlemi ile içerisindeki mikroorganizmalardan arındırıldıktan sonra sitotoksik analizler yapılmıştır. Alınan örnekler ayrıca mikrobiyolojik olarak test edilmiştir.

#### Sitotoksik Analizler

Çalışmalarda, vücut içerisindeki etkinliği ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneği dikkate alınarak sıçan kemik iliği mezankimal kök hücreleri kullanılmıştır. Öncelikle, evrensel kabul gören etik ilkeleri doğrultusunda KÜ-HADYEK'ten alınan izinle Wistar sıçanlarından femur kemiği tüm olarak kırılmadan çıkartılmıştır. Daha sonra Doku Kültür Laboratuvarında kemik iliği, femur kemiğinden aspirasyon ile çıkartılarak burada lokalize olmuş mezankimal kök hücreleri (MKH) aseptik koşullarda izole edilerek saflaştırılmıştır. İzole edilen MKH, %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS (fetal bovine serum) içeren alfa-MEM vasat içerisinde T-75 hücre kültür kaplarında ekilerek %90 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'ta ayarlı inkübatörde kültür işlemine başlanmıştır. Ortalama 6 günde bir pasajlanarak istenilen sayıya ulaşılan kadar hücreler çoğaltılmıştır (Resim 2a).

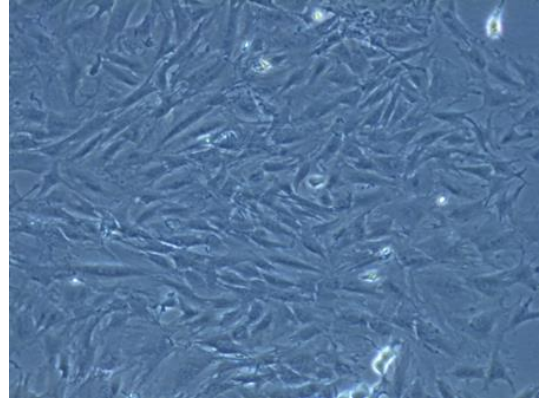
İstenilen sayıya kadar çoğaltılan MKH'ler, sitotoksik analizlerde kullanılmak üzere 96 kuyucuklu petri kaplarına 2×10<sup>4</sup> MKH/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin zemine tutunması için 24 saat bekletilmiştir. Su kalitesinin SWORM'a göre en düşük kalitede (sınıf III) olduğu belirlenen Kasım ayında alınan su numuneleri için hazırlanan 7 farklı doz, vücut su indeksine göre

hazırlanmış ve 96-kuyucuklu petri kaplarındaki MKH'ler ile etkileştirilerek hücreler üzerindeki maksimum etki dozu (IC50)/biyoyumumluluğu MTT reaktifi (Sigma, ABD) kullanılarak test edilmiştir.



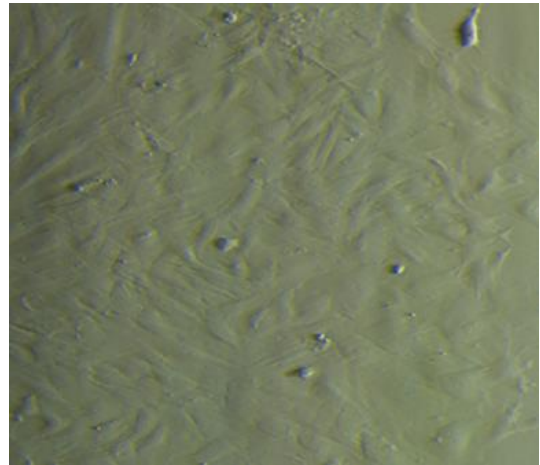
Resim 1. Kastamonu ili (Taşköprü) İncesu Göleti'nin uydu görüntüsü

Picture 1. Satellite image of İncesu Pond in Kastamonu Province (Taşköprü)



