

Nil Tilapyaalarında (Oreochromis Niloticus) Bulk ve Nano Çinko Oksit Partiküllerinin Karşılaştırmalı Toksisitesi: Birikim ve Oksidatif Stres Gen Ekspresyonlarına Etkisi



**Gölsemin ŞEN AĞILKAYA
Sahire KARAYTUĞ**



BİDGE Yayınları

Nil Tilapyaalarında (*Oreochromis Niloticus*) Bulk ve Nano Çinko Oksit Partiküllerinin Karşılaştırmalı Toksisitesi: Birikim ve Oksidatif Stres Gen Ekspresyonlarına Etkisi

Yazarlar: GÜLSEMİN ŞEN AĞILKAYA, SAHİRE KARAYTUĞ

ISBN: 978-625-372-620-1

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 11.02.2025

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara



İçindekiler

Giriş.....	5
KAYNAK ARAŞTIRMALARI	12
1. Nanopartiküller	12
1. Nano Çinko Oksit Partikülü.....	16
2. Oksidatif Stres.....	18
1. Antioksidan Savunma Enzimleri	22
1. Süperoksit Dizmutaz (SOD)	23
2. Katalaz (CAT)	25
3. Glutasyon Peroksidaz (GP _x)	26
2. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	28
3. Isı Şok Proteinleri.....	29
1. Isı Şok Proteini-70 (HSP70)	32
4. Önceki Çalışmalar	33
Materyal ve Yöntem.....	38
Deneysel Dizayn	38
Nano Çinko Oksit Karakterizasyonu ve Stok Süspansiyon Hazırlama	40
ZnO (BPs and NPs) LC ₅₀ değerlerinin tayini.....	41
Gen Ekspresyonu Analizi.....	41
RNA İzolasyonu ve Ekspresyon Çalışmaları.....	41
Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	42
Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi	43
Real-Time (Gerçek Zamanlı) PCR	43
Δ CT, $\Delta\Delta$ CT ve Kat Değişim (Fold Change) Değerleri.....	45

Doku İyon Analizleri.....	45
İstatistiksel Analiz.....	46
Bulgular ve Tartışma.....	46
5. Nano ve Bulk Çinko Partiküllerinin Karakterizasyon Analizi 46	
6. Nano ve Bulk Çinko Partiküllerinin Akut Toksisite (LC ₅₀) Analizi.....	51
7. Karaciğer Dokusunda Çinko Birikimi	55
8. mRNA Ölçümleri	58
9. Antioksidan Enzimlerin ve HSP70'in Gen Ekspresyonları ...	58
1. Karaciğer Dokusunda SOD Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları.....	59
2. Karaciğer Dokusunda CAT Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları.....	61
3. Karaciğer Dokusunda GPx Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları.....	64
4. Karaciğer Dokusunda GST Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları.....	66
5. Karaciğer Dokusunda HSP70 Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları.....	69
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	73
Kaynakça.....	76

NİL TİLAPYALARINDA (*Oreochromis niloticus*) BULK VE NANO ÇİNKO OKSİT PARTİKÜLLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI TOKSİSİTESİ: BİRİKİM VE OKSİDATİF STRES GEN EKSPRESYONLARINA ETKİSİ

**Gülsemin ŞEN AĞILKAYA¹
Sahire KARAYTUĞ²**

Giriş

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik, amorf ya da yarı kristal yapıda, 1-100 nm boyutlarındaki materyallerdir (Roco, 2003a). Bu materyaller çok küçük boyutlarından dolayı (özellikle 20 nm'den daha düşük), eşsiz optik, manyetik ve kimyasal özelliklere sahiptir (Commission Regulation, 2011). Nanobilim ve nanoteknoloji, ilaç, tüketim ürünleri, enerji, malzeme ve imalat alanında bilimsel gelişmeler sunarak tüm dünyada gelişmekte olan alanlardır. Nanoteknolojinin toplum, sanayi, çevre ve sağlık alanlarında da çok büyük fayda sağlama potansiyeli vardır. Nanoteknoloji, daha fazla

¹ Su Ürünleri Mühendisi, T.C. Tarım Orman Bakanlığı, Orcid: 0000-0001-5108-0109

² Prof. Dr., Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Orcid: 0000-0003-1299-9790

işlevi olan, daha az ham madde ve daha az enerji tüketen, daha küçük, daha ucuz, daha hafif ve daha hızlı cihazların üretiminin önünü açmaktadır (Sharifzahed, 2006). Yaşam kalitemizi artırması ve sera gazı emisyonlarının azaltılması gibi bazı günlük kilit konularda yardımcı olabilmektedirler.

Üretimi sürekli büyüyen nanoteknoloji endüstrisinin 2020'de 42,2 milyar ABD dolar olduğu tahmin edilmekte ve 2026 yılına kadar 70,7 milyar dolara çıkması beklenmektedir (Barhoum vd., 2022). Son on yılda, endüstriyel nano materyaller (ENM) ilaç, imalat, pigmentler ve foto-kataliz gibi çeşitli alanlarda geniş uygulamalar bulmuştur. Metal oksitleri içeren nanopartiküller, nanomateriyallerin sıklıkla kullanılan bir grubudur (Chen vd., 2014). Çok sayıdaki ENM'ler arasında metaloksit nanomateriyaller (MNP) büyük miktarlarda üretilmekte ve endüstri, tarım, tüketici ürünleri ve ev eşyalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Joo vd., 2017). Örneğin ZnO ve TiO₂ NP'ler cilt bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır, % 25'e kadar ZnONP'ler içeren 33.000 tonun üzerinde güneş koruyucu üretilmektedir (SCCS, 2012). Güneş kremlerinin en az %25'i (yaklaşık olarak 4000-6000 ton/yıl) resif alanlarına salınmaktadır (Danovaro, 2008).

Nano boyutlu çinko oksit (nano-ZnO), eşsiz özelliklerine ve farklı nano yapılar oluşturma yeteneğine sahip olduğu için, optoelektronik, kozmetik, katalizör, seramik ve pigmentlerde yaygın olarak uygulanmıştır (Osmond ve McCall, 2010). Nano-ZnO, su veya havadaki kirleticilerin elimine edilmesi için emici ve fotokatalitik özelliklerinden dolayı çevresel remediasyonda da kullanılmaktadır (Qiang vd., 2001). Bu nedenle Nano-ZnO'lar, TiO₂NP'lerinden sonra deşarj hacmi en yüksek ikinci sıradaki nanopartiküllerdir (Gottschalk vd., 2009). Nano-ZnO'nun artan kullanımı, insanların ve çevrenin bu partiküllerden etkilenmelerinin artmasına neden olmuş ve dolayısıyla toksisitesi hakkında endişe duyulmaktadır.

Bulk malzeme, özellikleri hem bütünü (örneğin, yığın bileşimi) hem de bireysel parçacıkları (örneğin, parçacık mineralojisi, parçacık boyutu ve şekli) tanımlayabilen parçacıklar veya granüllerin genel ifadesi olarak tanımlanabilir (Bonifazi vd., 2002). NP'lerin eşsiz fiziksel özellikleri, çoğunlukla daha büyük boyutlara sahip bulk malzemelere kıyasla atomların hacimce daha büyük yüzey alanlarına sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bulk materyallerin yüzey atomları toplam atom sayısının sadece birkaçını oluştururken, NP'lerde atomların çoğu yüzeyin yakınında veya yüzeydedir (Casals vd., 2012). NP'ler, daha yüksek yüzey reaktiviteleri nedeniyle hücre içine girmekte ve organizmalarda birikim yeteneklerinden dolayı bulk partiküllerden daha toksik olduğu düşünülmektedir (Maharramov vd., 2019). Aynı zamanda süspansiyonlarda, nanopartiküller büyük partiküller oluşturmaya eğilimlidir ve agregaların çoğu birkaç saat içinde uzaklaşıp toksisite azalabilmektedir (Adams vd., 2006). Bu nedenle, benzer boyutlardaki süspansiyon halindeki bulk partiküllerle karşılaştırıldığında nanopartiküllerin toksisite mekanizmalarının daha karmaşık olduğu belirlenmiştir (Zhang vd., 2007; Wigginton vd., 2007).

Metal tabanlı nanoteknolojiler, çevresel remediasyon ve çeşitli endüstriyel prosesler için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, metal NP'lerin sucul ekosistem üzerindeki toksik etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Chen vd., 2012). NP'ler sucul ekosisteme yayıldıklarında, elektrostatik ve van der Waals bağlarla sucul ortamlarda etkileşime girmekte ve sucul canlılarda birilmektedirler (Parlak, 2013). Biyokimyasal ve fizyolojik etkileri uyaraabilen mekanizmalarla NP'ler, hücre içi metabolik faaliyetlerin bozulmasıyla, antioksidan sistemi bozarak ya da hücre makromolekülleri ile etkileşime girerek yağların, karbonhidratların (Wang vd., 2008), proteinlerin ve DNA'nın hasarına sebep olmaktadır (Kelly vd., 1998; Aschberger vd., 2011; Schrand vd.,

2010). NP aracılı ROS yanıtlarının, genotoksisite, inflamasyon, fibrozis ve karsinogenez gibi bir dizi patolojik olaya sebep olduğu bildirilmiştir (Xiong vd., 2011). Bazı NP'ler makrofaj ve nötrofil gibi inflamatuvar hücreleri aktive etmekte ve bu da ROS üretiminde artışa neden olabilmektedir (Zhang vd., 2003). Titanyum dioksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO), seryum oksit (CeO_2) ve gümüş NP gibi diğer NP'ler, hücreSEL yüzeye yerleşerek ya da hücrelerin içine girerek oksidatif stres sinyal mekanizmasını uyarmakta, bunun sonucunda oksidatif hasara neden olmaktadır (Buzea vd., 2007). ROS oluşum mekanizması her NP için farklıdır ve bugüne kadar ROS üretimi için kesin olan hücreSEL mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Metal esaslı NP'nin çoğu, Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla serbest radikal aracılı toksisite ortaya çıkarmaktadır (Huang vd., 2010).

Nano ve bulk yapıdaki metaller gibi çevresel kirleticilerin etkisiyle hücreSEL düzeyde ciddi miktarda üretilen reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif hasar, vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle elimine edilmeye çalışılır. Oksidatif hasarın en aza inebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres koşullarında, yüksek miktarda yağ asitleri ihtiva ettikleri için balıkların doku ve hücrelerinin zarar görmesine neden olmaktadır (Kovacık vd., 2019). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artışa, antioksidan savunma sisteminde bozulmasına veya oksidatif hasarı onaramamasına bağlı olarak ortaya çıkar (Dorval ve Hontela, 2003). Oksidatif stres, toksisite ve ekotoksisiteyi ölçmek için uygun bir parametredir; çünkü hücreler, oksidatif strese yanıt olarak değişen enzim aktivasyonu veya enzimlerin genetik ekspresyonu gibi kolayca ölçülebilen bir takım koruyucu tepkilerle yanıt oluştururlar (Abdel-Khalek, 2015a).

Normal şartlar altında canlı organizmalarda oksidatif stresin zararlı etkileri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GP_X) ve glutatyon transferaz (GST) gibi antioksidan enzimler tarafından azaltılmaktadır. Sucul organizmalar, SOD, CAT, GP_X, GST gibi antioksidan enzimler de dahil olmak üzere ROS ile oluşturulan hasarlara karşı koruma geliştirmiştir (Eyckmans vd., 2011). Bir antioksidan enzim olarak SOD, O₂⁻'nin CAT ve GP_X tarafından suya indirgenen H₂O₂'ye dönüşümünü hızlandırmaktadır (Ruas vd., 2008; Birben vd., 2012). CAT ise, 2 molekül H₂O₂'nin H₂O ve O₂'ye dönüşümünü hızlandıran, tüm hücrelerde bulunan hem içeren tetramerik bir antioksidan enzimdir (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012). GST'ler, faz II metabolizmasına katılırlar, organik hidroperoksitlerin alkollere indirgenmesini katalize ederek GP_X aktivitesi gösterirler ve çeşitli organizmalardaki prooksidanlara yanıt olarak indüklenirler (Garner ve Di Giulio, 2012). GP_X, Cu ve Zn gibi toksik elementlere karşı hücre içi korumada önemli bir role sahiptir (Mosleh vd., 2005). GP_X, hidrojen perokside (H₂O₂) karşı enzimatik savunmadan sorumludur. Glutatyon ve H₂O₂ arasındaki reaksiyonu katalize ederek glutatyon disülfürün (GSSG) oluşumuyla sonuçlanan indirgenmiş glutatyon (GSH) konsantrasyonu ile sıkı sıkıya bağlantılıdır (Alkaladi vd., 2013).

Metal iyonlarının salınımı, metal oksit nanopartiküllerinin toksisitesini etkilemektedir. Metal bazlı ve metal oksit esaslı NP'lerde toksisite en azından kısmen küçük boyutları ve bunun sonucunda NP'lerin yüksek yüzey aktivitesi gösterirken, etkiler metal iyonlarının serbest bırakılmasıyla daha da artabilir (Auffan vd., 2009). Balıkta nano-ZnO'nun olası toksik mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Nano ZnO partiküllerinin toksisitesi, çözünmüş Zn iyonlarına dayandırılmıştır (Aruoja vd., 2009). Ancak, son çalışmalarda çözünmüş iyonların varlığıyla ilişkili yan etkilerden farklı olarak toksisitenin boyuta bağlı olma ihtimaliyle ilişkili bulgular elde edilmiştir (Nair vd., 2009; Wong vd., 2010). Zhu vd.

(2009), nano-ZnO ve Zn^{2+} 'nin, ROS'u artırarak ve/veya hücrel oksidatif stres tepkisini tehlikeye atarak embriyonik toksisiteye neden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, nano-ZnO süspansiyonlarında bulunan parçacıklarla doğrudan temas eden solungaç hücrelerinde mekanik hasar oluşturma gibi farklı toksik mekanizmalara neden olduğu bildirilmiştir (Yu vd., 2011).

Canlılarda birikim özelliği gösteren kirleticilerin besin zincirinde izlediği yolu belirlemek amacıyla balıklar, metalleri metabolize etme, konsantre etme ve biriktirme yetenekleri nedeniyle, sudaki ekosistemin mevcut durumunun bir biyogöstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, balıktaki metal seviyelerinin belirlenmesi, insan sağlığı için oldukça önemlidir (Uysal vd., 2008). *Oreochromis niloticus*, yüksek büyüme oranı, çevresel strese karşı gösterdiği tolerans, kolay üreme ve yüksek pazar talebi nedeniyle biyozem programlarında bir indikatör tür olarak kullanılmak üzere uygun bir model olmasını sağlayan birçok özelliğe sahiptir (Gadagbui vd., 1996). Enzim ekspresyonlarının analizi, hedef organlarında gösterdiği toksisitenin yanı sıra organizmaların genel sağlık durumlarının belirlenmesine yardımcı olmakta ve aynı zamanda stres etkisindeki organizmada erken uyarı sinyali de verebilmektedir.

Çinko iz miktarlarda büyüme ve hücre bölünmesi, yara onarımı, bağışıklık, hormon salgılanması, tat ve görme işlevleri gibi çok sayıda fizyolojik olaylar için gereksinim duyulan ve 300 kadar proteinin yapısal ve işlevselliğinde rol oynayan bir eser elementtir (Vallee ve Falchuk, 1993; Watanabe vd., 1997, Akahori vd., 1999). Zn normal seviyelerde antioksidan özelliğe sahiptir ancak yüksek ve orta konsantrasyonlarda toksik hale gelir (Trevisan vd., 2014). Antioksidan savunma sistemleri bir dizi antioksidatif enzimi ve düşük molekül, enzimatik olmayan antioksidanları içerir. Biyolojik sistemleri moleküler düzeyde çevresel stresten korurlar (Van der Oost vd., 2003; Pandey vd., 2003).

Çinko önemli bir eser element olmasına ve ROS oluşumunu kısıtlamasına rağmen biyolojik olarak biriktiğinde toksik etki gösterir (Bozcaarmutlu ve Arınç, 2004). Yüksek çinko konsantrasyonları apoptozu ve oksidatif stresi indükleyebilir (Formigari vd., 2007), bu metalin oksidan/antioksidan ve pro-apoptotik/anti-apoptotik ajan olarak ikili rolünü vurgulamaktadır (Trevisan vd., 2014). Clearwater vd. (2002) yapılan çalışmalara dayanarak *O. niloticus* için günlük diyetle 5-10 mg/kg vücut ağırlığı oranında çinko alımının esansiyel olduğunu, günlük 30-3000 mg/kg vücut ağırlığı diyet kaynaklı çinko alımının toksik etkilere neden olduğunu bildirmiştir.

Sucul ekosistemlerdeki NP ve BP'ler balıklar tarafından alınıp kan yoluyla doku ve organlara taşınmaktadır. Balıkların detoksifikasyon için karaciğerde metal granülleri biriktirdikleri bilinmektedir (Lanno vd., 1987). Karaciğer, metabolizmanın çeşitli yaşamsal fonksiyonlarında önemli bir rol oynar ve kirlетici maddelerin birikimi, biyotransformasyonu ve atılımının ana organıdır (Triebkorn vd., 1997). Ayrıca, karaciğerin sürekli olarak ROS tarafından tehdit edilmesi nedeniyle, diğer organlara göre 10 kata kadar daha gelişmiş antioksidan savunmaya sahip olduğu bildirilmektedir (Wu vd., 2017). Antioksidan yanıt esas olarak karaciğerde meydana gelir ve bu yanıt yoluyla uzaklaştırılmayan ROS'un iltihaba neden olduğu bilinmektedir (Winterbourn vd., 2008). Kirlетici maddelerin sucul ekosistemleri üzerindeki etkisi, balığın karaciğerindeki biyokimyasal parametrelerin ölçülmesiyle de değerlendirilebilir (Barhoumi vd., 2012).

Bu çalışmada *O. niloticus*'ta nano-ZnO (<50 nm) ve bulk-ZnSO₄ (2000 nm) partiküllerinin LC₅₀ değerleri belirlenmiş, balıklar bu değerlere göre belirlenen subletal konsantrasyonlar (%5 ve %10 LC₅₀) etkisine bırakılarak 7. ve 15. gün sonunda karaciğer dokusundan örnekler alınmıştır. Karaciğer dokularında çinko birikimine bakılmasının yanı sıra potansiyel olarak genotoksik

bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan savunma sistemi temel enzimleri olan SOD, CAT, GP_x ve GST enzimleri ve bir ısı şoku proteini olan HSP70 gen ekspresyonlarına bakılmış ve standart gen olarak β -aktin gen ekspresyonları kullanılmıştır.

KAYNAK ARAŞTIRMALARI

1. Nanopartiküller

Nano öneki, Yunanca nanos, yani “cüce” sözcüğünden türetilmiştir. 1947’de, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği’nin (IUPAC) 14. konferansında, bir birimin milyarda bir kısmını (10^{-9}) tanımlamak için nano ön eki resmi olarak kabul edilmiştir (Joudeh ve Linke, 2022). “Nano” ön eki son on yılda farklı bilgi alanlarında giderek artan bir uygulama alanı bulmuştur ve artık modern bilimin büyük bir kısmı için popüler bir etikettir; bu nedenle bilimsel literatürde giderek yaygınlaşmaktadır (Buzea vd., 2007; Torgal ve Jalali, 2010; Pal vd., 2011; Fındık, 2021). Bu terimler arasında nanobilim, nanoteknoloji, nanorobotlar, nanomiknatıslar, nanoelektronik, nanokapsülleme vb. yer alır, ancak bunlarla sınırlı değildir (Buzea vd., 2007). 1 ila 100 nm arasındaki uzunluk ölçeğini ifade eden boyut, malzemelerin en az nano ölçekli bir boyuta sahip olduğu tüm nanopartiküllerin temel tanımlayıcı özelliğidir. Nanomalzemeler, üç boyutundan en az birinde (De vd., 2008) boyutları 1 ila 100 nm arasında olan (Abdalkreem, 2018; Afolalou vd., 2019) ve küresel yüzey alanı/hacimlerinin $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ ’den büyük olması (Gaffet, 2011; Santos vd., 2014) gereken maddelerdir.

Nanomalzemelerin daha büyük boyutlarda aynı malzemelerden önemli ölçüde farklı davranmasına neden olan iki ana faktör vardır: yüzey etkileri ve kuantum etkileri (Roduner, 2006). Bu faktörler nanomalzemelerin daha büyük boyutlu muadillerine göre gelişmiş veya yeni mekanik, termal, manyetik, elektronik, optik ve katalitik özellikler sergilemesine neden olur (Buzea vd. 2007; Lines 2008; Gade vd. 2010). Nanomalzemeler,

mikromalzemelere veya bulk malzemelere kıyasla temel olarak üç nedenden dolayı farklı yüzey etkilerine sahiptir; (a) nanomalzemeler çok geniş bir yüzey alanına ve kütle birimi başına yüksek parçacık sayısına sahiptir, (b) nanomalzemelerde yüzeydeki atomların oranı fazladır ve (c) nanomalzemelerde yüzeyde yer alan atomların daha az doğrudan komşusu vardır (Roduner, 2006; Buzea vd., 2007). Bu farklılıkların her birinin bir sonucu olarak nanomalzemelerin kimyasal ve fiziksel özellikleri, daha büyük boyutlu muadillerine göre değişmektedir. Örneğin, yüzeyde yer alan atomlar için daha az doğrudan komşu atoma sahip olmak, nanomalzemeler için atom başına bağlanma enerjisinin düşmesine neden olur (Roduner, 2006).