Resim 2a. MKH Kültürü Faz-Kontrast mikroskop görüntüsü

Picture 2a. Phase-Contrast microscope image of MSC Culture



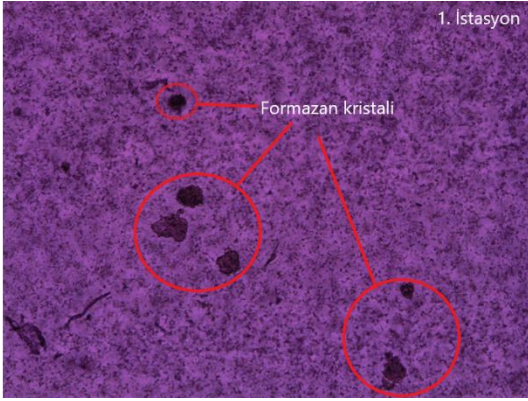
Resim 2b. MKH Kültürü Faz-Kontrast mikroskop görüntüsü

Figure 2b. Phase-Contrast microscope image of MSC Culture

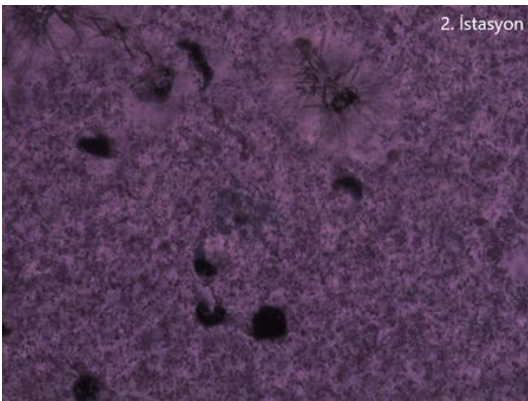
### Mitokondriyal Dehidrogenaz Aktivitesinin Belirlenmesi (MTT Testi)

Mitokondriyal dehidrogenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma, ABD)) kullanılarak Emin ve ark. (2008)'e göre analiz edilmiştir. Bu testle hücrelerin canlılıklarının yanı sıra çoğalma yeteneklerini sürdürüp sürdürmedikleri anlaşılmaya çalışılmıştır.

MTT testi için 1., 3., ve 7. günlerde, 96-kuyucuklu bir petri kabında indüksiyon uygulanan hücreler kullanılmıştır. Her bir kuyucuktaki vasat tamamen çekilerek atılmış ve yerine serumsuz taze hazırlanmış vasat, içerisinde %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde MTT kiti ile ilave edilmiştir. Su numuneleri ile indüksiyon uygulanmış hücrelerin, MTT ile inkübasyonu sonucunda formazan kristallerinin oluşumu kalitatif olarak faz kontrast mikroskobu (Resim 3) ile hücre canlılığı ise kantitatif olarak 3 tekrarlı olacak şekilde 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlemiştir. Analiz sonuçları su numunelerinin in vitro sitotoksik etkisi istatistiksel olarak yorumlanmıştır.



Resim 3a. MKH kültürlerinin 3. gündeki MTT analizi sonucu oluşan formazan kristallerinin inverted faz kontrast mikroskobu 10× büyütme ile elde edilen görüntü *Picture 3a. Photo of the MSC cultures on day 3, obtained by MTT analysis, obtained by inverted phase contrast microscopy at 10X magnification of formazan crystals*



Resim 3b. MKH kültürlerinin 3. gündeki MTT analizi sonucu oluşan formazan kristallerinin inverted faz kontrast mikroskobu 10X büyütme ile elde edilen görüntü *Picture 3. Photo of the MSC cultures on day 3, obtained by MTT analysis, obtained by inverted phase contrast microscopy at 10X magnification of formazan crystals.*

### Araştırma Sonuçları

İncesu Göleti'nde yapılan çalışmada fiziko-kimyasal parametrelerin büyük bir kısmı I. sınıf su kalitesi özelliği gösterirken, bir kısmı II. veya III. sınıf su kalitesi özelliği göstermiştir. Rutin testlere ek olarak gerçekleştirilen sitotoksik analizler ile de İncesu Göleti'ni kullanan canlılar ve tarım ürünlerinin sulanmasında kullanımının, insanlar üzerine olası toksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu tespitlerin yapılması, söz konusu su kaynağının tarımda kullanımının güvenilirliğini ve suyun doğrudan ya da dolaylı olarak insanlar üzerindeki etkisinin belirlenmesi için önemli sonuçlar vermiştir.

Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri invert faz kontrast mikroskobu ile günlük olarak takip edilmiş ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. Yapılan incelemelerde MKH'ler, tek tabaka kültürlerde, fibroblastik morfolojide hızlı bir şekilde çoğalma göstermiştir. Farklılaşmadan, özel vasat ortamı kullanılarak, deneyler için istenilen sayıya kadar çoğalması sağlanmıştır. (Resim 2a, Resim 2b).

### Sitotoksikite Analizi: Kalitatif ve Kantitatif MTT Analiz Sonuçları

İnsan vücudundaki toplam su içeriği baz alınarak tespit edilen 7 farklı dozda su reaktifi ile 7 gün süreyle indüksiyon uygulanmıştır. 1., 3. ve 7. Günlerde alınan örnekler MTT reaktifi ile etkileştirilerek mitokondriyal dehidrogenaz aktiviteleri, dolayısıyla canlılıkları ve çoğalma yeteneklerinin devam edip etmediği formazan kristal oluşumu ile tespit edilmiştir (Demir ve ark., 2018).

Mavi-mor renkli formazan kristallerinin oluşumu, hücrelerin mitokondriyal aktivite gösterdiğini, dolayısıyla canlılıklarını koruduklarını işaret etmektedir. Formazan kristalleri ne kadar fazla ve kristal boyutu ne kadar büyük ise hücre canlılığı ve sayısının o kadar fazla olduğunu söylenebilmektedir (Durkut ve ark., 2018; Dönmez-Güngüneş ve ark., 2017).

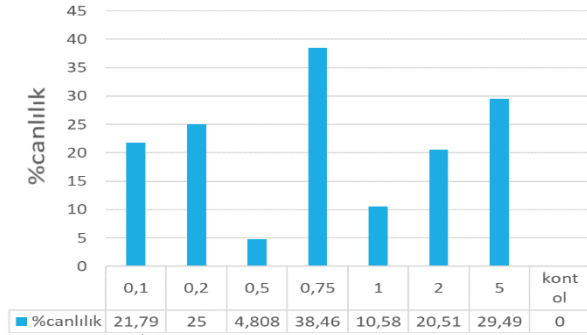
MKH kültürlerinin 3. gündeki MTT analizi sonucu oluşan formazan kristallerinin inverte faz-kontrast mikroskobu (10X büyütme) ile elde edilen fotoğrafları resim 3a ve 3b'de verilmiştir.

Kantitatif analiz için formazan kristalleri MTT çözücüsü içerisinde çözülmüş ve mikropilaka okuyucu ile 570 nm dalga boyundaki beyaz ışığı absorblama değerleri, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Formazan kristallerinin miktarı doğrudan hücre sayısı ile bağlantılı olup, ölçülen absorbans değerleri formazan kristallerinin miktarı ile doğru orantılı olarak değişim gösterir. Burada herhangi bir doz uygulanmamış kontrol grubuna göre, su örneğinden doz uygulanmış olan gruplarda hücre canlılığında bir artış olduğu görülmüştür (Ham veri verilmemiştir). Elde edilen absorbans sonuçları %canlılık olarak hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir. Kontrol sıfır noktasında kabul edilerek çizilen grafikte, yürümekte olan diğer çalışmalarımızdan farklı olarak, 7 doz dememesinin hepsinin canlılık üzerine pozitif etkisinin olduğu görülmüştür. Bu etkinin 0,5 ul/ml dozdaki %5'lik artış ile en düşük, 0,75 ul/ml dozdaki % 39'luk artışla en yüksek artışı sağladığı görülmüştür (Grafik 1).