Daha büyük yüzey alanları ve daha büyük yüzey-hacim oranları, genellikle daha büyük reaksiyon yüzeyi nedeniyle nanomalzemelerin reaktivitesini artırmaktadır (Buzea vd., 2007). Ayrıca yüzey özellikleri, yapıları üzerinde önemli etkilere neden olmaktadır (Ikhtmayies, 2014). Nanomalzemelerin dağılımı, yüzey etkileri için önemli bir faktördür. Parçacıklar arasındaki güçlü çekici etkileşimler, nanomalzemelerin topaklaşmasına ve toplanmasına neden olabilir; bu da yüzey alanlarını ve nano ölçekli özelliklerini olumsuz etkiler (Ashraf, 2018). Aglomerasyon, nanomalzemelerin zeta potansiyelini artırarak (itici kuvveti artırarak) (Suttiponparnit vd., 2011), nanomalzemenin hidrofilik/hidrofobiklik derecesini veya süspansiyon ortamının pH'ını ve iyonik gücünü optimize ederek önlenabilir (Fubini vd., 2010).

NP'ler morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre en iyi bilinen NP'ler: Karbon bazlı nanopartiküller, Metal nanopartiküller, Seramik nanopartiküller, Yarı iletken nanopartiküller, Polimerik nanopartiküller, Lipit bazlı nanopartiküller olmak üzere altı farklı sınıfa ayrılmaktadır (Khan vd., 2019). Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgü özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre

olabildikleri için biyomedikal ve tıp alanlarında; akıllı ilaç taşıyıcıları, görüntüleme, biyosensörler, nanomakineler (biyrobotlar), nükleik asit analizleri, biyoinformatik ve genomik uygulamalar için DNA çiplerinin nanofabrikasyonu, kök hücre bazlı organ mühendisliği uygulamaları, implant materyalleri, yapay doku ve nanocerrahi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Kocaefe, 2007; Yula, 2010).

Nanoteknoloji, nanomalzemeler olarak bilinen, boyutları 1 ila 100 nm arasında değişen malzemelerin sentezini, mühendisliğini ve kullanımını kapsayan bir daldır (Hasan, 2015). Nanoteknoloji, atomik, moleküler veya makromoleküler ölçekte araştırma ve geliştirme olarak tanımlanmaktadır (NNI, 2004). Nanopartiküller, nanoteknolojinin yapı taşları olarak kabul edilmektedir. Nano ölçekli malzemeler elektronik, manyetik ve optoelektronik, biyomedikal, farmasötik, kozmetik, enerji, çevre, katalitik ve malzeme uygulamaları gibi çeşitli farklı alanlarda kullanım alanı bulmaktadır. Bu teknolojinin potansiyeli nedeniyle, nanoteknoloji araştırma ve geliştirme yatırımlarında dünya çapında bir artış olmuştur (Roco, 2003b). Nano tabanlı teknoloji, son on yılda çok büyük bir ilerleme kaydetmiş ve bu ilerleme, üretimleri için nanopartiküller (NP) içeren ürünlerin sayısında 2005 ile 2010 yılları arasında 25 katlık bir artışla desteklenmiştir (PEN, 2013).

Maddenin boyutu küçüldükçe atom yüzey alanı artar, bu da reaktivliği artırır ve yüzeydeki atomlar basit katalitik proseslerin aktif merkezleri olmasıyla yüksek reaktif katalistler haline dönüşürler. Böylece nanopartiküller nanometre ölçeği boyutunda benzersiz elektronik, optik, manyetik ve mekanik özellikler gösterirler. Bu benzersiz özellikleri sebebiyle NP'lerin enerji depolanması ve veriminin artırımına katkısı, hastalıklara daha iyi tanı ve tedavi yöntemleri sunması, bilgisayar sistemlerini hızlandırması gibi diğer kullanım alanları mevcuttur.

Nanoteknoloji çevredeki hava, su ve toprak kalitesinin remediasyonunda büyük potansiyele sahiptir. Kirleticilerin tespitini ve algılanmasını geliştirebilir ve remediasyon için yeni teknolojilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. NP'lerin oluşum ve büyüme süreçlerinin anlaşılması, ilk etapta kirleticilerin oluşumunun en aza indirilmesi ve bunların emisyonlarının azaltılması için etkili yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlar. Nanoteknolojinin çevre kalitesini iyileştirme potansiyeline sahip olmasına rağmen, aynı zamanda yeni bir çevresel tehlike sınıfına da yol açabileceği konusunda endişeler bulunmaktadır (Masciangioli ve Zhang, 2003; Colvin, 2003). Bu tür endişeler neredeyse tüm yeni teknolojilerle ilişkilidir ve bunların önceden ele alınması gerekir. NP'lerin oluşumu ve etkileşiminin kimyasal mekanizmaları hakkında temel bir anlayış olmadan, maruz kalma sonrasında olumsuz sağlık etkilerini azaltmak/ortadan kaldırmak için hafifletme stratejileri sınırlı olmaktadır (Sharma vd., 2019). Uygun araştırma ve bulguların erken aşamada birleştirilmesiyle nanoteknolojinin güvenliği sağlanabilir (NNI, 2004).

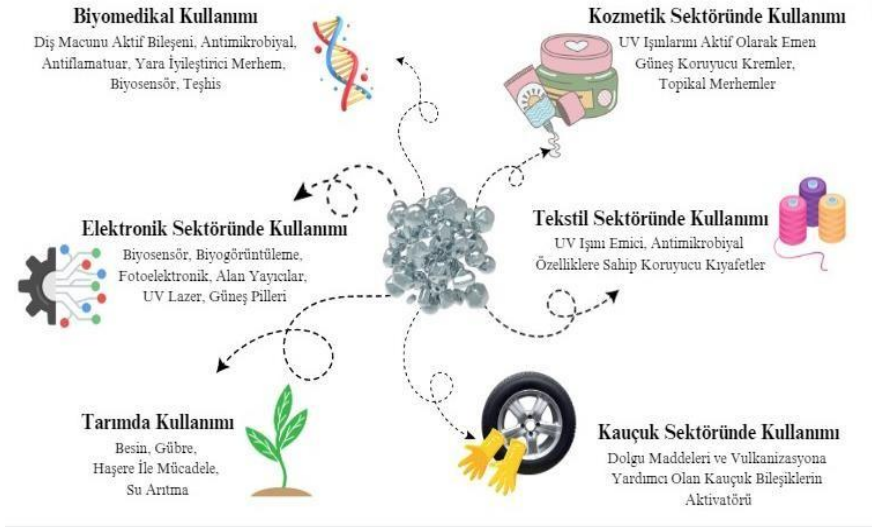
Metal oksit NP'ler, çeşitli ticari ürünlerde en çok kullanılan tasarlanmış NP'ler arasındadır ve insan ve çevre sağlığı üzerindeki potansiyel toksisiteleri konusunda endişelere yol açmaktadır (Aschberger vd., 2011). Metal oksit NP'lerin kullanımının artması, bu parçacıkların su ortamına salınmasına neden olabilir. NP'lerin su ortamı ve organizmalar üzerindeki olumsuz etkileri son zamanlarda çok özel ilgi çekmiştir (Blaise vd., 2008; Farre' vd., 2009). Nanoparçacıklar, suda sulu çözeltiler yerine dispersiyonlar veya emülsiyonlar oluştururlar ve metal NP'lerin toksisitesinin aynı metalin bulk partiküllerinin çözülmüş formlarından farklı olabileceği endişeleri vardır. Bu metal NP'ler parçacık yüzeyinden çözünerek metal iyonlarını serbest bırakmak için yavaş yavaş çözünebilirler ve serbest iyon toksisitesine neden olabilirler (Handy vd., 2008a).

Nanomalzemeler hücresel bileşenlerle etkileşebilir, hücre işlevini bozabilir veya değiştirebilir ya da ROS oluşturabilir. Nanomalzemelerin mitokondri ve hücre çekirdeği ile olan etkileşimleri, toksisitenin başlıca kaynakları olarak görülmektedir. Nanomalzemeler, makrofaj ve nötrofillerde serbest radikal kaynakları olan NADPH oksidaz ve ksantin oksidazın aktivitelerinde artışa sebep olabilmektedir (Sharma vd., 2017). Karaciğerde, nanomalzemelerin metabolik modifikasyonu, ör. sitokrom p450 ile reaksiyona giren ara maddelerle hepatotoksisiteye neden olabilir (Lanone ve Boczkowski, 2006).

1. Nano Çinko Oksit Partikülü

Çinko oksit NP'leri tipik metal oksit NP'lerdir ve yanmaz ve kokusuz beyaz tozlardır (Hao ve Chen, 2012). ZnONP'ler optik, piezoelektrik, manyetik ve gaz algılama dahil olmak üzere çeşitli alanlarda potansiyel uygulamalara sahiptir. Ayrıca biyoalgılama amacıyla yüksek katalitik verim, güçlü adsorpsiyon yeteneği, yüksek izoelektrik nokta (9.5), yüksek optik geçirgenlik, yüksek kırılma indeksi ($n \approx 2.0$) ve geniş bant aralığı (3.37 eV), biyouyumluluk ve hızlı elektron transfer kinetiği gibi üstün özellikler sergilemektedir (Jamieson vd., 2007; Wahab vd., 2009). Yüksek stabiliteleri, korozyon önleyici ve fotokatalitik özellikleri nedeniyle gıda, güneş koruyucuları, kozmetikler, boya, kağıt, plastik, seramik ve yapı malzemeleri, yarı iletkenler, katalizörler, parlaticıların imalatında yaygın olarak kullanıldığı için endüstriyel ölçekte üretilen en popüler nanomalzemeler arasındadır (Resim 1) (Chung vd., 2000; Jin vd., 2000; Osmond ve McCall, 2010). 2019 yılında 4,4 milyar dolar değerinde olan küresel ZnO pazarının büyüklüğünün, 2019-2024 tahmin döneminde %5,4'lük bir büyüme oranı kaydederek 2024 yılına kadar 5,7 milyar ABD dolarına ulaşacağı tahmin edilmektedir (Zinc Oxide Market Global Forecast to 2024).

Resim 1. ZnO Nanopartikül Kullanım Alanları



ZnO nanopartikülleri, benzersiz kimyasal ve termal stabilite, sağlamlık ve TiO_2 , WO_3 , SiO_2 ve Fe_2O_3 gibi diğer metal oksitlere göre uzun raf ömrü gibi çeşitli avantajlara sahiptir. ZnONP'ler, altıgen kuvarsit, kübik çinko blende ve kübik kaya tuzu gibi yapılarda bulunmaktadır (Belver vd., 2019). Nano-ZnO'lar, sol-jel, hidrotermal, çökeltme ve birlikte çökeltme, kimyasal buhar biriktirme, spreyl pirolizi, manyetik püskürtme, mikrodalga destekli teknik, solvotermal, biyolojik yollar gibi farklı kimyasal ve fiziksel yöntemlerle sentezlenmiştir (Ul-Haq vd., 2013). Bahsedilen yöntemlerin her birinin avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle nanoplakalar, nanokristaller, nanoteller, nanotüpler gibi karakterizasyon araçlarına göre ZnO nanoparçacıklarının farklı morfolojileri rapor edilmiştir (Ambika ve Sundararajan, 2015).

ZnONP'ler biyoyumlu, çevre dostu, düşük maliyetli ve toksik olmayan doğası gibi benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı malzeme biliminde yaygın olarak uygulanan önemli metal oksit malzemelerden birini oluşturmaktadır (Alwan vd.

2015; Salahuddin vd. 2015; Ruszkiewicz vd. 2017). ZnONP'ler, güçlü antimikrobiyal aktiviteleri sayesinde mikrobiyal yapışmayı, çoğalmayı ve biyofilm büyümesini azaltabilmesi özellikleri sayesinde antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerine karşı yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Jin vd., 2009; Arvizo vd., 2011; Jothiprakasam vd., 2017; Bhattacharyya vd., 2018). Üstün özellikleri nedeniyle, ZnO nanopartikülleri, özellikle atık su arıtımında kataliz alanında ve aynı zamanda kozmetik ve antimikrobiyal katkı maddeleri olarak farklı toplumsal sorunları çözmek için işlevsel, gelişmiş bir malzeme olarak uygulanmıştır (Ruszkiewicz vd., 2017). Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), gıda endüstrilerinde kullanılabilecek en güvenli metal oksitlerden biri olarak ZnO yer almaktadır (Bettini vd., 2016).

ZnONP'ler, yüksek kimyasal ve termal stabilite, doymamış yüzeyler ve sulu matristeki organik ve inorganik kirleticilere karşı mükemmel adsorpsiyon davranışı gibi bazı özellikler sergilemektedir. ZnO nanopartikülleri, diğer yarı iletkenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek foton soğurma verimliliğine, yüksek yüzey alanına ve oksitleme gücüne sahiptir ve atık suyun arıtılması için kolay temin edilebilir, toksik değildir ve uygun maliyetlidir (Zito ve Shipley, 2015). Bu özellikler son yıllarda birçok bilim adamını endüstriyel atık sulardan ağır metallerin uzaklaştırılması için ZnO nanopartiküllerinin adsorptif potansiyellerini araştırmaya teşvik etmiştir (Yuvaraja vd., 2018).

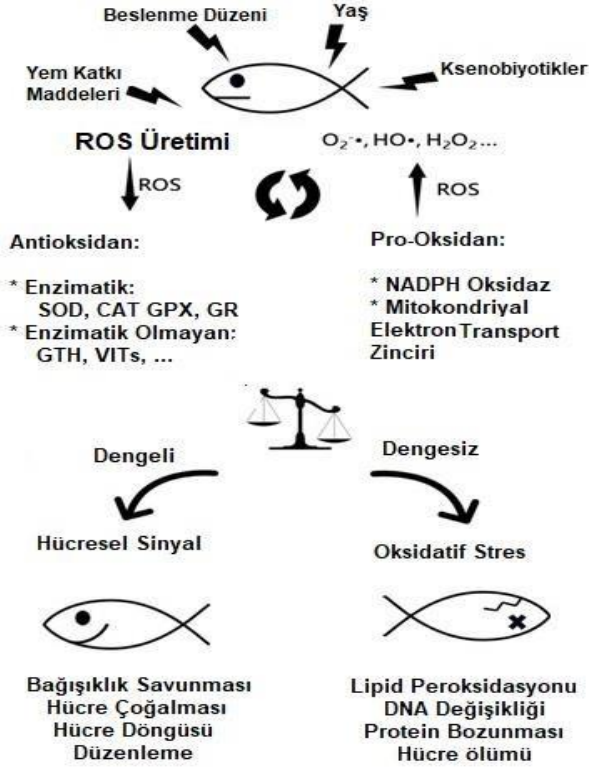
2. Oksidatif Stres

Oksijen, biyolojik sistemlerde yararlı özelliklerinin yanı sıra potansiyel olarak zararlı etkilerinin olması sebebiyle Janus gazı olarak da adlandırılmaktadır (Burton ve Jauniaux, 2011). Reaktivite, oksijenin yüksek enerjili elektron transferlerine katılmasına izin verir ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon yoluyla büyük miktarlarda adenozin-5-trifosfat (ATP) oluşumunu destekler. Bu

durum, karmaşık yapılı çok hücreli organizmaların evrimine izin vermek için gereklidir. Ancak aynı zamanda onu protein, lipid veya DNA gibi herhangi bir biyolojik moleküle saldırmaya yatkın hale getirir. Atmosferdeki oksijenin varlığı kendine has zorluklarla birlikte gelir; bunlardan en önemlisi oksijenden türetilmiş serbest radikallerin (eşleşmemiş elektrona sahip bir atom veya molekül) veya radikal olmayan reaktif oksijen türlerinin (ROS) (rn. hidrojen peroksit; hipokloröz asit) oluşumudur. (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Biyolojik sistemlerde ROS'un keşfi yaklaşık 70 yıl önce gerçekleşmiş ve hastalıklar ve yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir (Harman, 1956). Aerobik organizmalar, sürekli ROS oksidatif saldırısı altındadır. Bu saldırıyı genellikle dengede tutan karmaşık bir antioksidan savunma sistemi gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda bu denge bozulabilir ve oksidatif strese yol açabilir. Oksijen toksisitesinin bir hücre üzerinde sahip olabileceği çoklu ve çeşitli etkilerden dolayı, oksidatif stres en geniş anlamda, prooksidan-antioksidan dengesinde, potansiyel hasara yol açan prooksidanlar lehine bir değişiklik olarak tanımlanır (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Prooksidan - oksidan dengesinin bozulması ve canlı metabolizmasında yol açtığı durumlar Resim 2'de özetlenmiştir.

Resim 2. Balıklarda Oksidatif Belirteçler ve Antioksidan Sistem (Hoseinifar vd., 2020)



Atmosferdeki oksijenin temel durumunda iki eşleşmemiş elektronu vardır, bu da oksijeni paramanyetik yapar, bu özellik aktive edilmediği sürece organik moleküllerle kolayca etkileşime girmesini engeller (Asada ve Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 2015). Oksijendeki kısmi azalma, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi reaktif ara maddelerin üretimine yol açar (Asada ve Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Halliwell ve Gutteridge, 2015) ve bu maddeler reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır. Tüm fotosentetik ve aerobik organizmalar,

normal metabolizmaları yoluyla, (i) kompleks I'deki (NADH dehidrojenaz) ve (ii) ubikinon ile kompleks III arasındaki mitokondriyal elektron taşıma zincirinden ROS üretir (Brookes, 2005).

Süperoksit radikali, oksidatif strese ilk oluşan reaktif oksijen türüdür, hidrojen peroksitin oluşumuna ve sonrasında da reaktif oksijen türleri arasında en zararlı olan $\cdot\text{OH}$ oluşumuna yol açar (Halliwell ve Gutteridge, 2015), H_2O_2 radikal bir tür olmasa da zararlardan kolaylıkla geçebilir ve çoğu oksijen türevi diğer radikal türlere göre daha uzun ömürlüdür. Değeri değişebilen metal iyonlarının varlığında H_2O_2 , temas ettiği makromoleküllerden (nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar) elektronları ve protonları çıkarabilen yüksek derecede reaktif $\cdot\text{OH}$ 'ye dönüştürülebilmekte, böylece daha fazla eşleşmemiş elektron ve radikal tür üretilmektedir (Birnie-Gauvin vd., 2017). ROS üretimi, bir organizma içindeki oksijen konsantrasyonu ile pozitif olarak ilişkilidir (Jamieson vd., 1986). ROS üretimindeki artış, bir organizmanın bu reaktif türleri antioksidan kullanımıyla giderme yeteneğini aştığında, hücresel bileşenlere zarar veren oksidatif stres ortaya çıkar (Asada ve Takahashi, 1987; Cadenas, 1989).

Oksidatif stres aerobik yaşamın kaçınılmaz bir yönüdür. Canlı organizmalarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin bir sonucudur (Nishida, 2011). Reaktif oksijen türleri, geçiş metal iyonları, pestisitler ve petrol kirleticileri gibi maddeler tarafından indüklenir (Slaninova vd., 2009; Lushchak, 2011). Serbest radikaller ayrıca normal fizyolojik koşullar altında bile hücre metabolizması sırasında endojen hücresel kaynaklar tarafından da üretilir. Mitokondriyal solunum, ROS'un ana endojen kaynağıdır. Bu kaynakların en önemlileri; mitokondrinin elektron taşıma zincirleri, endoplazmatik retikulum, sitokrom P450'nin fonksiyonu (Di Giulio ve Meyer, 2008), kataliz sırasında oksidatif enzimlerin aktivasyonu (Fridovich,

1978) ve hayvanlarda hücresel fonksiyonun anahtar moleküllerinin otooksidasyonu (Halliwell ve Gutteridge, 2015) ve bitkilerde mitokondriye alternatif olarak kloroplastlardır (Di Giulio ve Meyer, 2008). Yüksek ROS üretimi, proteinlerin ve lipidlerin oksidasyonuna, gen ekspresyonunda ve hücre redoks durumunda değişime neden olabilir (Livingstone, 2003).

Sudaki organizmalarda ve memelilerde oksidatif stres üreten süreçler benzerdir. Pestisitler gibi birçok ksenobiyotik, membrana bağlı elektron taşınmasının bozulması (örneğin mitokondriyal, mikrozomal elektron taşınması) ve ardından indirgenmiş ara maddelerin birikmesi, redoks döngüsü, ışığa duyarlılık (Di Giulio ve Meyer, 2008), fenton reaksiyonunun kolaylaştırılması, antioksidan enzimlerin inaktivasyonu (Kono ve Fridovich, 1982) ve serbest radikal temizleyicilerin tükenmesi (Winston ve Di Giulio, 1991) gibi çeşitli biyokimyasal mekanizmalar yoluyla reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikleyebilir (Stolze ve Nohl, 1994).

Balıklardaki antioksidan savunma mekanizmaları, memelilerdekine benzer şekilde enzim sistemini ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanları içerir (Di Giulio ve Meyer, 2008). SOD, CAT, GPx ve GST, ana antioksidan enzimler ve oksidatif stresin önemli göstergeleridir (Sevcikova vd., 2011). İndirgenmiş glutatyon (GSH) ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG), enzimatik olmayan antioksidan savunmada önemli bir rol oynar. Ferritin, serüloplazmin ve metallothioneinler (MT'ler) gibi metal bağlayıcı proteinler, toksik metallerin detoksifikasyonunda özel işlevlere sahiptir ve aynı zamanda esansiyel metallerin metabolizması ve homeostazisinde de rol oynar (Kelly vd., 1998).

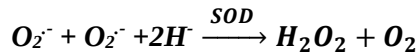
1. Antioksidan Savunma Enzimleri

Hücresel stresi içeren en çok çalışılan biyokimyasal süreçlerden biri oksidatif strestir. Doğal koşullarda aerobik organizmalar, iç ve dış uyaranlara yanıt olarak sürekli ROS üretirler.