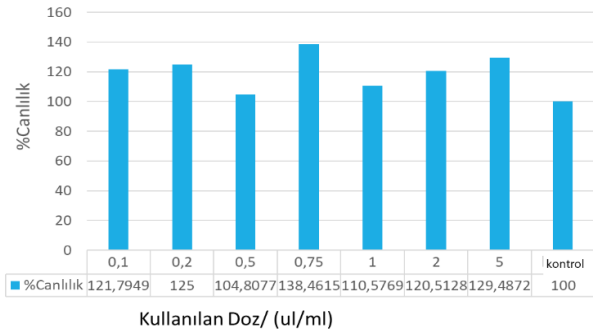
1.İstasyondan alınan sonuçlara benzer sonuçlar 2. istasyon için de elde edilmiştir. Kontrol grubuna göre, doz uygulanan gruplarda, formazan kristallerinin oluşumuna

göre absorpsiyon değerlerinde artış gözlenmiştir. Yine benzer şekilde en yüksek artış 0,75 ul/ml doz uygulanan grupta gözlenmiştir (Ham veri verilmemiştir). %canlılık, kontrol grubu baz alınarak hesaplanmış olup, burada kontrol %100 kabul edilmiştir. Örnek gruplarında %canlılık, %104 ile %138 aralığında değişim göstermektedir. Sonuçlar 1. istasyondan alınan örneklerden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Grafik 2).

Her iki istasyon için yapılan analizlerin toplam değerlendirilmesi yapılarak, elde edilen toplam canlılık analizi sonucunda, İncesu göleti su içeriğinin, hücre canlılığını korumakla birlikte, ayrıca hücre canlılığını artırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda su numunelerinin sitotoksik etkisi yerine suyun canlılar için biyoyouyumluluğunu söylenebilmektedir. Uygulanan her doz için pozitif bir etki gözlenmesine karşın canlı vücudundaki toplam su içeriğine göre temel alınan değer olan 0,75 ul/ml doz değerinde azami bir artış gözlenmiştir.



Grafik 1. 1. İstasyon Kantitatif MTT analiz sonuçları-2  
Graphic 1. Station 1 Quantitative MTT analysis results-2



Grafik 2. 2. İstasyon Kantitatif MTT analiz sonuçları-2  
Graphic 2. Station 2 Quantitative MTT analysis results-2

## Tartışma ve Sonuç

Sitotoksik analizler, yönetmeliğe göre en kirli ay olarak kabul gören ve yapılan fizikokimyasal analizlerde de en kirli olduğu görülen aylardan, Kasım ayında alınan numuneler ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik analiz sonuçlarının su kaynağına ve tarım arazilerine yakınlığına göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Gölü besleyen dere girişinden alınan numunelerin hücre canlılığına etkisi, gölün çıkışında tarlalar ile etkileşime girdiği noktadan alınan numunelerin etkisinden fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, tarafımızca gerçekleştirilen ve çalışmalarını devam eden projelerimizdeki, yönetmelik gereği yapılan, analiz verileri ile her zaman uyumlu sonuçlar alınmayacağını göstermiştir. Örneğin; İncesu Göleti'nin su kalitesi II. Sınıf olarak kabul görmesine karşın IC50 değeri tespit edilememiştir. Aksine gölet suyunun hücre canlılığını artırdığı tespit edilmiştir. Bu etkinin özellikle mitokondriyal etkiyi ve enerji metabolizmasını artırıcı etkisi olan fosfat iyonlarının miktarındaki artıştan ileri geldiği düşünülmektedir.

Suyun kullanım amacı, suyun kalite özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir. Balık yetiştiriciliği, hayvan yetiştiriciliği, sulama, rekreasyon, içme suyu, enerji üretimi, ısıtma, soğutma, petrol, gıda vb. endüstriyel ve endüstriyel olmayan faaliyetlerin her biri farklı su kalitesi kriterlerine gereksinim duyar. Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15/04/2015 tarihli ve 29327 sayılı resmi gazetede yayınlanan yönetmeliğine göre; yerüstü sularının sınıflandırılmasına yönelik değerlendirme, yapılan izleme neticelerinden alınan verilerin Kıta İçi Yerüstü Su Kaynaklarının Sınıflarına Göre Kalite Kriterleri şeması dikkate alınarak yapılır ve SWORM'a göre sınıflandırılır.