Oksidatif stres, ROS oluşumu ile organizmaların antioksidan savunması arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkar ve hücrel membranların, genetik materyalin ve diğer hücrel bileşenlerin hasarına (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Sies, 2015) veya hücrel ölüme neden olmaktadır (Elsayed ve Gorbunov, 2003). Balıklardaki antioksidan savunma mekanizmaları, memelilerdekine benzer şekilde enzim sistemini ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanları içerir. Ancak çeşitli balık türlerinde enzimlerin spesifik izoformları iyi tanımlanmamıştır (Di Giulio ve Meyer, 2008). Tüm organizmalarda reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu için CAT, SOD, GPx ve GST enzimlerinin aktiviteleri, pro-oksidanlara karşı koymak için antioksidan rezervini doğrudan veya dolaylı olarak ölçen hücre altı cevapları içermektedir (Limón-Pacheco ve Gonsebatt, 2009).

1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Enzimatik sistem arasında süperoksit dismutazlar (SOD; EC1.15.1.1) antioksidan metalloenzimlerin ilki ve en önemlisidir. McCord ve Fridovich (1969), $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu gözlemlediklerini rapor etmişlerdir (Huang vd., 2005; Anju vd., 2013):



H_2O_2 , CAT ve GPx gibi diğer enzimler tarafından zararsız ürün suya (H_2O) dönüştürülür (Wang vd., 2011). Bu enzimlerin birleşik eylemleri, $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 seviyelerini düşük tutar (Daniela vd., 2008). SOD tüm yaşam formlarında tüm hücrelerde bulunur. SOD'lar aktif bölgeye bağlanan metalin türüne göre sınıflandırılır: (1) bakır/çinko-SOD (Cu/Zn-SOD), (2) mangan SOD (Mn-SOD) ve (3) demir-SOD (Fe-SOD) (Huang vd., 2005; Culotta vd., 2006).

Cu/Zn-SOD ve Mn-SOD hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda hücre içi ve hücre dışı bölümlerinde geniş dağılımı

nedeniyle, aşırı ROS'un neden olduğu oksidatif doku hasarına karşı korumada özellikle önemli bir rol oynar (Gómez-Anduro vd., 2006; Martins ve English, 2014). Cu/Zn-SOD genellikle homodimeriktir ve farklı organizmalarda farklı yerlerde bulunur (Bafana vd., 2011; Anju vd., 2013). Gram-negatif bakterilerin (SODC) periplazmasında, bitkilerin sitoplazmasında ve kloroplastında, mitokondrinin zarlar arası boşluğunda ve hayvanlarda çekirdek, lizozom, peroksizom, sitozol (SOD1) ve hücre dışı ortamda (SOD3, EC SOD) (Huang vd., 2005; Culotta vd., 2006). Diğer organizmalardan farklı olarak bitkiler Cu/Zn-SOD'ların iki ana alt grubuna (kloroplastik ve sitozolik) sahiptir (Takemura vd., 2002; Prashanth vd., 2008). Cu/Zn-SOD, bakteri ve mantarlarda sabit fazın hayatta kalması ve aerobik büyümesinde önemli rol oynar (Owsiak vd., 2010). Ek olarak, gram-negatif patojenik bakterilerdeki periplazmik Cu/Zn-SOD'un, konak savunma tepkilerine karşı koruma sağladığı öne sürülmüştür (Kim vd., 2010).

Mn-SOD, prokaryotlarda (SODA) ve ökaryotların mitokondrilerinde (SOD2) meydana gelir ve toksik $O_2^{\bullet-}$ i moleküler oksijen ve hidrojen peroksit katalize etme yeteneğine sahiptir (Islam vd., 2022). Prokaryotlarda (SODB), protozoanlarda ve alglerin kloroplastlarında bulunan Fe-SOD enziminin, bitkilerde kloroplastik lokalize ve plastidiyal lokalize Fe-SOD olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır (Wang vd., 2013). Fe ve Mn-SOD'lar muhtemelen ortak bir atadan evrimleşmiş homodimerler veya homotetramerlerdir. Yapısal ve dizilim korumaları nedeniyle hem Fe hem de Mn'yi bağlayabilirler, ancak yalnızca izin verilen metal kofaktörle önemli aktivite elde edebilirler (Islam vd., 2022). Üç ortak izoform, farklı kimyasallara karşı farklı duyarlılıklarına göre ayırt edilebilir. Cu/Zn-SOD, H_2O_2 ve siyanüre karşı çok hassastır; Mn-SOD, H_2O_2 ve siyanüre karşı duyarsızdır ve Fe-SOD, siyanür tarafından inhibe edilemez ancak H_2O_2 'ye karşı çok hassastır (Wang vd., 2016).

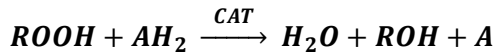
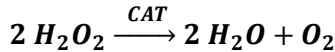
Balıklar, metal kofaktörleri ve hücresel lokalizasyonları ile karakterize edilen üç farklı SOD izoformu kullanır: sitozolde mevcut olan Cu/Zn-SOD (SOD1); mitokondri içinde bulunan Mn-SOD (SOD2); ve ağırlıklı olarak dokuların hücre dışı matrislerinde lokalize olan hücre dışı Cu/Zn-SOD (EC-SOD; SOD3). Çeşitli biyokimyasal ve moleküler çalışmalar, balık SOD'larının embriyonik ve larva gelişiminin yanı sıra endotoksinler ve patojenik enfeksiyonlar dahil olmak üzere çevresel streslere maruz kalma dahil olmak üzere yaşam döngüleri tarafından modüle edildiğini göstermiştir (Chatzidimitriou vd., 2020; Liu vd., 2015; Wang vd., 2019; Zhang vd., 2011; Sun vd., 2014). Bundan dolayı balık SOD'ları yalnızca büyümede değil, aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile antioksidan savunmalar arasındaki homeostatik dengenin korunmasında da önemli rol oynamaktadır (Kim vd., 2021).

2. Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT, EC.1.11.1.6), enzimatik antioksidan sistemin önemli bir üyesidir ve oksijenli solunum yapan tüm organizmalarda bulunur (Valko vd., 2006; Zamocky vd., 2008). Katalaz ağırlıklı olarak peroksizomlarda lokalizedir ve burada peroksizomal proteinin %10-25'ini oluşturur (Reumann vd., 2004). Katalaz (EC 1.11.1.6), alt birim başına tek bir ferriprotoporfirin grubu içeren ve yaklaşık 240 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olan, 60 kDa'lık dört özdeş tetrahedral olarak düzenlenmiş alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir (Aebi, 1980). Dizilimleri ve yapılarındaki farklılıklara bağlı olarak üç farklı türü bulunan katalaz, birçok ökaryotik ve prokaryotik organizmada tanımlanmıştır. Tek işlevli hem içeren enzim en yaygın olanıdır ve tüm aerobik organizmalarda bulunmaktadır. İki işlevli katalaz-peroksidaz, doğada nispeten daha az miktarda bulunan ikinci sınıfa aittir, bu enzim ayrıca bir hem grubu içermektedir. Yapısal ve dizilim benzerlikleri ile bitki

peroksidazları ile yakından ilişkilidir. Üçüncü sınıf, hem grubundan yoksun olan Mn içeren katalaz grubuna aittir (Nandi vd., 2019).

Bazı peroksisom reseptörleri tarafından tanınan bir dizi sinyali içeren (tetramerizasyon, hem ilavesi gibi) katalaz enzimi, hücre içinde peroksisomlarda yer almaktadır (Lazarow ve De Duve, 1973). CAT normal şartlarda bazı hücre tipleri için gerekli olmasa da hücrelerin adaptif yanıtında oksidatif strese karşı toleransın kazanılmasında önemli rol oynamaktadır (Matés vd., 1999). CAT, doğal bağışıklık için gerekli olan *de novo* H₂O₂ üretimi ile verimli eliminasyon arasındaki dengeyi korumak için substrat olarak radikal olmayan hidrojen peroksitin (H₂O₂) ayrışması (H₂O ve O₂'ye) yoluyla nötralizasyonundan sorumludur (Ha vd., 2005). Böylece hücresel sinyalleşme süreçleri için de gerekli olan molekülün hücre içindeki optimum seviyesinin korunmasını sağlar. Katalazın modülasyonu (yukarı veya aşağı regülasyonu), H₂O₂'nin bu biyolojik olayların algılanmasını ve sinyallenmesini içerdiğinden hücre proliferasyon (çoğalma), diferansiyasyon (farklılaşma), hücre göçü ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreç için önemlidir (Matés vd., 1999; Veal vd. 2007, Wang vd., 2013).



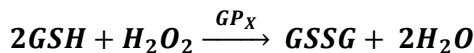
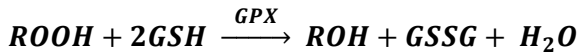
3. Glutasyon Peroksidaz (GP_x)

Glutasyon peroksidaz enziminin iki formu vardır; bunlardan biri selenyumdan bağımsızdır (glutasyon-S-transferaz, GST, EC 2.5.1.18), diğeri ise selenyuma bağımlıdır (GP_x, EC 1.11.1.19) (Matés vd., 1999). Bu iki enzim, alt birimlerin sayısı, selenyumun aktif merkezdeki bağlanma yapısı ve katalitik mekanizmaları bakımından farklılık gösterir. Glutasyon metabolizması antioksidatif savunma mekanizmalarının en önemlilerinden biridir (Esterbauer

vd., 1992; Grazioli vd., 1998). 80 kDa ağırlığındaki, glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), yapısında selenyum içeren dört özdeş alt birimin her birinde, enzim aktivitesi için gerekli olan tek bir selenosistein (Sec) kalıntısı içermektedir (Matés vd., 1999; Tappel, 1978).

GP_X, GSH'yi kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini katalize ederek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Düşük düzeyde GP_X içeren hücreler, hidroperoksit oluşumuna sebep olan bileşiklerin toksisitesine karşı çok daha duyarlıdır ve peroksinitrite karşı bir savunma hattı olarak önemli görünmektedir (Taylor vd., 1993).

Memelilerde beş tip GP_X izoenzimi bulunur: hücrel ve sitozolik GP_X (GP_{X1}), hücre dışı plazma GP_X (GP_{X2}), sitozolik gastrointestinal GP_X (GP_{X3}), fosfolipid hidroperoksit GP_X (PHGP_X, GP_{X4}) ve epididime özgü GP_X (GP_{X5}) (Vernet vd., 1999). Her ne kadar ekspresyonları her yerde bulunsa da her izoformun seviyeleri doku tipine bağlı olarak değişir. Tüm GP_X enzimlerinin selenoller (Se-OH) oluşturarak peroksitleri azaltmak için iki elektron ekledikleri bilinmektedir. Bu seleno-enzimlerin antioksidan özellikleri, Fenton reaksiyonu için potansiyel substratlar olan peroksitleri ortadan kaldırmalarına olanak tanımaktadır. GP_X, hücrelerde yüksek (mikromolar) konsantrasyonlarda bulunan tripeptit GSH ile birlikte hareket eder. GP_X'in katalitik reaksiyonunun substratı H₂O₂ veya bir organik peroksit ROOH'dir. Bu işlemde hidrojen peroksit suya indirgenir ve organik hidroperoksitler alkollere indirgenir (Desideri vd., 2003; Michiels ve Raes, 1994).



Sitozolik ve mitokondriyal glutatyon peroksidaz (cGP_X veya GP_{X1}), glutatyon pahasına yağ asidi hidroperoksitlerini ve H₂O₂'yi azaltır. GP_{X1} ve PHGP_X veya GP_{X4} çoğu dokuda bulunur. GP_{X1} ağırlıklı olarak eritrositler, böbrek ve karaciğerde bulunurken, GP_{X4} hem sitozol hem de membran fraksiyonunda yer alır. PHGP_X, peroksitlenmiş membranlarda ve oksitlenmiş lipoproteinlerde üretilen fosfolipid, yağ asidi ve kolesterol hidroperoksitlerini doğrudan azaltabilir (Imai vd., 1998). Böbrek epitel hücrelerinde ve testislerde yüksek düzeyde eksprese edilir. Sitosolik GP_{X2} veya GP_X-G1 ve hücre dışı GP_{X3} veya GP_X-P, sırasıyla gastrointestinal sistem ve böbrek dışındaki çoğu dokuda zayıf şekilde tespit edilir. Son zamanlarda, özellikle fare epididimisinde eksprese edilen yeni bir üye olan GP_{X5}, ilginç bir şekilde selenyumdan bağımsızdır (Haan vd., 1998). GP_X, H₂O₂ substratını katalaz ile paylaşıp da, tek başına lipid ve diğer organik hidroperoksitlerle etkili bir şekilde reaksiyona girebilir ve düşük seviyelerde oksidan strese karşı ana koruma kaynağıdır (Matés vd., 1999).

2. Glutatyon S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-Transferazlar (GST, EC 2.5.1.18), ribozomal olarak sentezlenmemiş tripeptit glutatyonu (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) küçük bir molekül alıcısı içinde bulunan elektrofilik bir merkeze ekleyen veya yerine koyan enzimlerdir (Hayes vd., 2005; Li vd., 2009). GST'ler, gerek prokaryotlarda gerekse de ökaryotlarda yaygın olarak bulunan, çok işlevli enzim ailesidir (Jakoby, 1978). GST'lere atfedilen hücresel işlevler arasında ligand bağlanması ve ksenobiyotik detoksifikasyonu yer alır (Tew, 1994). GSH, GST'nin 'G' bölgesine bağlanır ve ROS'un detoksifikasyonunda ve hücresel redoks durumunun korunmasında önemli bir rol oynar (Sato vd., 1989).

GST'ler, kimyasal karsinogenler, çevresel kirleticiler ve antitümör ajanlar gibi zararlı elektrofilik ksenobiyotikleri

detoksifiye eden, hücre içindeki dağılımlarına göre sitozolik, mitokondriyal ve mikrozomal olmak üzere üç enzim ailesidir. Hem GPx hem de GST aktiviteleri sonuçta toplam hücre içi GSH seviyesini düşürebilir (Masella vd., 2005). Oksijen metabolizmasının toksik ürünlerini etkisiz hale getirerek hem ksenobiyotiklerin hem de endojen bileşiklerin faz II detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Örneğin, GST'lerin aerobik solunumdan kaynaklanan $O_2^{\cdot-}$, $1O_2$, H_2O_2 ve $\cdot OH$ dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından üretilen oksidatif strese karşı korumada birkaç farklı aşamada etkileri vardır (Ranson ve Hemingway, 2010).

3. Isı Şok Proteinleri

“Ekstrinsik şaperonlar”, “yapısal şaperonlar” ve “ısı şoku kökenliler” olarak da adlandırılan ısı şoku proteinleri, hücresel strese maruz kaldıklarında tüm hücrelerde üretilen, değişen moleküler ağırlığa (16-100 kDa) sahip, yüksek düzeyde korunmuş proteinlerden oluşan bir protein ailesidir (Welch, 1993; Pockley, 2003). Bu proteinler, moleküler ağırlıklarına göre HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa), HSP60, HSP47 ve küçük HSP’ler (12-43 kDa) gibi çeşitli ailelere sınıflandırılmıştır (Park vd., 2007; Hallare vd., 2004). Öncelikle sitozol, çekirdek ve mitokondride bulunan HSP’ler, sağlıklı büyüyen hücrelerdeki toplam proteinin %5-10'unu temsil eden normal stressiz hücrelerin sitoplazmasında da bulunur (Pockley, 2003). Stressiz hücrede, ısı şoku proteinleri, protein metabolizmasında gerekli olan kurucu işlevlere sahiptir (Hightower vd., 1999). Tüm hücreler için evrenseldirler ve protein yapısının korunması ve katlanması, hasarlı hücre iskeleti elemanlarının desteklenmesi ve onarılması, hücre içi proteinlerin, enzimlerin ve hormon reseptörlerinin üretimine ve katlanmasına yardımcı olunması ve mitokondri ile nükleer ve hücre duvarı lipoprotein membranlarının bakımı da dahil olmak üzere çeşitli homeostatik işlevler için gereklidirler (Beckman vd., 1990).

Soğuk, sıcak, UV radyasyonu, toksinler, patojenler, beslenme eksikliği, protein bozulması, hipoksi, asidoz, mikrobiyal hasar oluşması durumlarında veya herhangi bir hücresel stres nedeniyle strese girdiğinde, hücrelerde yapısal şaperonların iki veya üç katı konsantrasyonlarda HSP'ler üretmek için ekspresyonları artış göstermiştir (Chiang vd., 1989; Locke, 1997). Isı şok proteinleri, protein homeostazisinde ve hücresel stres yanıtında önemli bir rol oynar (Iwama vd., 2004; Mao vd., 2005; Keller vd., 2008). Normal hücresel süreçlerin bozulması, HSP familyasına ait bir grup proteinin sentezinde hızlı bir artışa neden olabilir. Isı şoku tepkisi, ölümcül olmayan zararlı uyaranları takiben hücresel homeostazı korumak için evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır (Lindquist, 1986; Lindquist ve Craig, 1988). HSP'ler, hücre içi ve salgılanan polipeptitlerin ve oligomerik protein yapılarının doğru şekilde birleştirilmesine ve lokalizasyonuna aracılık eden moleküler şaperonlar olarak görev yapar.

HSP'lerin birincil işlevleri, proteinlerin uygun şekilde katlanmasını veya yeniden katlanmasını teşvik etmek, proteinlerle potansiyel olarak zarar verici etkileşimleri önlemek ve protein agregatlarının oluşumlarının parçalanmasına yardımcı olmaktır (Kayhan ve Duman 2010). Dengesiz bir doku oksidasyonu durumu olan stres, hücresel antioksidan ve redoks dengesinde bozulmaya ve HSP'lerin aşırı ekspresyonuna neden olur. HSP'lerin farklı aileleri, farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir ve bunların transkripsiyonel düzeyde düzenlenen indüksiyonuna, ısı şok faktörlerinin aktivasyonu aracılık eder (Feder ve Hofmann, 1999). İlginç bir şekilde HSP'ler ayrıca stresin aracılık ettiği apoptotik etkileri modüle eden çok çeşitli sinyal molekülleriyle de etkileşime girer (Pockley, 2003). Bu nedenle, HSP indüksiyonu hücre homeostazisinin korunmasında büyük öneme sahiptir. HSP aracılı adaptasyon süreçleri, hücresel hasara sebep olan olayların etkilerini azaltan temel bir koruyucu mekanizma olarak kabul edilir. Bu nedenle,

HSP'lerin uyarlanabilir ekspresyonu, proteinlerde stresin neden olduğu konformasyonel hasarla mücadeleye yardımcı olan koruyucu bir yanıttır.

Hücreler kimyasal veya biyolojik toksinlere maruz kaldığında, polar bağların zayıflaması ve bunun sonucunda hidrofobik grupların açığa çıkması sonucu hücre içinde veya hücre yüzeyinde protein denatürasyonu meydana gelir. Bu, protein katlanmasında ve protein agregasyonunda hatalara yol açmakta (Wedler, 1987) ve bu hasar mekanizması proteotoksisite olarak adlandırılmaktadır (Hightower, 1991). Bu tür hücresel stresler durumunda önemli ölçüde artan HSP90 ve HSP70'in sentezi, bu tür hasarlı proteinlerin korunmasına veya erken onarımının kolaylaştırılmasına hizmet eder.

HSP'lerin işlevleri, gelişim ve yaşlanma, stres fizyolojisi ve endokrinoloji, immünoloji, çevresel fizyoloji, stres toleransı ve iklime alışma dahil olmak üzere balık fizyolojisini etkilemektedir (Basu vd., 2002). HSP'ler, fiziksel ve kimyasal stresörlerle ilişkili toksisite için biyomoleküler biyobelirteçler olarak önerilmiştir (Sanders, 1993; Ryan ve Hightower 1994; Ovelgonne vd., 1995), çünkü genlerinin ekspresyonu, ısı şokuna sebep olan ağır metaller tarafından aktive edilebilmektedir (Airaksinen vd., 2003). Çeşitli çevresel stres etkenleri, balıklarda HSP tepkisini tetiklemektedir (Kayhan ve Duman, 2010). HSP'nin balıklarda stres durumlarında gösterge olarak kullanılması oldukça karmaşıktır. HSP cevabı dokuya (Smith vd. 1999; Rabergh vd. 2000), HSP ailelerinin çeşidine (Smith vd. 1999) ve stres faktörlerine (Airaksinen vd. 2003) ve HSP ekspresyonun duyarlılığı türe (Basu vd. 2002; Nakano ve Iwama, 2002) ve gelişim aşamasına (Lele vd., 1997; Santacruz vd., 1997) ve mevsime (Fader vd., 1999) göre de değişim göstermektedir.

1. Isı Şok Proteini-70 (HSP70)

Isı şoku proteini-70 (HSP70, HSP72 veya HSPA1 olarak da adlandırılır), yüksek oranda korunmuş en az 11 gen tarafından kodlanan 70-kDa (66- 78 kDa) ağırlığında moleküler bir şaperondur (Jaattela vd., 1999; Mayer ve Bukau, 2005). HSP70'ler, ATP içeren tüm ökaryotik hücrelerde bulunan monomerik proteinlerdir ve ayrıca hücre zarlarında (Gehrmann vd., 2005; Hantschel vd., 2000; Multhoff vd., 1995; Multhoff ve Hightower, 1996) ve hücre dışı ortamda (Pockley vd., 2014), bakterilerde ve bazı Archaea'larda da bulunmaktadır (Lindquist ve Craig, 1988). HSP70, stres proteini ailelerinin en büyüğü ve en yüksek oranda korunanıdır (Sanders, 1993). Bu aile içinde en az 121 protein karakterize edilmiştir ve memeliler, balıklar ve yumuşakçalar arasında çapraz hibridizasyon meydana gelir; aslında insanlar ve yumuşakçalar aynı antijenik ve ATP bağlama alanlarını paylaşırlar (Margulis vd., 1989).

HSP70 sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride protein taşıma süreçlerine katılmaktadır. HSP70'in hücre içindeki ana fizyolojik işlevleri şunlardır: (1) yeni oluşan ve denatüre proteinlerin doğal duruma katlanması, (2) hücre içi kümelenmiş proteinlerin yeniden katlanması ve (3) ubikuitin proteazom sistemi veya moleküler şaperon aracılı lizozomal otofaji süreci yoluyla kümelenmiş proteinlerin bozunmasıdır (Rokutan vd., 2000). Ayrıca, proteinler ve RNA gibi makromoleküllerin taşınması, salgılanması, sinyal iletiminin uyarılması, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, hücre bölünmesi, göçü ve farklılaşması dahil olmak üzere çeşitli hücresel homeostatik olaylara da katkıda bulunabilir (Söti vd., 2005; Kiang ve Tsokos, 1998). ATP'ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterir (Pockley, 2001).

Yapısal olarak, HSP70'in iki farklı alanı vardır: bir nükleotid bağlama alanı (NBD) ve katlanmamış peptidin bağlandığı bir substrat bağlama alanı (SBD). HSP70'in denatüre proteinlerin doğal

hallerine katlanmasına yardımcı olduğu moleküler mekanizma hala muamma olsa da, önerilen ortak mekanizma esas olarak şaperonun proteinlerin hidrofobik kalıntılarına bağlanmakta ve böylece ATP'ye bağlı bir şekilde moleküller arası etkileşimleri önlemektedir (Mayer vd., 2000; Ben-Zvi ve Goloubinoff, 2005). Farklı hücresel stres tiplerine, özellikle ısı şoku, oksidatif stres, hipoksi, değışen pH ve ağır metaller gibi proteine zarar veren koşullara yanıt olarak ekspresyonu uyarılmaktadır (Juhasz vd., 2013; Morimoto, 1998). Hücre dışı HSP70'in, istenmeyen hücreleri dolaşımdan uzaklaştırmak için bağışıklık sistemini uyarması nedeniyle karaciğer ve dalak gibi farklı dokularda yaralanmaya karşı koruyucu bir rolü olduğu bildirilmiştir (Merchant ve Korbelik, 2011).

HSP70 proteinleri proteostaz ve oksidatif stres de dahil olmak üzere farklı stres türlerinden kaynaklanan hasarı iyileştirmek için önemli faktörlerdir (Fernández-Fernández vd., 2018). HSP70 üyeleri sıklıkla şaperonlar aracılığıyla farklı hücresel sinyal yollarına katılırlar (Jiang vd., 2007). ROS doğrudan HSP70 üyelerinin oksidatif sistein modifikasyonlarının yapılarını ve şaperon aktivitelerini değıştirmesine neden olabilir, bu da HSP70 ile müşterileri veya şaperonlar arasındaki etkileşimlerde değışikliklere neden olur ve bu da daha sonra redoks sinyallerini HSP70 ile ilgili sinyal yollarına aktarabilir (Zhang vd., 2022). Öte yandan ROS, HSP70 aktivitesini ve ekspresyonunu dolaylı olarak modüle etmek için redoksle ilişkili bazı sinyal yollarını da aktive eder. Yüksek HSP70 ekspresyonuyla birlikte fosforilasyonu içeren translasyon sonrası modifikasyonlar, HSP70'in ROS hasarlı proteinlerle başa çıkma ve antioksidan enzimleri destekleme kapasitesini artırabilir (Zemanovic vd., 2018).

4. Önceki Çalışmalar

Oberdorster (2004), endüstriyel nanomateriyallerin (fullerenler, C60) *Micropterus salmoides* oksidatif etkilerini

araştırdığı çalışmada nano fullerenlerin balık beyin dokusunda oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna sebep olduğunu, bunun da NP'lerin sucul ekosistemlerde canlıların sağlığı üzerindeki olumsuz etkisini kanıtladığını belirtmiştir.

Yu vd. (2011), zebra balıklarında ZnONP ve ZnOBP'lerinin sedimantasyona etkisini ve karşılaştırmalı toksisitesini araştırdıkları çalışmada 96 saatlik LC₅₀ değerlerini (sırasıyla 3,969 mg/L, 2,525 mg/L) birbirine yakın bulmuşlardır.

Tilapyaaların (*O. niloticus*) organ patolojilerini (bağırsak, solungaç, böbrek ve karaciğer), osmoregülasyon cevaplarını, immunolojik parametrelerini belirlemek amacıyla farklı boyutlarda (10-30 nm, 100 nm) ZnONP'lerin subletal (1-10 mg/L) etkisine bırakıldıklarında bu partiküllerin 2 farklı boyutunun da organ hasarına yol açtığı, osmoregülasyon değişikliğine ve immün sistemde bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir (Kaya vd., 2016).

TiO₂NP ve ZnONP'leri ve bunların daha büyük partiküllerinin zebra balığına akut toksisitesi ve oksidatif etkilerinin araştırıldığı çalışmada, TiO₂-den farklı olarak, ZnONP'leri BP'lere benzer toksisite değerleri (96 saat LC₅₀ değerleri sırasıyla 4,92 ve 3,31 mg/L) gösterdikleri, ZnONP'lerin toksisitesinin (96 saat LC₅₀, 4,92 mg/L), nano-TiO₂'nin (96 saat LC₅₀, 124,5 mg/L) toksisitesinden çok daha yüksek olduğu, lipid peroksidasyonu ile ilişkilendirilen ·OH miktarı artışı, karaciğer MDA seviyelerinin ve protein karbonil içeriğinin yükselmesiyle sonuçlanan oksidatif etkiler saptandığı bildirilmiştir (Xiong vd., 2011).

Zhang vd. (2007), ZnO NP'nin *Escherichia coli*'ye karşı bakteriyostatik aktiviteye sahip olduğunu, antibakteriyel aktivitenin nanopartikül konsantrasyonunun artmasıyla ve partikül boyutunun azalmasıyla arttığını, partikül konsantrasyonunun partikül boyutundan daha önemli olduğunu bildirmiştir.

Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) TiO₂NP'lerinin subletal toksisitesinde, beyin dokusunda oksidatif stres, organ patolojileri ve glutasyon gibi antioksidan sistemlerin indüklenmesini içeren sonuçlara neden olduğu saptanmıştır (Federici vd., 2007).

Bawuro vd. (2018), Geriyo Gölü'nde (Adamawa eyaleti, Nijerya) ağır metallerin bazı dokularda biyobirikimini inceledikleri çalışmada, çinko, bakır ve kurşun metalleri için hedef dokunun karaciğer olduğunu bildirmiştir.

Sazan balığında (*Cyprinus carpio*), farklı konsantrasyonlarda (0.5, 5.0 ve 50.0 mg/L) nano-ZnO'nun etkisinin incelendiği çalışmada, özellikle 50.0 mg/L nano-ZnO konsantrasyonunun, çeşitli antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT ve GPX) inhibisyona neden olurken GSH içeriğinin azalmasının yanı sıra lipit peroksidasyonu (LPO) seviyesindeki artışa neden olduğu; solungaç, karaciğer ve beyin dokuları daha duyarlı olurken en az değişikliğe uğramış dokunun bağırsak olduğu saptanmıştır (Hao ve Chen, 2012).

Jüvenil sazanlarda (*C. carpio*) sucul ortamdaki ZnONP ve ZnOBP'nin biyoakümülyasyon ve subakut toksisitesinin değerlendirildiği çalışmada, ZnONP'nin ZnOBP'ye göre daha fazla biyoakümülyasyon sergilediğini, karaciğer ve solungacın ZnONP'nin hedef dokusu olurken, ZnOBP için hedef dokunun bağırsak olabileceğini, SOD aktivitelerinin yanı sıra GSH içeriğinin önemli derecede tükenmesine sebep olduğu tespit edilmiştir (Hao vd., 2013).

Zhu vd. (2008), ZnONP'nin, zebra balığı embriyolarına TiO₂NP ve Al₂O₃NP'den daha yüksek akut toksisiteye sahip olduğunu, zebra balığı embriyo ve larva gelişimini geciktirdiğini, hayatta kalma oranlarını ve kuluçka hızlarını azalttığını ve doku hasarına neden olduğunu saptamışlardır.

O. niloticus'ta, CuO'nun nano ve bulk partiküllerinin LC₅₀ değerlerinin 1/10'u (220,5; 15 mg/L) ve 1/20'si (110,25; 7,5 mg/L) olarak belirlenen ikişer subakut konsantrasyon etkisine bırakıldıklarında tüm balıklarda kontrol grubuna kıyasla karaciğer ve solungaç dokularında GSH içeriğinde azalma ve MDA miktarı ile GP_x aktivitesinde artış olduğu belirtilmiştir (Abdul-Khalek vd., 2015a).

Cozzari vd. (2015), Ag NP ve Ag BP etkisinin, özellikle yüksek konsantrasyonlarında ROS ROS oluşumunda artış ve SOD ve CAT aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmiştir.

Zebra balıklarında metal oksit (CuO ve ZnO) NP'ler tarafından indüklenen oksidatif stresin incelendiği çalışmada; sonuçlar, metal oksit NP'lerin süspansiyonlarındaki ·OH miktarlarının, bulk partikül süspansiyonlarından çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Chang vd., 2012).

Zhao vd. (2013), akut ZnO nanopartikülleri etkisine bırakılan zebra balığı embriyolarında artan nano-ZnO konsantrasyonunun DNA hasarını artırdığını, oksidatif hasara yanıt olarak Nqo1, Gstp2 ve Bcl-2 gibi antioksidan yanıt genlerinin transkripsiyonel ekspresyonu baskılanırken, ROS üretimi ile ilgili Ucp2'nin transkripsiyonel ekspresyonunu uyardığını bildirmiştir.

Gümüş NP'ler (1 ve 25 µg/L) *Oryzias latipes*'te hücrel ve DNA hasarlarının yanı sıra oksidatif strese neden olduğu ve metal detoksifikasyon/metabolizma regülasyonu ve radikal süpürme işlemi ile ilgili genleri (metallotiyonein, HSP70, GST, p53, CYP 1A ve transferrin geni) uyardığı belirtilmiştir (Chae vd., 2009).

Zebra balıklarının 30 mg/L'den 120 mg/L'ye kadar AgNP'lere maruz kalması, karaciğerdeki metallotiyonein -2'nin (MT2) mRNA ekspresyonunu uyardığı ve CAT ve GPx 1a'nın aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (Choi vd., 2010).

Zhu vd. (2009), nano-ZnO agregalarının zebra balıklarının gelişimsel süreçlerinde, yükselmiş hücrel ROS seviyelerine ve buna bağlı olarak Nqo1 ve Gstp2 kontrol grubuna kıyasla daha düşük gen ekspresyonu göstermesinin, antioksidan detoksifikasyon sistemlerinin tehlikeye girdiğini ve dolayısıyla oksidatif hasara neden olduğunun bir göstergesi olabileceğini bildirmişlerdir.

Levrek balığının (*Dicentrarchus labrax*) karaciğerinde TiO₂NP ve TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin)'nin etkilerine bağlı gen ekspresyonları incelendiğinde, tüm gruplarda kontrol gruplarına kıyasla, Ahrr (aril hidrokarbon reseptör represör), erβ2 (östrojen reseptör), abcc1 ve abcg2 (ABC protein) genlerinin baskılandığı bildirilmiştir (Vannuccini vd., 2015).

Ahamed vd. (2010), *Drosophila melanogaster*'de gümüş nanopartiküllerinin stres etkilerini araştırdıkları çalışmada, Ag NP'lerin, HSP70'in ekspresyonunu uyardığını ve *D. melanogaster*'de oksidatif stresi indüklediğini, antioksidan enzim SOD ve CAT aktivitelerini de yükselttiğini bildirmişlerdir.

Hu vd. (2011), zebra balığında biyoçözünür kitosan NP'lerinin toksik etkilerini araştırdıkları çalışmada, bu nanopartiküllerin HSP70 gen ekspresyonlarında aşırı uyarılmaya neden olduğunu bildirmiştir.

Oryzias melastigma'nın ZnONP'leri subletal konsantrasyonlarının etkisini değerlendirmek için moleküler belirteçlerin (SOD, MT, HSP70) kullanıldığı çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık oluşmasa da ZnONP'ya maruz kalma SOD ve MT'de gen ekspresyonunda uyarılmaya neden olduğu, HSP70'in gen ekspresyonunun ise tüm konsantrasyonlarda iki ila dört kat artması, hücrel hasar gibi oksidatif strese ek olarak muhtemelen başka stres biçimlerinin de varlığını bildirmişlerdir (Wong vd., 2010).

Harsij vd. (2021), ZnONP'lerinin *Carassius auratus* solungaç ve karaciğer dokularında HSP70 gen ekspresyonuna ve histolojik etkilerini inceledikleri çalışmada, deneme gruplarında (5, 20, 50 mg/L) HSP70'in ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını ve bu artışın özellikle ilk örneklemede (1. ve 3. gün) oldukça yüksek olduğunu belirtmiştir.

Nil tilapylarında (*O. niloticus*) Zn (BP and NP) LC₅₀ değerleri sırasıyla (1,36 ve 0,18 g/L) olarak bulunmuş ve ZnNP'lerinin LC₅₀ değerlerinin yarısına eşdeğer konsantrasyonunun balık karaciğer ve solungaç dokularında GSH, GPx, CAT, SOD aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) düzeylerinde belirgin bir artışa sebep olduğu; ZnNP'lerin ZnBP'lerinkinden daha güçlü toksik etkilere sahip olduğu ve uzun süreli maruz kalma süresiyle toksisitenin arttığı bildirilmiştir (Abdel-Khalek vd., 2015b).

Materyal ve Yöntem

Deneyisel Dizayn

Materyal olarak juvenil tilapylar (*O. niloticus* L.,1758) kullanılmıştır. Balıklar Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Tatlısu Balıkları Üretim ve Araştırma İstasyonu'ndan sağlanmıştır. Deneyler, Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Birimleri'nde yer alan 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanan Temel Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Toksisite denemelerinde yaklaşık aynı boy (12,39 ± 0,47 cm boy) ve ağırlıkta (30,95 ± 3,05 g) balıklar kullanılmıştır.

Laboratuvara getirilen balıklar, araştırmaya başlamadan önce fiberglas tanklara alınmış, 60 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Subletal konsantrasyon uygulamalarından önce LC₅₀ analizleri yapılmış, sonrasında ise her biri 40x100x40 cm boyutlarında olan, içerisinde 100L dinlendirilmiş çeşme suyu bulunan 5 adet cam akvaryum içerisinde 30 gün süreyle bekletilerek

laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmıştır. Denemede kullanılan dinlendirilmiş çeşme suyunun fizikokimyasal parametreleri; Çözünmüş O₂: 8,52 ± 0,35 mg/L; pH: 8,30 ± 0,18; Sıcaklık: 25,07 ± 0,66°C; Toplam Alkalinite: 331 ± 0,68 mg/L; Toplam Sertlik 229 ± 5,63 mg/L CaCO₃ şeklinde belirlenmiştir.

Bulk metal ve nanopartikül birikim ve toksisite çalışmalarında uygulanacak konsantrasyonları belirlemek amacıyla akut toksisite çalışmaları yapılmıştır. Yapılan akut toksisite deneyleri sonrası belirlenen LC₅₀ değerlerinin sırasıyla %5 ve %10'u seçilerek toksisite denemelerinde uygulanmıştır (Tablo 1.).

Tablo 1. Deneme Grupları

METAL	DERİŞİM
Kontrol	-
ZnO NP	1 mg/L
ZnO NP	2 mg/L
ZnSO ₄ BP	4 mg/L
ZnSO ₄ BP	8 mg/L

Deneyde 40x100x40cm boyutlarında ve her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan 5 adet cam akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlardan ilkinde 100 L 1 mg/L konsantrasyonda ZnONP, ikinci akvaryuma 2 mg/L konsantrasyonda ZnONP, üçüncü akvaryuma 4 mg/L konsantrasyonda ZnSO₄BP ve dördüncü akvaryuma 8 mg/L konsantrasyonda ZnSO₄BP, beşinci akvaryuma ise metal içermeyen 100 L dinlenmiş çeşme suyu konulmuş ve kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Deney çözeltilerinin hazırlanmasında çinko oksit (ZnO) nano partikülü (Sigma-Aldrich) ve çinko sülfat (ZnSO₄7H₂O) (Sigma-Aldrich) bulk partikülü kullanılmıştır. Denemeler sırasında balıklar günde bir kez toplam biyomasın %2'si kadar hazır balık yemi (Çamlı Balık Yemi San., İzmir, Ham Protein: %45; Ham Yağ: %19; Nem: %12) ile beslenmiştir.

Adsorbsiyon, presipitasyon ve evaporasyon gibi nedenlerle deney çözeltilerinin konsantrasyonlarında zaman içerisinde değişimler olabileceğinden, deneyler süresince deney ve kontrol akvaryumlarındaki sular günde bir kez tamamı boşaltılarak aynı ortam koşullarında bulunan dinlenmiş su ile hızla değiştirilerek ortam yenilenmiştir.

7. ve 15. günlerde örnekleme yapılmış ve her diseksiyondan hemen önce balıklar akvaryumlardan alınarak buzda bayıltılmış, beyin omurilik bağlantıları kesilerek öldürülen balıklardan öncelikle her bir deney grubundan 6 adet balık karaciğer dokuları çıkartılıp %0,59'luk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra yaş ağırlığı tartılarak gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklanmıştır (Puerto vd., 2009). Ayrıca her bir gruptan alınan 6'şar adet farklı balığın karaciğer dokuları da nano ve bulk partikül metal birikim analizlerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

Nano Çinko Oksit Karakterizasyonu ve Stok Süspansiyon Hazırlama

Ultra saf su ile hazırlanmış ZnONP ve ZnSO₄BP süspansiyonları, Zn tozlarının dağıtılması için 30 dakika ultrasonikasyona tabi tutulmuştur (HD2070 Bandelin Electronic, Berlin, 100W ve 50kHz) ve agregaları mümkün olabildiğince kırmak için 2-3 dakika mekanik titreşimle (vibrasyon) uygulanmıştır (Wang vd., 2011).

Tedarik edilen ZnONP ve ZnSO₄BP parçacıkları birer gram tartılarak kapaklı mikro tüplere aktarıldıktan sonra karakterizasyon analizleri için Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'a gönderilmiştir. XRD (X-ışını kırınımı), SEM (Taramalı elektron mikroskopisi) ve zeta sizer ve parçacık boyutu kullanılarak karakterize edilmiştir. NP ve BP'lerin şekli ve enerji dağılımlı röntgen analizleri SEM-EDX (Zeiss Sigma 300) kullanılarak değerlendirilmiş, partiküllerin solüsyon içinde

dağılıma mekanizmaları zeta sizer (Malvern Zetasizer Nano ZSP) kullanılarak belirlenmiştir. XRD analizi için nano-ZnO ve bulk-ZnSO₄ toz kullanılmıştır.

ZnO (BPs and NPs) LC₅₀ değerlerinin tayini

Adaptasyon periyodundan sonra, on balıktan oluşan gruplar LC₅₀ tespiti için her biri 40x100x40 cm boyutlarında olan, içerisinde 100L dinlenmiş çeşme suyu bulunan cam akvaryumlara aktarılmıştır. ZnONP için kullanılan nominal konsantrasyonlar (0, 16, 20, 28, 38, 50 mg/L) ve ZnSO₄BP için kullanılan nominal konsantrasyonlar (0, 58,75,100,135,180 mg/L) olarak belirlenmiştir. Maruz kalma süresi 96 saat olup, adaptasyon döneminde olduğu gibi aynı sıcaklıkta, çözünmüş oksijende ve pH'da tutulmuştur. Deney çözeltilerinin konsantrasyonlarında adsorbsiyon, presipitasyon ve evaporasyon gibi nedenlerle süreye bağlı olarak değişimler olabileceğinden nano ve bulk partiküllerin sabit konsantrasyonunu sağlamak amacıyla deney çözeltileri günlük olarak değiştirilmiştir. Deney akvaryumlarında havalandırma merkezi havalandırma ile sağlanmış ve yemdeki bulk ve nano partiküllerin emilimini ve dışkı üretimini en aza indirmek için balıklar deney süresince beslenmemiştir. Akut toksisite testleri standart metoda göre gerçekleştirilmiştir (OECD, 1992). Nominal konsantrasyonlar etkisinde 24, 48, 72 ve 96 saatlik süre içerisinde ölen balıklar, LC₅₀ değerini belirlemek amacıyla istatistik programı (SPSS yazılımı, sürüm 16.0, IBM, Chicago, IL, ABD) kullanılarak Finney'e (1971) göre probit analizi yoluyla her bir konsantrasyonda kaydedilmiştir.