Su örneğinin canlılar üzerine olan etkisi, elde edilen fiziksel ve kimyasal analiz sonuçlarının, genel kabul gören verilere ve standartlara göre yorumlanması ile dolaylı olarak gerçekleştirilmektedir. Ancak yaptığımız sitotoksikite testleri dolaylı toksik değer tespitinin her zaman doğru sonuç vermediğini göstermiştir. Fiziksel ve kimyasal parametrelerin sitotoksikite analizleri ile birlikte yorumlanmasının su kaynağının güvenilirliği üzerine daha net sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Yürütülen çalışmalar doğrultusunda su kaynaklarının sadece SWORM'a göre kalitesinin belirlenmesinin yeterli olmadığı ve suyun canlılar üzerine etkisinin doğrudan sitotoksikite analizleri ile belirlenmesi hızlı ve kesin sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Yürütülen bu çalışmalar su kalitesinin tespiti ve canlılar üzerine doğrudan etkisinin tespiti açısından ayrıca ilk olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmalar göstermiştir ki su analizlerinde kullanılan geleneksel standart yöntemler çok kıymetli olsa da sitotoksik analiz yöntemiyle yapılan su kalitesi çalışması, suyun direkt canlı doku üzerindeki etkilerinin gözlenmesi açısından güvenilirlik sağlamaktadır. Bu bakımdan sitotoksikite analizlerinin su kalite standartlarına dâhil edilmesi ile rutin uygulama haline gelmesinin uygun olacağı tarafımızdan mütalaa edilmektedir.

## Bildirim

Söz konusu çalışma Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün KÜBAP-01/2016-30 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir. Çalışmanın bir bölümü 08-10 Kasım 2019 tarihinde Antalya/Türkiye'de gerçekleştirilen "I. Uluslararası Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Kongresi (TURJAF)"inde sunulmuştur.

## Kaynaklar

Demir AK, Elçin AE, Elçin YM. 2018. Strontium-modified chitosan/montmorillonite composites as bone tissue engineering scaffold. Materials Science and Engineering: C, 89: 8-14.

- Dönmez Güngüneş Ç, Şeker Ş, Elçin AE, Elçin YM. 2017. A comparative study on the in vitro cytotoxic responses of two mammalian cell types to fullerenes, carbon nanotubes and iron oxide nanoparticles. *Drug and chemical toxicology*, 40(2): 215-227.
- Durkut S, Elçin YM. 2017. Synthesis and characterization of thermosensitive poly (N-vinylcaprolactam)-g-collagen. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(8): 1665-1674.
- Emin N. 2016. The Cytotoxic Effect And The Physiological Response In The Biomaterials Applications The Turkish Journal Of Occupational / Environmental Medicine and Safety Volume 2: 226-226
- Emin N, Koç A, Durkut S, Elçin AE, Elçin YM. 2008. Engineering of rat articular cartilage on porous sponges: Effects of TGF- $\beta$  1 and microgravity bioreactor culture. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36(2): 123-137.
- Koç A, Emin N, Elçin AE, Elçin YM. 2008. In vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in a microgravity bioreactor. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(3): 244-261.
- Kükreler S, Mutlu E. 2019. Assessment of surface water quality using water quality index and multivariate statistical analyses in Saraydüzü Dam Lake, Turkey. *Environmental monitoring and assessment*, 191(2): 71.
- MEB. 2011. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Çevre sağlığı; Suların analiz parametreleri. 850CK0011 Ders Notları, Ankara.
- Mutlu E. 2019. Evaluation of spatio-temporal variations in water quality of Zerveli stream (northern Turkey) based on water quality index and multivariate statistical analyses. *Environmental monitoring and assessment*, 191(6): 335.
- Mutlu E, Yanık T, Demir T. 2013. Horohon Deresi (Hafik-Sivas) Su Kalitesi Özelliklerinin Aylık Değişimleri/Horohon Stream (Hafik-Sivas) Water Quality Characteristics and Monthly Variations. *Alınları Zirai Bilimler Dergisi*, 25(2): 45-57.
- Taş B. 2006. Derbent Baraj Gölü (Samsun) Su Kalitesinin İncelenmesi. *Ekoloji Dergisi*, 15,61, 6 15.
- Yılmaz ML, Peker HS. 2013. Su Kaynaklarının Türkiye Açısından Ekono-Politik Önemi Ekseninde Olası Bir Tehlike: Su Savaşları. *Çankırı Karatekin Üniversitesi İ.İ.B.F. Dergisi*. Cilt: 3, Sayı: 1, ss. 57-74, Çankırı.