Gen Ekspresyonu Analizi

RNA İzolasyonu ve Ekspresyon Çalışmaları

Bu çalışmada gen ekspresyon analizleri için karaciğer dokuları izole edilmiştir. Dokularda RNA izolasyonu Trizol protokolü uygulanarak yapılmıştır (Yılmaz vd., 2009). Deneye

başlamadan önce RNaz enzimini inhibe etmek için RNA izolasyonu sırasında kullanılacak kapaklı mikro tüpler %0,5'lik dietil piro karbonat (DEPC) içeren saf su ile muamele edilmiştir. Total RNA izolasyonu Laminar flow kabiniinde yapılmıştır. İzolasyon işleminde tek kullanımlık filtreli RNaz içermeyen pipet uçları kullanılarak yapılmıştır. Uygulanan protokolün metodolojisi aşağıdaki gibidir;

Doku buz üzerinde soğuk petri içerisinde parçalanıp kapaklı mikro tüplere aktarılmıştır. Sonra doku üzerine 1000 µL Trizol eklenip sonra vorteksle iyice homojenize edilmiştir. Buz üzerinde toplamda 15 dk inkübasyon sonrasında 14.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant başka bir kapaklı mikro tüpe aktarılıp üzerine 200 µL kloroform eklenerek 15 sn vortekslenmiştir. Sonrasında 10 dk buz üzerinde tutularak ve ardından 15 dk 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatantın %70'lik saydam kısmı başka bir tüpe aktarılıp eşit hacimde izopropanol eklenerek vortekslenmiştir. 10 dk buz üzerinde bekletilen süpernatant, 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Dipte pellet görüldükten sonra süpernatantı atılmış 1 mL %75'lik etil alkol ilave edilerek vortekslenmiştir. 5 dk 14.000 rpm'de santrifüjlenerek yeniden oluşan süpernatant uzaklaştırılıp 6 dk buz üzerinde kapakları açık bekletilerek DEPC (Dietil pirokarbonat)'li sudan 20 µL eklenmiştir. Sonrasında buz üzerinde 15 dk ağzı açık bekletilip pipetajlanmış ve 200 µL'lık RNaz içermeyen kapaklı mikro tüplerde deney gününe kadar -80 °C'de saklanmıştır (Yılmaz vd., 2015).

Total RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA konsantrasyonu ve saflığı Thermo Scientific Multiskan Go cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/µL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır. RNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir RNA örneğinden 4 µL, RNaz

içermeyen sudan 96 µL alınarak 1:24 oranında sulandırma yapılmıştır. Bu dilusyonun 260 ve 280 nm’de absorbansları ölçülmüştür. RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm’deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280nm’deki absorpsiyon değeri kullanılmıştır. Saf RNA elde etmek için OD260/OD280 değerinin 1,9-2,1 arasında olması sağlanmıştır. RNA’nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA’nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA’nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır (Yılmaz vd., 2015). Total RNA miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Total RNA (ng/}\mu\text{L)} = 260 \text{ nm'deki absorbans} \times 40 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 µg/mL’ye karşılık geldiği bilinmektedir. Yukarıdaki formülde 40 sayısı da buradan gelmektedir.

Total RNA’lardan cDNA Sentezlenmesi

Dokulardan izole edilen RNA’lar Qiagen RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen, Hilden, Almanya, Cat No. 74106) kullanılarak, Kit’ in kendi protokolüne göre 3 aşamada cDNA’ya çevrilmiştir. Örneklerin aynı anda çalışılmalarına ve özellikle dondurucuda aynı süre beklemelerine özen gösterilmiştir. Elde edilen cDNA’ların üzerine 30 µL RNaz içermeyen su konularak daha sonra kullanılmak için -20°C’de saklanmıştır.

Real-Time (Gerçek Zamanlı) PCR

İlgili genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi için beş µL cDNA örneğinden alınarak ROX içeren Green PCR Kiti (BioRad) ile Applied Biosystem 7500 cihazı kullanılmıştır. SOD, CAT, GP_X, GST, HSP70 ve housekeeping β-aktin genleri için spesifik primerler dizayn edilmiştir. Her bir hedef gen için, forward ve revers primerler (Tablo 2) Primer-BLAST kullanılarak dizileri seçilmiş ve

PrizmaLab. (İstanbul, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Tablo 2. Real-Time PCR için kullanılan hedef genlere yönelik primer dizileri

Hedef Gen	Genbank	Dizi (5'3')
CAT	JF801726.1	TCCTGAATGAGGAGGAGCGA ATCTTAGATGAGGCGGTGATG
SOD	JF801727.1	GGTGCCCTGGAGCCCTA ATGCGAAGTCTTCCACTGTC
GST	EU234530.1	TAATGGGAGAGGGAAGATGG CTCTGCGATGTAATTCAGGA
GPx	GQ853451.1	TCGGACATCAGGAGAACTGC GCACTGCTCAAAGTTCCAGG
HSP70	FJ207463.1	CATCGCCTACGGTCTGGACAA GCCGTCTTCAATGGTCAGGAT
β -actin	EF206801.1	CAATGAGAGGTTCCGTTGC AGGATTCCATACCAAGGAAGG

Polimeraz zincir reaksiyonu SYBR Green PCR karışımı kullanılarak 3 aşamalı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 95°C'de 15 dakika ilk denatürasyon, ardından 40 döngü boyunca 95°C'de 15-30 sn; 60°C'de 30 sn; 72°C'de 30 sn. olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardaki eşik döngü değeri (C_T); reaksiyon ortamındaki floresan miktarının sabitlenmiş eşik değerini geçtiği döngünün kesirli ifadesi olarak kullanılmıştır. Sonrasında C_T değerleri mutlak kopya sayılarına dönüştürülmüştür. “Kalıp içermeyen” ve “enzim içermeyen” kontroller kullanılarak genomik DNA varlığı ve reaksiyon özgülüğü kontrol edilmiştir. Tekrarlanabilirliği göstermek içinse üç bağımsız deney gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR ürünlerinin özgülüğü melt curve analizi ve jel elektroforezi ile doğrulanmıştır (Yılmaz vd., 2015).

Δ CT, $\Delta\Delta$ CT ve Kat Değişim (Fold Change) Değerleri

Real-time PCR cihazında CT (cycle threshold- döngü eşiği) değerleri elde edilir. Boya molekülü çift zincir DNA sarmalının arasında yayıldığında ışıma yani floresan sinyal yayılımı başlar. Belirlenen döngü sayısı üzerinden floresan sinyal yayılımının görünebilmesi için gereken döngü eşiği bize CT değerini vermektedir. Deney grubunda araştırılan hedef genin CT değeri ile kontrol geninin (housekeeping) CT değeri arasındaki fark bize Δ CT değerini verir (Δ CT = CT hedef gen – CT kontrol gen). $\Delta\Delta$ CT değeri ise deney grubundaki hedef genin Δ CT değeri ile kontrol grubunun Δ CT değeri arasındaki farkı ifade eder ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT deney gen – Δ CT kontrol gen). Kontrol örneği için $\Delta\Delta$ CT sıfıra eşittir ve her döngüde cDNA miktarı üstel olarak ($2^{\Delta\Delta$ CT) artmaktadır. Böylelikle hedef genin ekspresyonunda $2^{-\Delta\Delta$ CT değeri, gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre değişim değerini verir (Livak ve Shmittgen, 2001).

Doku İyon Analizleri

Doku nano partikül metal ve bulk metal analizleri için karaciğer dokuları alınmıştır ve Milli-Q su ile yıkanmıştır (Handy vd., 1999). Örnekler temiz petri kaplarına yerleştirilmiş ve 72 saat süreyle 150°C ayarlı etüvde kurutulduktan sonra bu dokular, süre sonunda kuru ağırlıkları belirlenerek polipropilen sentilasyon şişelerine aktarılmıştır. Numuneler (kuru ağırlıkları 0.1-0.5 g ağırlığa sahip olan), 4 mL konsantre nitrik asit (Merck, %65, d:1.40) eklenerek 3 saat süreyle yakılmış, soğumaya bırakılmış ve sonra 16 mL Ultra saf su (Milli-Q) ile seyreltilmiştir. Çok küçük doku numuneleri için ise (kuru ağırlığın 0.1 gramından daha azı), 1 mL nitrik asit ilavesi yapılmış ve daha sonra Milli-Q su ile 4 mL'lik bir nihai hacime seyreltilmiştir.

Dokulardaki nano ve bulk partikül metal analizleri, Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı

(ÇÜMERLAB)'ta Lazer Aşındırılmalı İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma - Kütle Spektrometresi (LA-ICP-MS) (Perkin Elmer NEXION 2000 P) ile belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

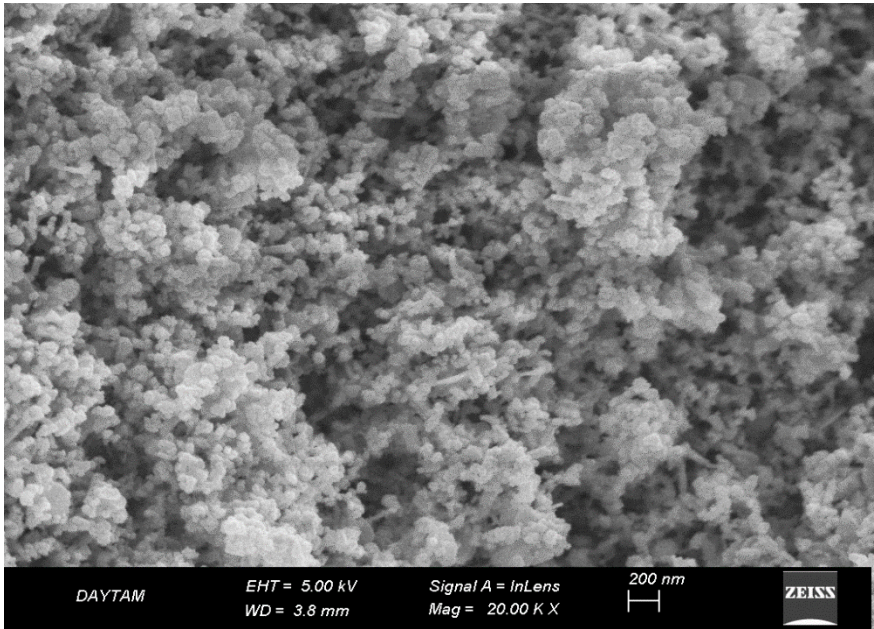
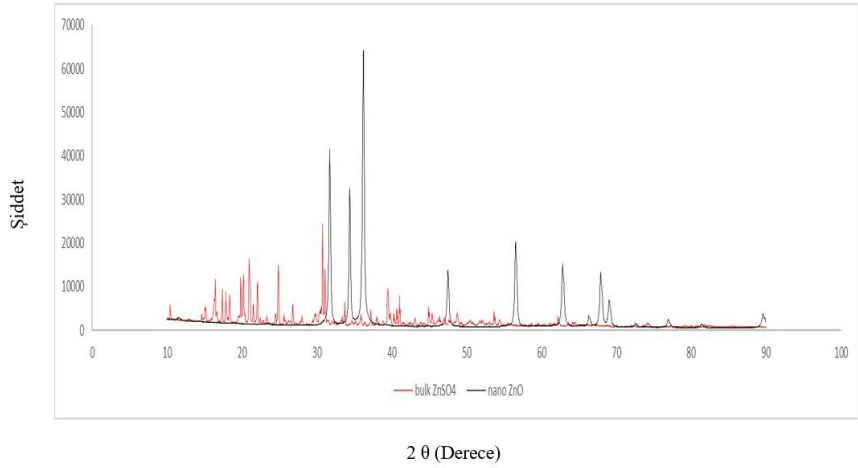
LC₅₀ değeri, SPSS 16.0 istatistik yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılarak probit ve logit analizi ile belirlenmiştir (Roberts ve Boyce, 1972). Sonuçlar ortalama $\pm$ SP olarak ifade edilmiştir. Karaciğer dokusunda birikim ve moleküler analiz sonuçları OneWay-ANOVA Duncan testi kullanılarak farklılıklar $P < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir (Kinnear ve Gray, 1995).

Bulgular ve Tartışma

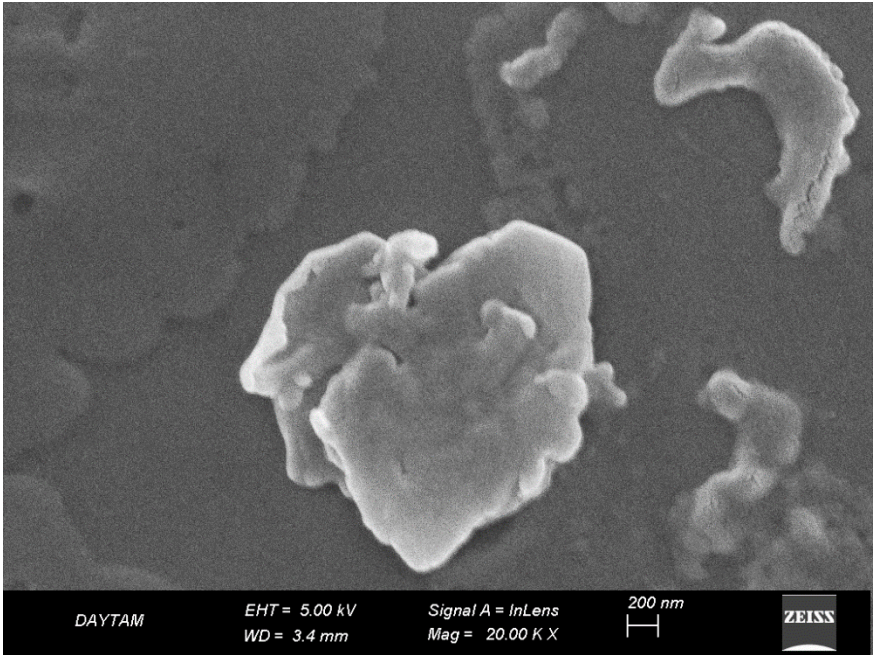
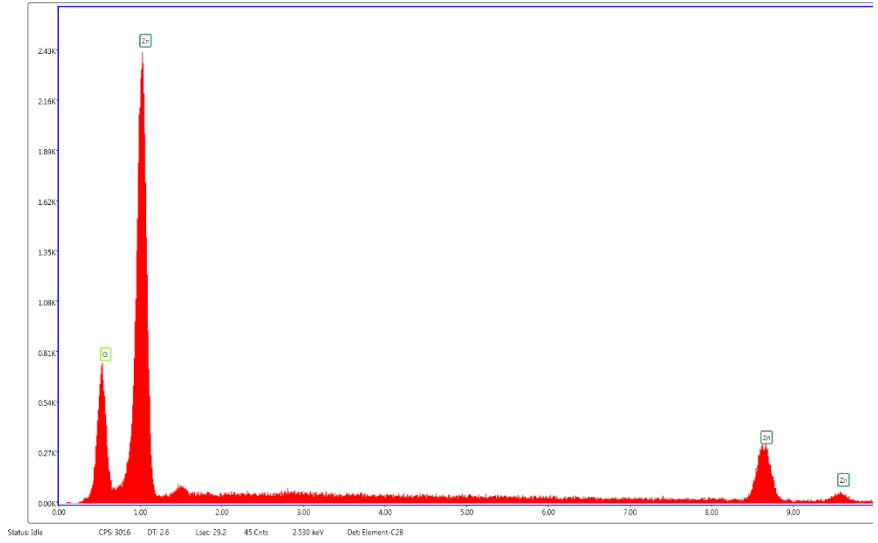
5. Nano ve Bulk Çinko Partiküllerinin Karakterizasyon Analizi

Nanopartiküllerin ekotoksosite çalışmaları için karakterizasyonunu yapmak çok önemlidir. Çünkü boyut, şekil, yapı, çözünürlük, stabilite, yüzey alanı, yüzey kaplamaları vb. özellikleri, nanopartiküllerin biyolojik sistemdeki özellikleri, etkileri ve davranışları hakkında bilgi vermektedir (Zhu vd., 2010). Bu çalışmada partikül büyüklüğü açısından karşılaştırma yapıldığı için ZnONP (<50 nm) ve ZnSO₄BP (2000 nm) partiküllerinin karakterizasyon analizi yapılmıştır. ZnONP'lerin ve ZnSO₄BP'lerin XRD modelleri, Grafik 1'de gösterildiği gibi farklı kırınım zirveleri göstermiştir. ZnONP parçacıklarının şekli küresel, hafif eliptik ve daha düzgün iken, ZnSO₄BP parçacıklarının ise daha köşeli ve düzensiz şekle sahip olduğu SEM görüntüleriyle (Grafik 2-3) ortaya çıkmıştır. EDX spektrumuna dayalı NP'lerin ve BP'lerin elemental bileşimi Tablo 3-4'de gösterilmektedir.

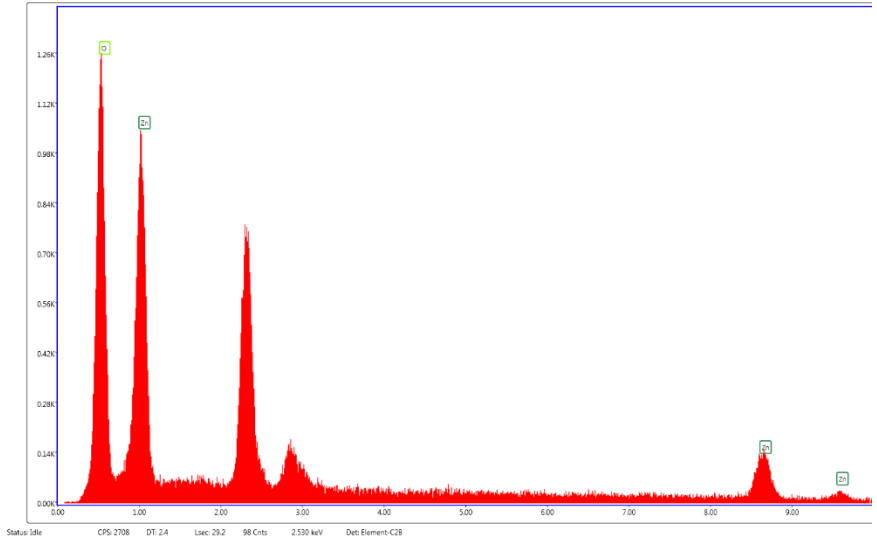
Grafik 1. ZnONP'lerin ve ZnSO₄BP'lerin XRD grafiği



Grafik 2. ZnONP'nin EDX Spektrumlu SEM Görüntüsü



Grafik 3. ZnSO₄BP'nin EDX Spektrumlu SEM Görüntüsü



Tablo 3. ZnONP'lerinin EDX spektrumu tarafından belirlenen Elemental Kompozisyonu

Element	Atom Numarası (g/mol)	Seriler	Ağırlık %	Atomik %
Zn	65.39	K-serileri	85,25	58,58
O	16	K-serileri	14,75	41,42
Toplam			100	100

Tablo 4. ZnSO₄BP'lerinin EDX spektrumu tarafından belirlenen Elemental Kompozisyonu

Element	Atom Numarası (g/mol)	Seriler	Ağırlık %	Atomik %
Zn	65,39	K-serileri	48,84	22,2
S	32,066	K-serileri	18,51	17,15
O	16	K-serileri	32,65	60,65
Toplam			100	100

ZnO NP'lerin ve ZnSO₄BP'lerin fizikokimyasal karakterizasyonuna göre, Zn BP'lerin SEM görüntüsünde, süspansiyonlardaki parçacıklarının düzensiz şekillerde büyük agregalar halinde toplandığı saptanmıştır. Zn NP'lerin çoğunluğu pürüzsüz yüzeylere sahip salkım şekillidir. SEM görüntüleri, alüminyum plakaların yüzeyinin nano ve bulk yapılar ile iyi bir şekilde kaplandığını göstermektedir. ZnO nanopartikülünün SEM görüntüleri, ZnO partiküllerinin küreler halinde tabaka üzerine kaplandığını ve homojen dağıldığını göstermektedir. Bazı NP'lerin daha koyu görünümü, temel olarak, elektronların tutarsız bir şekilde dağıldığı ve diferansiyel kontrast ürettiği SEM plakaları üzerinde kurutulduğunda farklı NP'lerin kalınlığına ve oryantasyonuna atfedilmektedir (Abdel-Khalek vd., 2015b). Süspansiyondaki bir parçacığın elektrokinetik özellikleri, parçacığı çevreleyen çift katmana dağıtılan elektrik yükü tarafından yönetilir (Will vd., 2001).

Artan elektrostatik itme, daha düşük mutlak zeta potansiyeli değerleri sergileyen süspansiyonlarla karşılaştırıldığında daha stabil olan, yüksek bir mutlak zeta potansiyeli değeri gösteren parçacıkların topaklanmasını engeller. Elektroforetik işlemlerde, malzemenin çökmesini engellerken belirli bir elektrik alanı altında parçacık hareket hızını artırdığı için yüksek bir zeta potansiyeli arzu edilir (Hanaor vd, 2012). Zeta potansiyelinin (ZP) büyüklüğü, NP'lerin kolloidal stabilitesini anlamak için parametrelerden biri olarak alınabilir. ZP değerleri +30 mV'den büyük veya -30 mV'den küçük olan NP'ler tipik olarak süspansiyonda yüksek derecede stabilizeye sahiptir (Xu vd., 2007). Bu çalışmada Zn BP'ler için zeta potansiyeli ölçümlerinde (- 0,92 mV) değeri parçacıkların kümeleşme veya bir araya gelme eğilimini yansıtırken, Zn NP'ler için zeta potansiyeli ölçümleri (6,59 mV) daha fazlaydı. Bu değerler Zn BP'lerin süspansiyon halinde topaklanma eğilimine daha yatkın olduğunu göstermektedir.

6. Nano ve Bulk Çinko Partiküllerinin Akut Toksisite (LC₅₀) Analizi

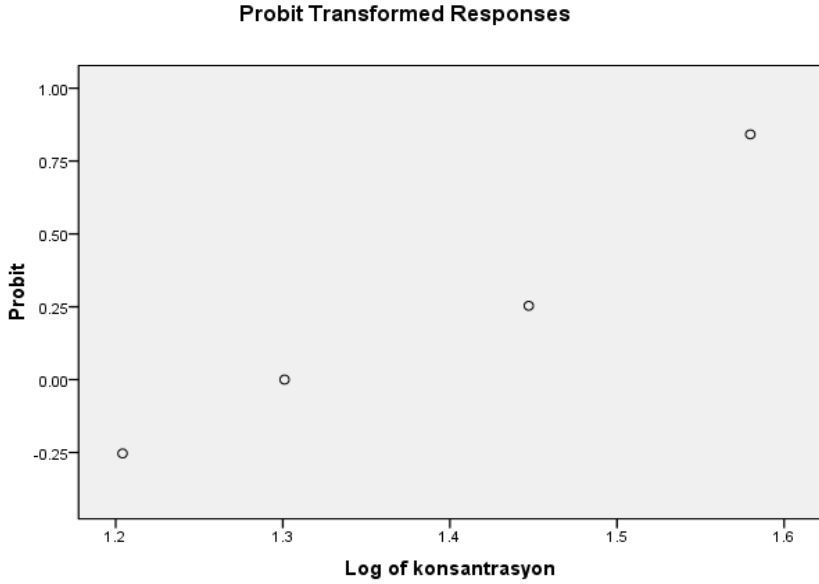
O. niloticus üzerinde yürütülen bu çalışmada Zn NP ve BP'lerinin 96 saatlik LC₅₀ değerinin belirlenmesi için toplam 5 farklı konsantrasyon denenmiş ve her bir grupta 10'ar adet balık kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonunda probit analizi yapılarak (Finney, 1971) nano çinko partikülleri için hesaplanan 96 saatlik LC₅₀ değeri 20,376 mg/L olup güven aralığı ise 12,184 – 25,834 mg/L olarak bulunmuştur (Tablo 5). Bulk çinko partiküllerinin 96 saatlik LC₅₀ değerinin belirlenmesi için ise toplam 5 farklı konsantrasyon denenmiş ve hesaplanan 96 saatlik LC₅₀ değeri 78,893 mg/L olup güven aralığı ise 55,774 – 97,086 mg/L olarak bulunmuştur (Tablo 6). *O. niloticus*'un ölüm oranı ile nano ve bulk çinko log konsantrasyonları arasındaki regresyon analizi Grafik 4 ve Grafik 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Nano Çinko Partikülünün Letal Değerleri ve %95 Güven Sınırları

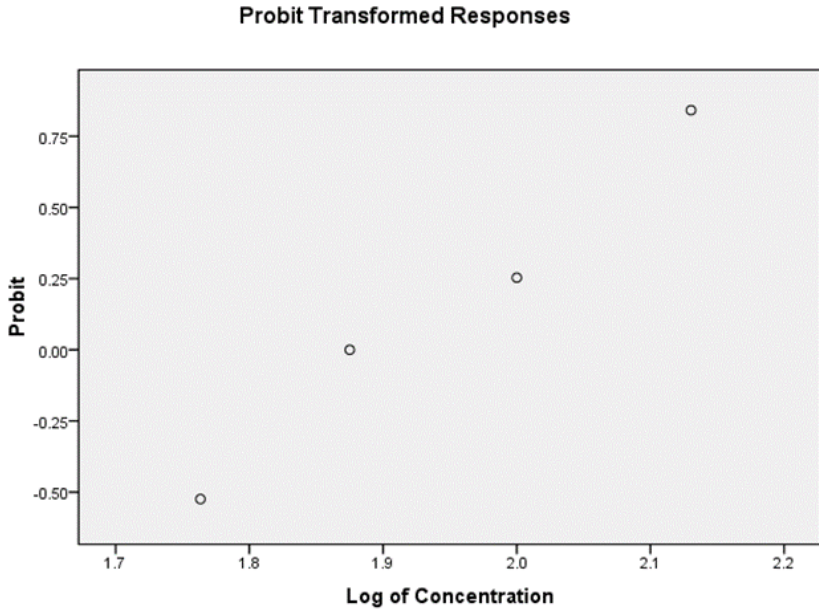
Test Hayvanı	96 saat LC ₅₀ (mg/L)	96 saat LC5 (mg/L)	96 saat LC95 (mg/L)	S.E.
O. niloticus	20,376 (12,184-25,834)	7,510 (0,899-12,423)	55,283 (38,518-30,188)	1,228

Tablo 6. Bulk Çinko Partiküllerinin Letal Değerleri ve %95 Güven Sınırları

Test Hayvanı	96 saat LC ₅₀ (mg/L)	96 saat LC5 (mg/L)	96 saat LC95 (mg/L)	S.E.
O. niloticus	78,893 (55,774-97,086)	33,806 (8,513-50,271)	184,111 (135,356-506,149)	1,314



Grafik 4. Nano Çinko Partikülünün Regresyon Analizi



Grafik 5. Bulk Çinko Partikülünün Regresyon Analizi

Akut toksisite testleri, ekosisteme yapılan toksik madde deşarjlarının organizmalar ve bir bütün olarak ekosistem üzerindeki etkileri hakkında ilk elden bilgi sağlar. Bu testler, bir ekosistemdeki toksik maddenin izin verilen sınırını belirlememize yardımcı olur (Singh ve Manjeet, 2015), bu tür endüstriyel atıkların çevreye olası zararlı etkileri konusunda farkındalık yaratması açısından değerlidir (Adedeji vd., 2008; Onyedineke vd. 2010). Yadav vd. (2007) suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametrelerindeki değişikliklerin balıkların davranışlarını değiştirmenin yanı sıra ölümlere de neden olduğunu bildirmiştir. LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi, bir kirleticinin güvenli veya tolerans seviyelerinin ölçümüne büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır (Prenter vd., 2004).

Önceki çalışmalarda, çeşitli kirleticilere maruz kalan balıkların anormal davranışsal ve morfolojik değişiklikler sergilediği bildirilmiştir. Bu değişiklikler düzensiz yüzme, yüzeye çıkmanın artması, operküler hareket hızının azalması, çevikliğin azalması ve maruz kalma süresi arttıkça normal duruş ve dengeyi sürdürememe olarak bildirilmiştir (Adedeji vd., 2008; Deepak vd., 2009). Benzer şekilde bu çalışmada da kontrol gruplarında davranış değişiklikleri ya da ölüm gözlenmezken Zn NP ve Zn BP'lerinin etkisinde balıklarda huzursuzluk, ani hızlı hareketler, solunum güçlükleri, yüzeye çıkma, denge kaybı, sırt üstü yüzme gibi anormal davranışlar gözlemlenmiş ve bu davranışları ölüm takip etmiştir.

Yapılan çalışmalardaki LC₅₀ verilerindeki farklılıklar, canlı organizmanın türü, yaşı, beslenme alışkanlığı, cinsiyeti, toksik maddenin bileşimi ve ayrıca testlerin gerçekleştirildiği deneysel koşullar dahil olmak üzere birçok faktörden kaynaklanmaktadır (Latif vd., 2013). Al₂O₃ NP'lerinin Temiz ve Kargın (2022), *O. niloticus* için ortalama 96 saatlik LC₅₀ değerini 52,4 mg/L olarak, Murali vd. (2017), 203 mg/L olarak bulurken, farklı bir balık türü olan *O. mossambicus*'ta 96 saatlik LC₅₀ değerini 235-245 mg/L olarak tespit etmiştir. Daha önce yapılan başka bir çalışmada, tatlı su

balığı *O. mossambicus*'ta Al_2O_3 NP'lerinin 96 saatlik LC_{50} değerinin 40 mg/L olarak belirlendiği rapor edilmiştir (Vidya ve Chitra, 2018). Abdal-Khalek vd. (2015a), *O. niloticus*'ta 96 saatlik CuO (BP (142-159 nm) ve NP (35-37 nm)) LC_{50} değerlerini sırasıyla 2205 mg/L ve 150 mg/L olarak bulmuştur. Aziz vd. (2020), *Labeo rohita*'da ZnO nanopartikülünün LC_{50} değerini 31,15 mg/L olarak bulmuştur.

Aynı tür ile yapılan akut toksisite deneylerinde bile farklı konsantrasyonlarda LC_{50} değerleri elde edilebilmektedir. Ghanman (2022) *O. niloticus*'ta bulk ve nano ZnO partiküllerinin 96 saatlik LC_{50} değerlerini ZnOBP için 84 mg/L, ZnONP için 5,6 mg/L olarak bulmuşlardır. Alkaladi vd. (2020) ise dişi juvenil nil tilapyaları için ZnONP 96 saatlik LC_{50} değerini 4,1 μ g/L olduğunu bildirmiştir. Abdel-Khalek vd. (2020) ise *O. niloticus*'ta 96 saatlik LC_{50} değerlerini ZnNP'ler için 180 mg/L, ZnBP'ler için 1360 mg/L olarak saptamıştır. Saddick vd. (2017), *O. niloticus* ve *Tilapia zilli* türlerinde ZnONP 96 saatlik LC_{50} değerini 5,5 ve 5,6 mg/L olarak bildirmiştir. Bu çalışmada ise *O. niloticus* için nano çinko partikülleri 96 saatlik LC_{50} değeri 20,376 mg/L olarak bulunurken bulk çinko partikülleri ise 78,893 mg/L olarak bulunmuştur. LC_{50} değerlerinde farklılık, balığın fizyolojik özellikleri, büyüklüğü ve deney ortamı parametreleri ile ilişkilendirilebilir. Farklı su kalitesi değerleri ile aynı türe ait deney gruplarının genetik direnç farklılıkları sonuçları etkileyebilmektedir (Yalçinkaya, 2013).

Doğal ortamlarda konsantrasyonları hızla artan metal ve nanopartikül gibi kirleticilerin ekosistem ve canlılar için yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceğinin bilinirliği günümüzde yapılan çalışmalarla artmıştır. Nano boyutlu materyaller, mikro ve makro boyutlu materyallere göre daha fazla toksik etkiye sahiptir (Chausali vd., 2023). Wigginton vd. (2007)'e göre nanopartiküller, aynı kimyasal bileşime sahip bulk partiküllerle karşılaştırıldığında büyük ölçüde farklı davranır. Nanomalzemelerin küçük boyutu, yüksek reaktivitesi ve birim hacmi başına yüksek yüzey alanı, ayrıca

kimyasal bileşim ve yüzey reaktivitesinden kaynaklanan toksisite etkileri, doğrudan nanopartikül toksisitesine katkıda bulunmaktadır (Navarro vd., 2008). Yapılan bu çalışmada ZnSO₄BP ile ZnONP'yi karşılaştırdığımızda LC₅₀ değerleri çinko sülfat bulk partikülleri için daha yüksek bulunmaktadır. ZnO nanopartiküllerinin LC₅₀ değerlerinin, ZnSO₄ bulk partiküllerinin LC₅₀ değerlerinin yaklaşık %25'i oranında bulunması, bulk partiküllerden daha toksik olabileceğini göstermektedir.

7. Karaciğer Dokusunda Çinko Birikimi

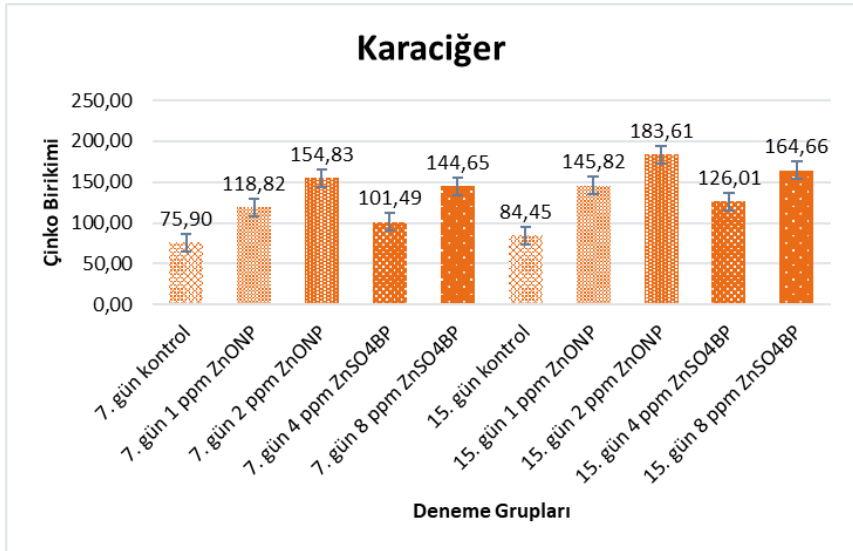
Farklı konsantrasyonlardaki ZnONP (1 ve 2 mg/L) ve ZnSO₄BP (4 ve 8 mg/L) solüsyonları etkisine farklı sürelerde (7. ve 15. gün) bırakılan *O. niloticus*'un karaciğer dokusundaki çinko (Zn) birikim düzeyleri Tablo 7'de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlara ve etkide kalma sürelerine bağlı karaciğer dokusundaki çinko birikim düzeyleri Grafik 6'da verilmiştir.

Tablo 7. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde O. niloticus'un karaciğer dokusunda birikim düzeyleri (µg/g k.a.).

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	75,90±6,05 ^{ax}	84,45±9,54 ^{ax}
1 mg/L ZnONP	118,82±10,47 ^{bx}	145,82±9,55 ^{by}
2 mg/L ZnONP	154,83±9,63 ^{cx}	183,61±13,34 ^{cy}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	101,49±10,05 ^{dx}	126,01±8,89 ^{dy}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	144,65±15,30 ^{cx}	164,66±13,26 ^{ey}

* Duncan; a,b,c,d,e harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 6. Karaciğer Dokusunda Gruplara Göre Çinko Birikim Düzeyleri ($\mu\text{g/g}$)

Su ortamındaki yaygın türlerden biri olan balıklar, habitatın fiziko-kimyasal özelliklerindeki herhangi bir değişikliğe oldukça duyarlıdır (Bukhari vd., 2012). Su ekosistemlerinde bulunan nanopartiküller, balıklar tarafından alınıp kan yoluyla doku ve organlara taşınmaktadır (Handy vd., 2008b). Metal partikülleri, balık karaciğerinde birikir ve burada detoksifiye edilir. Karaciğer, metabolizmanın çeşitli hayati fonksiyonlarında önemli bir rol oynar ve kirlетici maddelerin birikimi, biyotransformasyonu ve atılımının ana organıdır (Lanno vd., 1987). TiO_2NP etkisinin sazanlarda karaciğer yükünü artırdığını (Hao vd, 2013), zebra balığında lipidoza yol açabilecek karaciğer yaralanmalarına yol açtığı bildirilmiştir (Chen vd., 2011). Sazanın farklı dokularında (karaciğer, solungaç, bağırsak, beyin, kas) en yüksek Zn birikiminin karaciğerde tespit edilmesi sebebiyle, ZnONP'lerinin hedef dokusunun karaciğer dokusu olduğu bildirilmiştir. Çinkonun solungaç dolaşımı ve bağırsak adsorpsiyonu yoluyla aynı anda birden fazla yoldan karaciğere ulaştığı bilinmektedir.

ZnONP'lerdeki çinkonun konsantrasyon artışına bağlı olarak balığın karaciğer, kas ve solungaç dokularında birikmeye başladığı ve yüksek konsantrasyonlarında maksimum birikimin karaciğerde olduğu gözlenmiştir (Shahzad vd., 2019). ZnNP'leri, ZnBP'lere kıyasla özellikle renal ve hepatik doku olmak üzere tüm balık dokularında yüksek birikme potansiyeline sahiptir ve bu da ZnNP'lerinin farklı giriş mekanizmalarıyla hücre zarına kolayca nüfuz edebildiğini yansıtmaktadır (Abdel-Khalek vd., 2015b). Nanopartiküllerin uzun dolaşımı (kanda dakikalar yerine saatlerce kalan parçacıklar) (Haroon vd., 2022), bunların dokulara geçiş şansının artmasına ve dolayısıyla hücresel alımın artmasına neden olur (Li ve Huang, 2008). Parçacıklar hücrelere alındıktan sonra erken endozomlardan geç endozomlara ve son olarak lizozomlara doğru hareket ederken giderek artan asidik bir ortamla karşılaşır ve bu da onların çözünmesine neden olur (Nel vd., 2009). Bu tür olaylar, bu çalışmada karaciğer dokusunda gözlenen Zn birikimlerindeki artışlara katkıda bulunmuş olabilir. 30 gün boyunca 2 mg/L ZnONP'lere maruz kalan Japon balıklarında (*C. auratus*), NP'lerin en fazla solungaçlarda ve sonra da karaciğerde biriktiği görülmüştür (Fan vd., 2013).

Biyobirikim, bir kirleticinin bir organizmada birikmesini ifade eder ve tüm maruz kalma yolları dikkate alınır (Bour vd., 2014). Biriken NP'ler yalnızca su kütlelerinin kalitesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda mutajenik ve karsinojenik reaksiyonları tetiklemenin yanı sıra çeşitli biyolojik değişikliklere neden olarak suda yaşayan canlıları da etkilemektedir (Lee vd., 2009). Bu çalışmada karaciğer dokusunda yüksek çinko birikimi partikül büyüklüğü, konsantrasyon miktarı ve etkide kalma süresine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir ($p < 0,05$). 15 günlük deneme sonunda *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda çinko birikimi kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarının (1 mg/L ve 2 mg/L ZnONP, 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP) zamana ve

konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği saptanırken; ayrıca ZnONP'lerinin, ZnSO₄BP'lerine göre daha fazla Zn birikimi gösterdiği saptanmıştır (P<0,05). Karaciğer dokusundaki yüksek Zn birikimi, BP'lerin neden olduğu nispeten düşük alım seviyelerine kıyasla NP'lerin daha fazla fizyolojik metabolizmaya katılmasına ve balıklar için daha ciddi tehditlere neden olmasına neden olabilir; bu aynı zamanda partikül alımının parçacık boyutuna bağlı olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, Hao vd. (2013), *C. carpio* 'da nano partiküllerin bulk partiküllerden daha fazla birikim gösterdiğini bildirmiştir.

8. mRNA Ölçümleri

RNA kalite ve miktarlarının ölçümleri Thermo Fisher Multiskan Go cihazı ile gerçekleştirilmiştir. RNA pelletleri DEPC su da homojen hale getirilmiştir. Verilen değerler 2 µL RNA'dan elde edilmişlerdir. Cihazda yapılan okuma sonuçlarına göre örneklerin 260/280 oranı 1.7 ile 2.00 arasında bulunmuştur. Bu değerler protein kontaminasyonu hakkında bilgi verir. Saf RNA için 2 civarında olması beklenir.

9. Antioksidan Enzimlerin ve HSP70'in Gen Ekspresyonları

Son yıllarda çok sayıda balık geninin dizilenmesi, çevresel zorluklara maruz kalan hayvanların hücrelerindeki mRNA seviyelerinin ölçülmesine olanak sağlamıştır. Gen ekspresyonu çalışmaları, mRNA seviyeleri belirli bir zamandaki hücre aktivitesinin anlık görüntüsünü temsil ettiğinden, protein ve enzim incelemelerine faydalı analizlerdir. Birçok durumda, tek gen mRNA ekspresyonları hayvanlarda stresin yararlı biyobelirteçleri olmaktadır (Bustin, 2000). Karaciğer dokusunda incelenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar kat artışı (fold change) değeri olarak ifade edilmiş olup $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır.

1. Karaciğer Dokusunda SOD Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları

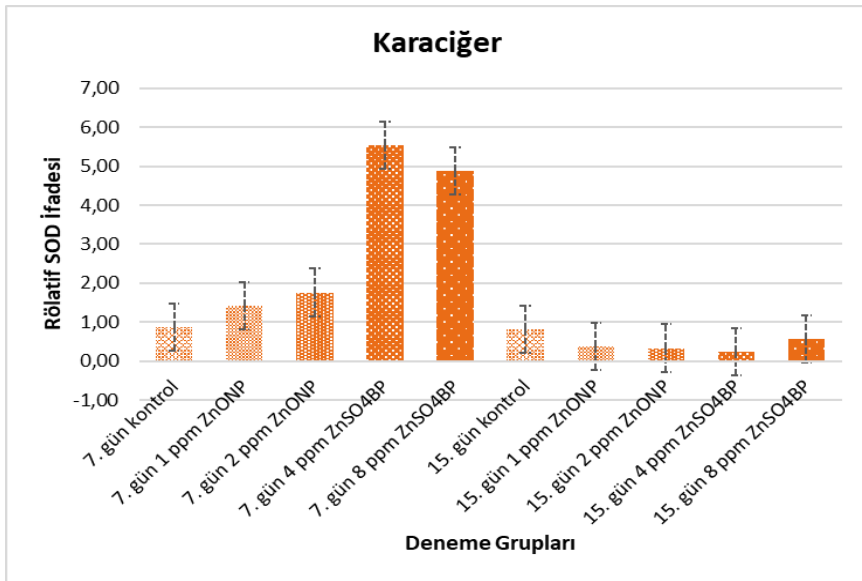
1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP'lerinin subletal konsantrasyonlarının etkisinde 7, 15 gün süresince *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda SOD geni rölatif ekspresyonlarının tüm gruplarda kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği, fakat bu değişiklikler 7. günde istatistiksel anlamlılık gösterirken, 15. günde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p<0,05$). *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda SOD geni rölatif ekspresyonları Tablo 8 ve Grafik 7'de sunulmuştur.

Tablo 8. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde O. niloticus'un karaciğer dokusunda β -Aktin'e kıyasla SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	0,87 $\pm$ 0,18 ^{ax}	0,82 $\pm$ 0,24 ^{ax}
1 mg/L ZnONP	1,43 $\pm$ 0,3 ^{bx}	0,38 $\pm$ 0,13 ^{ay}
2 mg/L ZnONP	1,76 $\pm$ 0,54 ^{bx}	0,34 $\pm$ 0,21 ^{ay}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	5,54 $\pm$ 0,83 ^{cx}	0,25 $\pm$ 0,21 ^{ay}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	4,88 $\pm$ 0,72 ^{dx}	0,57 $\pm$ 0,29 ^{ay}

* Duncan; a,b,c,d harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel ayırım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 7. Karaciğer dokusuna ilişkin SOD geni rölatif ekspresyon seviyeleri

Balıklar çeşitli antioksidan enzimleri dahil ederek kendilerini oksidatif strese korurlar. Bunların arasında SOD, ROS'a karşı ilk savunma hattından sorumlu, radikal temizleyici bir enzimdir. Bu nedenle bu enzim, özellikle ağır metaller de dahil olmak üzere toksik kimyasalların neden olduğu kirlilik açısından çok yönlü biyobelirteçlerden biri olmuştur. Çevresel risklerin erken uyarısı amacıyla balık organlarında SOD'un değişen ekspresyonunu incelemek için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Basha ve Rani, 2003; Pandey vd., 2003). Bu çalışmada SOD gen ekspresyonlarında 7. günde hem ZnONP hem de ZnSO₄BP gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı uyarılma gözlenmiştir ($P < 0,05$). Yapılan çalışmalar, metal maruziyetinin balık modellerinde transkripsiyon faktörlerinin ve bunların hedef genlerinin mRNA seviyelerinin artmasına neden olabileceğini göstermiştir (Gyrd-Hansen vd., 2006; Wang vd., 2016; Zheng vd., 2018).

SOD doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile antioksidan savunmalar arasındaki homeostatik dengenin geliştirilmesi ve sürdürülmesinde önemli roller üstlenen bir enzimdir (Sheng vd., 2014). 7. günde gözlenen gen ekspresyonlarında anlamlı artış (uyarılma) ($P<0,05$), lipid peroksidasyon süreçleri sırasında meydana gelen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın azaltılmasına yönelik bir gösterge vermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Ancak ZnONP ve ZnSO₄BP etkisinde kalınmasının devam etmesi 15. günde antioksidan kapasitenin düşmesine sebep olmuştur. 15. günde ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre baskılanma göstermiştir, ancak istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır ($P>0,05$). SOD aktivitesinde ve mRNA ekspresyonundaki azalma, oksidan eliminasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmıştır (Moreno vd., 2005).

15. günde SOD gen ekspresyonlarındaki baskılanmalar, nano ve bulk partiküllerde benzerlik gösterirken ROS varlığından kaynaklı olabilir. 7. günde ZnSO₄BP'lerde görülen yukarı doğru regülasyonların, ZnONP'lerden 2 katı kadar daha fazla olduğu saptanmıştır ($P<0,05$).

2. Karaciğer Dokusunda CAT Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları

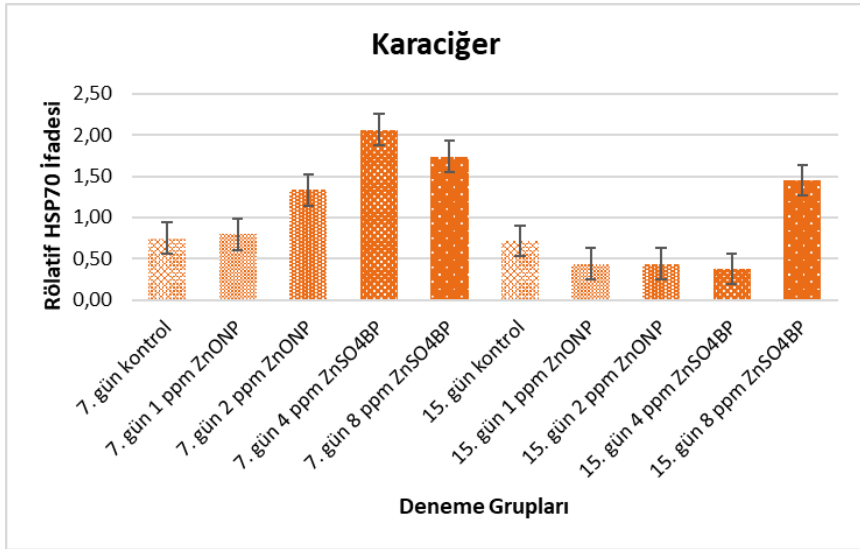
1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP'lerinin subletal konsantrasyonlarının etkisinde 7, 15 gün süresince *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda CAT geni rölatif ekspresyonlarının tüm gruplarda kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği, fakat bu değişiklikler 7. gün 1 mg/L ZnONP ve 15. günde 1 ve 2 mg/L ZnONP gruplarında istatistiksel anlamlılık taşımazken diğer örneklemelerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda CAT geni rölatif ekspresyonları Tablo 9 ve Grafik 8'de sunulmuştur.

Tablo 9. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda β -Aktin'e kıyasla CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	0,75 $\pm$ 0,13 ^{abx}	0,71 $\pm$ 0,19 ^{abx}
1 mg/L ZnONP	0,80 $\pm$ 0,16 ^{bx}	0,44 $\pm$ 0,07 ^{acy}
2 mg/L ZnONP	1,33 $\pm$ 0,15 ^{cx}	0,43 $\pm$ 0,12 ^{acy}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	2,07 $\pm$ 0,06 ^{dx}	0,38 $\pm$ 0,19 ^{cy}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	1,74 $\pm$ 0,25 ^{cx}	1,45 $\pm$ 0,54 ^{dex}

* Duncan; a,b,c,d,e,f harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 8. Karaciğer dokusuna ilişkin CAT geni rölatif ekspresyon seviyeleri

Katalaz, O_2 ve H_2O 'ya dönüştürülen, H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasına yardımcı olan hematin içeren enzimlerdir (Vander Oast vd., 2003). H_2O_2 'ye ek olarak çeşitli lipid peroksidleri azaltabilen bazı peroksidazların aksine, CAT yalnızca H_2O_2 'yi azaltabilir (Filho, 1996).

Bu çalışmada 7. Gün CAT gen ekspresyonlarının 1 mg/L ZnONP grubu hariç kontrole göre anlamlı yukarı doğru regülasyon saptanmıştır ($P<0,05$). 6 hafta boyunca 200 μ g/L çinko etkisinde zebra balığında CAT ekspresyonlarında artan enzim aktiviteleriyle uyumlu uyarılmalar saptanmıştır (Si vd., 2019). Oksidatif strese verilen genetik tepkiler adaptif olabilir, antioksidanla ilgili genlerin transkripsiyonundaki bir artış daha sonra canlının antioksidan tepki kapasitesini artırabilir (Wu vd., 2017). Yoğun çinko içeren yem (710,6 mg/kg) ile beslemenin sebep olduğu Cu/Zn-SOD ve CAT gen ekspresyonlarındaki artışlar, enzimlerin oksidatif stres altında aşırı ROS'u ortadan kaldırmak için güçlendirildiklerini göstermektedir (Wu vd., 2011). Birçok çalışma, antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının uyarılmasının veya aktivitelerinin artmasının, suda yaşayan canlıların daha iyi yaşam süresi ve sağlıklı durumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Fang vd., 2002, Wu vd., 2011). Ayrıca, ROS ve antioksidanlar (örneğin Zn) arasındaki homeostaz durumları, konakçıların sağlığı ve hayatta kalması için uygundur (Fang vd., 2002).

15. günde CAT gen ekspresyonu düşük doz $ZnSO_4BP$ 'de (4 mg/L) kontrole göre önemli azalma saptanırken, yüksek doz $ZnSO_4BP$ 'de önemli artışlar saptanmıştır ($P<0,05$). 15. Gün 1 ve 2 mg/L ZnONP gruplarında kontrol grubuna göre baskılanma olsa da istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır, sadece 2 mg/L $ZnSO_4BP$ grubundaki baskılanma anlamlıdır. Wu vd. (2011), *Haliotis discus hannai*'de yem ile çinko takviyesi (33,8 mg/kg) yapılan gruplarda gen ekspresyonları miktarlarının, yoğun çinko takviyesi (3462,5 mg/kg) yapılan gruplarla kıyaslandığında daha yüksek olduğunu

bildirmişlerdir ($P < 0,05$). Uzun süreli ve yoğun miktarlarda Zn alımı aşırı ROS birikimine neden olarak oksidatif stres yaratmaktadır (Kindermann vd., 2005; Cabreiro vd., 2009).

3. Karaciğer Dokusunda GPx Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları

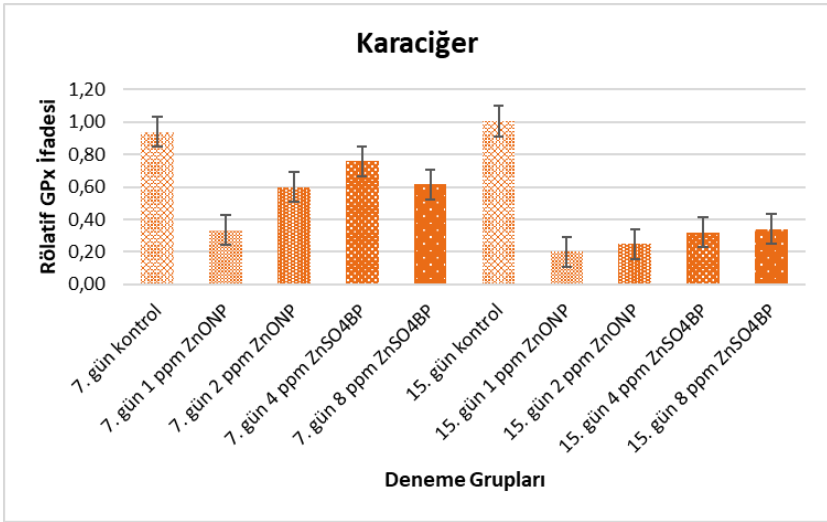
1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP'lerinin subletal konsantrasyonlarının etkisinde 7, 15 gün süresince *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda GPx geni rölatif ekspresyonlarının tüm gruplarda kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği, bu değişikliklerinde tüm örneklemelerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda GPx geni rölatif ekspresyonları Tablo 10 ve Grafik 9'da sunulmuştur.

Tablo 10. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde O. niloticus'un karaciğer dokusunda β -Aktin'e kıyasla GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	0,94 $\pm$ 0,13 ^{ax}	1,01 $\pm$ 0,11 ^{ax}
1 mg/L ZnONP	0,33 $\pm$ 0,13 ^{bx}	0,21 $\pm$ 0,12 ^{by}
2 mg/L ZnONP	0,60 $\pm$ 0,32 ^{cx}	0,25 $\pm$ 0,09 ^{by}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	0,76 $\pm$ 0,25 ^{dcx}	0,32 $\pm$ 0,14 ^{by}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	0,62 $\pm$ 0,14 ^{cx}	0,34 $\pm$ 0,11 ^{by}

* Duncan; a,b,c,d harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 9. Karaciğer dokusuna ilişkin GPx geni rölatif ekspresyon seviyeleri

Glutasyon peroksidaz enzimleri, GSH'ın, GSSG'ye oksidasyonu yoluyla H_2O_2 'i, H_2O 'ya veya organik peroksitlerin benzer stabil alkollere dönüşümünü katalize eden selenyum içeren proteinlerdir (Manduzio vd. 2004).

Çalışmada GP_X gen ekspresyonlarının ZnONP ve ZnSO₄BP'ne maruz kalan tüm gruplarda kontrol grubuna göre 7 ve 15. günde önemli ölçüde baskılandığı, bu baskılanmanın ZnONP'ne maruz kalan gruplarda daha fazla olduğu saptanmıştır ($P < 0,05$). Çinko NP ve BP'lerde görülen antioksidan genler üzerindeki baskılayıcı etki, metalin DNA üzerindeki zararlı etkisi ile açıklanabilir (Saddick vd., 2017). Wang vd. (2020) çinko ile zenginleştirilen su mercimeği ile 42 gün boyunca beslenen Nil tilapyaalarında GP_X enzim aktivitesinin önemli derecede azaldığını bildirmiştir. Meiler vd. (2021), *O. mykiss*'te farklı dozlarda (10,4 Zn grubu hariç) çinko besin takviyelerinin GP_X gen ekspresyonlarını baskıladığını bildirmiştir.

4. Karaciğer Dokusunda GST Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları

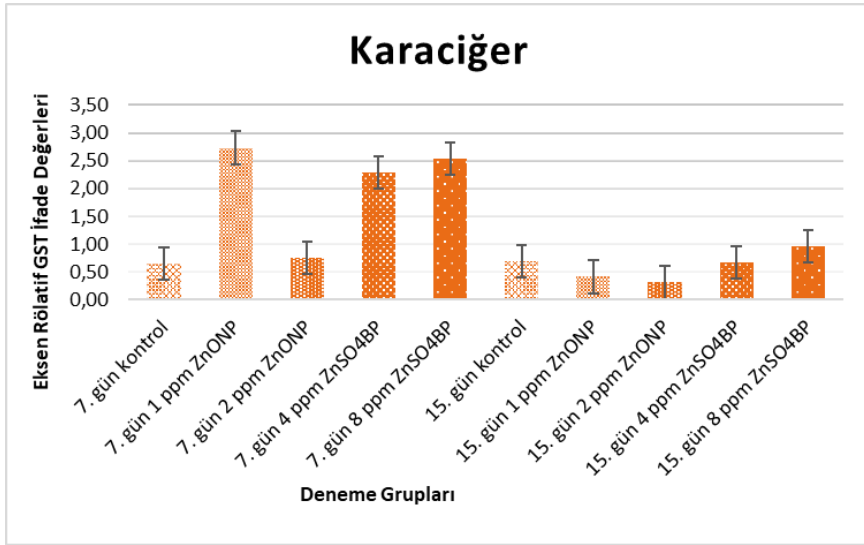
1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP'lerinin subletal konsantrasyonlarının etkisinde 7, 15 gün süresince *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda GST geni rölatif ekspresyonlarının tüm gruplarda kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği, fakat bu değişiklikler 7. günde 2 mg/L ZnONP, 15. günde 1 mg/L ZnONP, 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP gruplarında istatistiksel anlamlılık taşımazken diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda GST geni rölatif ekspresyonları Tablo 11 ve Grafik 10'da sunulmuştur.

Tablo 11. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde O. niloticus'un karaciğer dokusunda β -Aktin'e kıyasla GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	0,65 $\pm$ 0,05 ^{abx}	0,70 $\pm$ 0,07 ^{abx}
1 mg/L ZnONP	2,73 $\pm$ 0,23 ^{cx}	0,41 $\pm$ 0,17 ^{acy}
2 mg/L ZnONP	0,76 $\pm$ 0,31 ^{bx}	0,32 $\pm$ 0,12 ^{cy}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	2,29 $\pm$ 0,38 ^{dx}	0,68 $\pm$ 0,08 ^{aby}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	2,54 $\pm$ 0,24 ^{dx}	0,96 $\pm$ 0,15 ^{by}

* Duncan; a,b,c,d,e harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 10. Karaciğer dokusuna ilişkin GST geni rölatif ekspresyon seviyeleri

Toksik kimyasalların organizmalardaki biyotransformasyon reaksiyonu transformasyon, konjugasyon ve atılım şeklinde üç aşamada gerçekleşir. GST, ksenobiyotik bileşikler taşıma veya atılım için daha hidrofilik hale getirmek amacıyla elektrofilik maddelerin veya grupların tripeptit glutatyon konjugasyonunu destekleyen bir faz II enzim sistemidir (Egaas vd., 1993). Balıklarda ve diğer deniz organizmalarında, birçok ksenobiyotik, GST'ler tarafından detoksifiye edilmektedir. Bu enzimatik sistem, su kirliliğinin belirlenmesinde bir çeşit haberci biyomarkerdir (Riol vd., 2001). Çeşitli ksenobiyotiklerin etkisi ile organizmada GST'nin indüksiyonu, çevredeki değişimlere adaptasyonu için bir yoldur (Mikhailova vd., 2005). Birçok türde GST ekspresyon seviyeleri yabancı bileşiklere maruz kalma ile önemli derecede artması, bu artış sucul kontaminasyonun etkili biyomarkeri olarak uygunluğunu göstermektedir. Bu enzimler, balıklar ve diğer deniz canlılarında bileşiklerin büyük bir çeşidinin detoksifikasyonuna katılırlar. Bu enzimler temel olarak balıkların karaciğerlerinde bulunmasına

ragmen, çeşitli balıkların solungaç, böbrek, ve bağırsaklarında GST aktiviteleri gösterilmiştir (Gallagher ve Di Giulio, 1992; Al-Ghais vd., 1999; Pérez-López vd., 2000).

Ksenobiyotiklerin faz II biyotransformasyonuna katkıda bulunduğu düşünülen GST'ler, GSH'ın çeşitli elektrofilik maddelerle konjugasyonunu katalize eder ve lipid peroksitlerin parçalanma ürünlerini GSH'ye bağlayarak oksidatif hasarın önlenmesinde rol oynar. Bu çalışmada 7. Gün 1 mg/L ZnONP ve 4 mg/L ZnSO₄BP gruplarında kontrole göre GST ekspresyonlarında fazla uyarılmalar saptanmıştır ($P<0,05$). Chae vd. (2009), düşük AgNO₃ dozlarının, yüksek dozlara göre daha yüksek GST mRNA seviyelerine yol açtığını ve her iki durumun da zamana bağlı olduğunu bildirmiştir. Lee vd. (2008), eser metallere maruz bırakıldığında deniz kopepodunda (*Tigriopus japonicus*) GST izoform genlerinin ekspresyonunu incelediği çalışmada, Ag'nin çoğu GST mRNA'sında düşük konsantrasyonlarda (4-12 µg/L) önemli ölçüde artışlara neden olmuş ve bazı GST izoformları zamana bağlı bir yanıt göstermiştir. Aynı LC₅₀ oranlarında (%5 ve %10) ZnONP ve ZnSO₄BP konsantrasyonları etkisine bırakılan balıklar arasındaki gen ekspresyon modellerindeki önemli farklılıklar, bu iki çinko formunun farklı toksik etkilerini de ortaya koymaktadır.

15. günde ZnONP ve ZnSO₄BP partiküllerinin her ikisinde de kontrol grubuna göre zamana ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak anlamlı azalmalar saptanmıştır. Meiler vd. (2021), *O. mykiss*'te farklı dozlarda çinko besin takviyelerinin GST gen ekspresyonlarını baskıladığını bildirmiştir. 15. gün 2 mg/L ZnONP grubunda GST ekspresyonlarındaki azalma (2,5 kat) gözlenirken, 8 mg/L ZnSO₄BP gen ekspresyonunda artış (4 kat) gözlenmiştir.

5. Karaciğer Dokusunda HSP70 Genine İlişkin Ekspresyon Bulguları

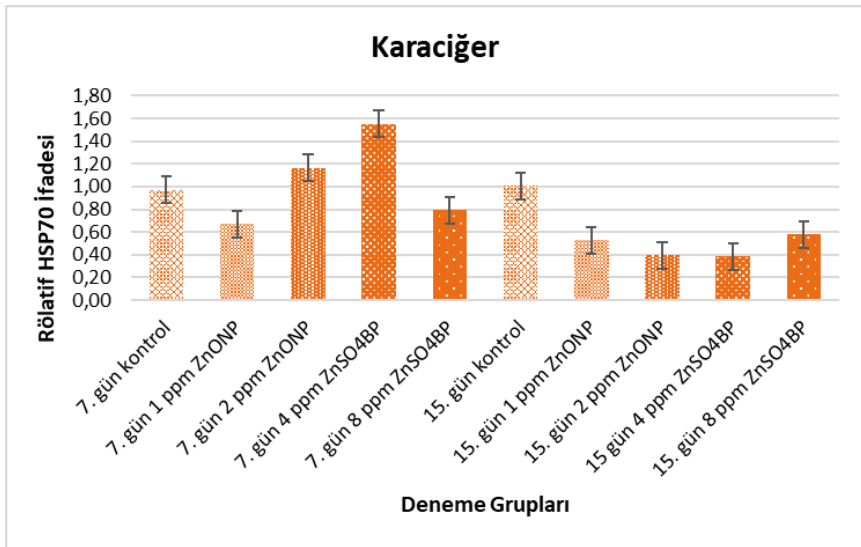
1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP'lerinin subletal konsantrasyonlarının etkisinde 7, 15 gün süresince *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda HSP70 geni rölatif ekspresyonlarının 7. gün 2 mg/L ZnONP grubu hariç tüm gruplarda kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği, bu değişikliklerinde tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda HSP70 geni rölatif ekspresyonları Tablo 12 ve Grafik 11'de sunulmuştur.

Tablo 12. Çinkonun farklı boyut ve subletal konsantrasyonlarının etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda β -Aktin'e kıyasla HSP70 geni rölatif ekspresyon seviyeleri

DERİŞİM	SÜRE (GÜN)	
	7. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	15. Gün ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)
Kontrol	0,97 $\pm$ 0,05 ^{ax}	1,01 $\pm$ 0,14 ^{ax}
1 mg/L ZnONP	0,67 $\pm$ 0,09 ^{bcx}	0,53 $\pm$ 0,13 ^{bx}
2 mg/L ZnONP	1,16 $\pm$ 0,18 ^{ax}	0,40 $\pm$ 0,11 ^{cy}
4 mg/L ZnSO ₄ BP	1,55 $\pm$ 0,23 ^{dx}	0,39 $\pm$ 0,12 ^{dy}
8 mg/L ZnSO ₄ BP	0,79 $\pm$ 0,10 ^{cx}	0,64 $\pm$ 0,21 ^{bcx}

* Duncan; a,b,c,d,e harfleri ZnONP ve ZnSO₄BP'lerin farklı subletal konsantrasyonlarının, x ve y harfleri ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistiksel ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama $\pm$ Standart sapma



Grafik 11. Karaciğer dokusuna ilişkin HSP70 geni rölatif ekspresyon seviyeleri

Isı şok proteinleri organizmayı çevresel ve biyolojik kökenli streslerden koruyan ve stres anında bulunduğu hücrede miktarı artan proteinlerdir. Isı şok proteinleri, hücrenin stres varlığında oluşturdukları kendini koruma mekanizmasıdır. Yani herhangi bir hücresel yapısına ya da genetik materyale (DNA, RNA) zarar oluşturmaması için ürettikleri proteinlerdir. Bu nedenle bu proteinlerin yüksek miktardaki üretimi hücrenin stres altında olduğunun en büyük göstergesidir (Bener vd., 2018).

HSP70 ailesi organizmalar için hücre savunmasında önemli bir rol oynar ve hücresel strese duyarlılığı ve hızlı tepkisi nedeniyle bir biyobelirteç olarak yaygın şekilde kullanılır (Chen vd., 2009). Bu çalışmada 15. gün 2 mg/L ZnONP ve 4 mg/L ZnSO₄BP grupları hariç tüm gruplarda HSP70 gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre azalma göstermiştir ($P<0,05$). HSP70 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olması, çoğu antioksidan enzim gen ekspresyonlarında bulduğumuz (CAT ve SOD (15. gün),

GP_x, GST (7. ve 15. gün) baskılanmalarla tutarlılık göstermektedir. Artan HSP70 seviyeleri, HSF'lerin gen promoter bölgelerindeki ısı şoku elemanları ile etkileşime girerek HSP70 proteinlerinin denatüre proteinlerin konformasyonunu yeniden oluşturmak veya bunların bozulmasını kolaylaştırmayı sağlamaktadır (Pockley, 2003; Wang vd., 2011). HSP70'in baskılanması ise sıklıkla uyarılmasından daha toksik bir tepkiye işaret etmektedir (Arts vd., 2004). Benzer şekilde Wang vd. (2020) Cu ve Cu+Zn etkisindeki Nil tilapyelerinde baskılanan HSP70 gen ekspresyonlarını yoğun stres göstergesi olarak bildirmiştir. Kumar vd. (2023), *Pangasianodon hypophthalmus*'a ZnNP yem ilavesinin HSP70 gen ekspresyonunda baskılanmaya yol açtığını bildirmiştir. ZnONP ve ZnSO₄BP'nin *O. niloticus* karaciğer dokusunda sebep olduğu oksidatif stres sonucunda NF- κ B'nin etkilerini artırmaktan sorumlu olan glukokortikoid reseptör protein komplekslerinin oluşumunda hayati bir rol oynayan (Kanelakis vd., 1999) HSP70 mRNA'nın azalması, tilapyanın bağışıklık sisteminin de zayıflamasına da sebep olmaktadır (Wang vd., 2020).

Esansiyel bir metal olan çinko, balıklardaki biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynar. Çinko büyümeyi, enzim aktivitelerini ve protein metabolizmasını etkilemektedir (Watanabe vd., 1997; Wang vd., 2020). Diğer taraftan Zn'nin aşırı seviyeleri organizmalar için zararlıdır. Zn'nin aşırı emilimi, suda yaşayan hayvanlarda üreme performansını, büyümeyi ve diğer minerallerin kullanımını engelleyebilir (Jeng ve Sun, 1981; Shiau ve Jiang, 2006). Yüksek Zn seviyeleri balıklarda ROS oluşmasına neden olabilir (Zheng vd., 2011). Yoğun ROS üretimi, oksidatif strese ve biyolojik moleküllerin (yani lipit, DNA ve proteinler) hasarına yol açacak ve bu da lipit peroksidasyonuna, DNA eklentilerinin oluşumuna, protein parçalanmasına ve amino asit modifikasyonuna neden olacaktır (Joshi vd., 2011). Bu çalışmada, 1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta 7. günde

SOD, CAT, GST (1 mg/L ZnONP ve 4 mg/L ZnSO₄BP gruplarında), HSP70 (4 mg/L ZnSO₄BP grubunda) gen ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla koordineli bir uyarılma gözlenmiştir ve bu uyarılmaların karaciğer dokusunda oksidatif hasara karşı koruyucu bir rol olabileceği düşünülmektedir.

Zn⁺², Ca⁺² geçirgen AMPA/kainat kanalları aracılığıyla mitokondriyal ROS üretimini tetikleyebilir (Sensi vd., 1999) ve lipoamid dehidrojenaz aktivitelerini bastırabilir (Gazaryan vd., 2002), ardından oksitlenmiş lipidler ve proteinlerde ciddi bir artışa neden olabilir (Lemire vd., 2008) ve mitokondri fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Dineley vd., 2005). Antioksidan sistem aşırı ROS ve H₂O₂'yi ortadan kaldıramadığında veya nötrleştiremediğinde, lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonunun birikmesi nedeniyle oksidatif hasar riski artar, bu da enzim aktivitelerini azaltabilir ve hatta enzimleri bozabilir. (Zhang vd., 2008). 1 ve 2 mg/L ZnONP ve 4 ve 8 mg/L ZnSO₄BP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta 7. gün ve 15. günde GP_x, GST (7. gün 1 mg/L ZnONP ve 4 mg/L ZnSO₄BP grupları hariç) ve HSP70 gen ekspresyonlarında (7. gün 4 mg/L ZnSO₄BP grubu hariç); SOD ve CAT gen ekspresyonlarında ise 15. günde kontrol grubuna kıyasla koordineli bir baskılanma gözlenmiştir ($P<0,05$). Bunun da uzun süreli etkide kalma süresine bağlı olarak çinkonun nano ve bulk formlarının antioksidan-prooksidan dengesinin bozularak deney gruplarına ciddi hasarlar verdiğinin göstergesi olduğu düşünülmektedir. Prooksidanlar antioksidan enzimlerin yapısını bozarak mRNA ekspresyonlarında azalmaya sebep olmaktadır (Moreno vd., 2005).

Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri yalnızca element kompozisyonuna değil, aynı zamanda yüzey alanları, sentezleri ve çevresel koşullara (pH, sıcaklık, oksidasyon, ışık vb.) bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Borm ve Müller-Schulte, 2006). Bu nedenle, nanomalzemeler üzerine yapılan araştırmaların

sonuçları kesin değildir ve aynı tür nanoparçacıklarla ilgili bulgular, çoğu durumda farklılık göstermektedir (Hao ve Chen, 2012). Bu çalışmada ZnONP'lerinin, ZnSO₄BP'lerine göre LC₅₀ değeri belirlenirken daha düşük dozda LC₅₀ değerine (ZnSO₄BP LC₅₀ değerinin %25'i) sahip olduğu, karaciğer dokuda ZnSO₄BP gruplarına göre daha fazla çinko birikimine sebep olduğu tespit edilirken; bazı antioksidan gen ekspresyonları parametrelerinde bulk çinko sülfat partiküllerinin daha fazla baskı ya da uyarı yaptığı saptanmıştır. İnsan sağlığını doğrudan etkileyen sucul ekosistemler üzerinde toksik etkileri tam olarak anlaşılamayan nanopartiküller üzerine daha fazla çalışma yapılması gerektiği tespit edilmiştir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın temel amacı, ZnONP ve ZnSO₄BP'lerinin balık karaciğer dokusunda karşılaştırmalı toksisitesini değerlendirmektir. 96 saatlik LC₅₀ analizlerinin sonucunda ZnONP'nin, ZnSO₄BP'ne göre daha düşük dozda LC₅₀ değerine (%25 daha az) sahip olduğu saptanmıştır. ZnONP'lerinde 15 gün subakut konsantrasyonlar etkisine bırakılan balıklarda birikimin daha fazla olduğu ve bazı oksidatif stres etkilerinin daha yoğun olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bazı enzim ekspresyonlarında ise bulk partiküllerde çok daha yoğun ekspresyon farklılıkları belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, farklı boyutlardaki metal partiküllerinin karaciğer dokusunda biriktiğini, canlı organizmada sebep olduğu toksik etkileri ve partikül boyutlarının farklı toksik cevaplara yol açtığını göstermiştir. Çalışmanın bulguları, balıklarda SOD, CAT, GPx, GST antioksidan enzimlerinin ve HSP70'in moleküler düzeyde incelenmesinin, nano çinko oksit ve bulk çinko sülfat partiküllerinin toksisitesinin biyobelirteçleri olarak etkili bir şekilde kullanılabileceğine dair daha önceki bulguları doğrulamaktadır.

Son yıllarda oksidatif stres toksikolojinin önemli bir konusu haline gelmiş ve giderek daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. Oksidatif stresin, özellikle oksidatif stres üretebilen birçok kirlетici için deşarj alanı olan sucul ekosistemlerin ekolojik öneme sahip olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır. Bu çalışma aynı zamanda balıkların önemli biyoindikatörler olarak hizmet edebileceğini ve oksidatif stresin anlaşılmasında yararlı alternatif modeller olarak kullanılabileceğini vurgulamaktadır. Balıklarla yapılan çalışmalar, araştırmada kullanılan memelilerin sayısını azaltma/kaçınma, maliyet etkinliği ve çalışma başına organizma sayısını artırarak istatistik açıdan deney sonuçlarının doğruluk oranının artmasına olanak tanınması gibi özellikleri nedeniyle oksidatif stresi incelemek için çeşitli avantajlara sahiptir. Bu anlamda balık modellerinin oksidatif stresi incelemek ve çevre sorunlarını insan sağlığı ve ekolojik açıdan değerlendirmek için de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Metal nanopartiküllerinin kullanımındaki hızlı artış, bu partiküllerin çevreye kontrolsüz salınımına yol açmaktadır. Son zamanlarda antropojenik aktiviteler tarafından salınan bu partiküllerin etkisinde kalması nedeniyle sucul ekosistemler ve sucul organizmaların besin zincirinde riske neden olmaktadır. Artan taleplere bağlı olarak yoğun üretimi yapılan nanopartiküllerin çoğunun sucul ekosistemlere karışabilme ihtimali, bunların sudaki toksisitesine yönelik büyük endişeler doğurmaktadır. Üretilen metaloksit NP'lerin yaygın olarak uygulanması, karada ve suda yaşayan organizmaların güvenliği konusundaki endişeleri artırmaktadır. NP'lerin artan üretimi ve uygulamaları nedeniyle çevreye salınmaları kaçınılmaz olacaktır; bu da onların çevredeki sonuçlarının ve davranışlarının daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Doğal çevresel parametrelerin NP toksisitesi ve toksik etki mekanizması üzerindeki etkisini incelemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma, metaloksit NP'lerin bulk

partiküllere göre daha yoğun olan çevresel etkileri ve sağlık üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır.

Veriler analiz edildiğinde çinko NP'lerinin, çinko BP'lerden daha güçlü toksisiteye sahip olabileceği, çinkonun her iki partikül büyüklüğünde de (BP'ler ve NP'ler) balık sağlığı üzerinde zararlı etkileri olabileceği ve balık ölümlerine yol açabileceği sonucuna varılabilir. Bu veriler, toksikolojik etkilerini yorumlayabilmek için Zn NP'ler hakkında yeni bilgiler eklemektedir. Bu durum, Zn (BP ve NP)'lerin doğal ortamlarda yeterli seviyeye ulaşması durumunda çevresel biyota için önemli risk oluşturabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu malzemeye yönelik risk değerlendirmesi ve yönetimi için Zn NP ekotoksitesinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için doldurulması gereken çeşitli bilgi boşlukları vardır.

Nanomalzemelere ilişkin mevzuat, toksikolojik bilgi eksikliği ve alanın yeniliği nedeniyle sınırlıdır. Ancak, yüzey ve yer altı su kaynaklarının kirlenmesini azaltacak uygun bertaraf mekanizmalarının geliştirilmesine izin vermek için potansiyel "kirleticilerin" sonuçlarını ve etkisini anlamamız çok önemlidir. Bu çalışmanın sonuçları, yüzey veya yer altı sularına salınmaları ekosistem sağlığına zararlı etkiler yaratabileceği saptanan bu bileşiklerin (ZnONP ve ZnSO₄BP) her biri için kontrollü kullanım ve güvenli imha protokollerine duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır. Artan yoğun kimyasal kullanımının çevresel etkilerini gösteren bilimsel çalışma sonuçları üreticiler, kullanıcılar ve düzenleyiciler tarafından dikkate alınarak düzenlemeler getirilmeli ve bunlara ciddiyle uyulması sağlanmalıdır.

Teşekkür: Bu tez çalışması, MEÜ. Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 2018-1-TP3-2812 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynakça

Abdalkreem, T. M. (2018). "Optical Properties of Gold and Silver Nanoparticles" Doctoral dissertation, Sudan University of Science and Technology.

Abdel-Khalek, A.A., Kadry, M.A.M., Badran, S.R., Marie, M.A.S. (2015a). "Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress." *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 72, pp. 43–57.

Abdel-Khalek, A.A., Kadry, M., Hamed, A., Marie, M.A. (2015b). "Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*." *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 72, pp. 113–125.

Abdel-Khalek, A.A., Morsy, K. and Shati, A. (2020). "Comparative Assessment of Genotoxic Impacts Induced by Zinc Bulk- and Nano-Particles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." *Bull Environ Contam Toxicol* 104, pp. 366–372.

Adams, L.K., Lyon, D.Y., Alvarez, P.J.J. (2006). "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions." *Water Res*, 40, pp. 3527–3532.

Adedeji, O.B., Adedeji, A.O., Adeyemo, O.K., Agbede, S.A. (2008) "Acute toxicity of diazinon to the African catfish (*Clarias gariepinus*)." *Afr J Biotechnol*, 7, pp. 651–654.

Aebi, H.E. (1980). "Enzymes 1: oxidoreductases, transferases." In: Bergmeyer H, Ed. *Methods of enzymatic analysis*, vol. III. pp. 273–82. Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie.

Afolalu, S. A., Soetan, S. B., Ongbali, S. O., Abioye, A. A., & Oni, A. S. (2019). "Morphological characterization and physio-chemical properties of nanoparticle-review." In IOP Conference

Series: Materials Science and Engineering, IOP Publishing, 640(1), p. 012065.

Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J. (2010). "Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242, pp. 263- 269.

Airaksinen, S., Rabergh, C.M.I., Lahti, A., Kaatrasalo, A., Sistonen, L., Nikinmaa, M. (2003). "Stressor dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*." *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, pp. 839-846.

Akahori, A., Gabryelak, T., Józwiak, Z., and Gondko, R. (1999). "Zinc-induced damage to carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocytes in vitro." *IUBMB Life*, 47(1), pp. 89-98.

Al-Ghais, S. M., and Ali, B. (1999). "Inhibition of glutathione S-transferase catalyzed xenobiotic detoxication by organotin compounds in tropical marine fish tissues." *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 62(2), pp. 207-213.

Alkaladi, A., Mosleh, Y.Y., Afifi, M. (2013). "Biochemical and histological biomarkers of Zn pollution in Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*)." *Arch. Des Sci.*, 66, pp. 295–311.

Alkaladi, A., Afifi, M., Ali, H., and Saddick, S. (2020). "Hormonal and molecular alterations induced by sub-lethal toxicity of zinc oxide nanoparticles on *Oreochromis niloticus*." *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), pp.1296-1301.

Alwan, R. M., Kadhim, Q. A., Sahan, K. M., Ali, R. A., Mahdi, R. J., Kassim, N. A., Jassim, A. N. (2015). "Synthesis of zinc oxide nanoparticles via sol–gel route and their characterization." *Nanoscience and Nanotechnology*, 5(1), pp. 1-6.

Ambika, S., and Sundrarajan, M. (2015). "Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Vitex negundo* L. extract: Spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, pp. 143-148.

Anju, A., Jeswin, J., Thomas, P. C., Paulton, M. P., Vijayan, K. K. (2013). "Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxid dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*." *Fish and shellfish immunology*, 34(3), pp. 946-950.

Arts, M. J. S., Schill, R. O., Knigge, T., Eckwert, H., Kammenga, J. E., and KÖhler, H. R. (2004). "Stress proteins (hsp70, hsp60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK." *Ecotoxicology*, 13, pp. 739-755.

Aruoja, V., Dubourguier, H., Kasemets, K., Kahru, A. (2009). "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*." *Sci Total Environ*, 407, pp. 1461–1468.

Arvizo, R. R., Rana, S., Miranda, O. R., Bhattacharya, R., Rotello, V. M., Mukherjee, P. (2011). "Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: role of nanoparticle size and surface charge". *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 7(5), pp. 580-587.

Asada, K., Takahashi, M. (1987). "Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis." In D. J. Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition* (pp. 228–287). Amsterdam: Elsevier.

Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klüttgen, B., Christensen, F. M. (2011). "Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the

environment and human health—lessons learned from four case studies.” *Environment international*, 37(6), pp. 1143-1156.

Ashraf, M.A., Peng, W., Zare, Y., Rhee, K.Y. (2018). “Effects of size and aggregation/agglomeration of nanoparticles on the interfacial/interphase properties and tensile strength of polymer nanocomposites.” *Nanoscale Res Lett.*, 13(1), pp. 1–7.

Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R., Bottero, J.Y. (2009). “Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro.” *Environ. Pollut.*, 157, pp. 1127–1133.

Aziz, S., Abdullah, S., Abbas, K., and Zia, M. A. (2020). “Effects of Engineered Zinc Oxide Nanoparticles on Freshwater Fish, *Labeo rohita*: Characterization of ZnO Nanoparticles, Acute Toxicity and Oxidative Stress.” *Pakistan Veterinary Journal*, 40(4), pp. 479-483.

Bafana, A., Dutt, S., Kumar, S., and Ahuja, P. S. (2011). Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Critical reviews in biotechnology*, 31(1), pp. 65-76.

Barhoum, A., García-Betancourt, M. L., Jeevanandam, J., Hussien, E. A., Mekkawy, S. A., Mostafa, M., ... and Bechelany, M. (2022). “Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations.” *Nanomaterials*, 12(2), p. 177.

Barhoumi, S., Messaoudi, I., Gagné, F., and Kerkeni, A. (2012). “Spatial and seasonal variability of some biomarkers in *Salaria basilisca* (Pisces: Blennidae): Implication for biomonitoring in Tunisian coasts.” *Ecological Indicators*, 14(1), pp. 222-228.

Basha, P. S., and Rani, A. U. (2003). “Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis*

mossambicus (Tilapia).” *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(2), pp. 218-221.

Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., Iwama, G.K. (2002) “Heat shock protein genes and their functional significance in fish.” *Gene*, 295, pp. 173-183.

Bawuro, A. A., Voegborlo, R. B., Adimado, A. A. (2018). “Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in Lake Geriyo, Adamawa State, Nigeria.” *Journal of Environmental and Public Health*, 2018.

Beckman R.B., Mizzen L.A., Welch W.J. (1990) “Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins. Implications for protein folding and assembly.” *Science*, 240, p. 850.

Belver, C., Bedia, J., Gómez-Avilés, A., Peñas-Garzón, M., and Rodriguez, J. J. (2019). “Semiconductor photocatalysis for water purification. In *Nanoscale materials in water purification*” Elsevier, pp. 581-651.

Bener, L., Yaşar, R., Kuran, M. (2018). “Isı şok proteinleri ve in vitro embriyo.” *Black Sea Journal of Agriculture*, 1(3), pp. 89-93.

Ben-Zvi, A. P., Goloubinoff, P. (2001). “Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones.” *Journal of structural biology*, 135(2), pp. 84-93.

Bettini, S., Pagano, R., Valli, L., Giancane, G. (2016). “Enhancement of Open Circuit Voltage of a ZnO-Based Dye-Sensitized Solar Cell by Means of Piezotronic Effect.” *Chemistry–An Asian Journal*, 11(8), pp. 1240-1245.

Bhattacharyya, P., Agarwal, B., Goswami, M., Maiti, D., Baruah, S., Tribedi, P. (2018). “Zinc oxide nanoparticle inhibits the

biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*.” Antonie Van Leeuwenhoek, 111, pp. 89-99.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). “Oxidative stress and antioxidant defense.” World allergy organization journal, 5, pp. 9-19.

Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G. (2017). “A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review.” Fish and Fisheries, 18(5), pp. 928-942.

Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J. F., Eullaffroy, P. (2008). “Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms.” Environmental Toxicology: An International Journal, 23(5), 591-598.

Bonifazi, G., La Marca, F., and Massacci, P. (2002). “Characterization of bulk particles in real time.” Particle and Particle Systems Characterization: Measurement and Description of Particle Properties and Behavior in Powders and Other Disperse Systems, 19(4), pp. 240-246.

Borm, P. J., and Müller-Schulte, D. (2006). “Nanoparticles in drug delivery and environmental exposure: same size, same risks?”. Nanomedicine, 1(2), pp. 235-249.

Bour, A., Mouchet, F., Silvestre, J., Gauthier, L., Pinelli, E. (2014). “Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review.” Journal of Hazardous Materials, 1–44.

Bozcaarmutlu, A., Arinç, E. (2004). “Inhibitory effects of divalent metal ions on liver microsomal 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity of leaping mullet.” Marine Environmental Research, 58(2-5), pp. 521-524.

Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple." *Free Radical Biology and Medicine*, 38, pp. 12–23

Bukhari, A. S., Mohamed, H. S., Broos, K. V., Stalin, A., Singhal, R. K., and Venubabu, P. (2012). "Histological variations in liver of freshwater fish *Oreochromis mossambicus* exposed to 60Co gamma irradiation." *Journal of environmental radioactivity*, 113, pp. 57-62.

Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2011). "Oxidative stress." *Best practice and research Clinical obstetrics and gynaecology*, 25(3), pp. 287-299.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), pp. 169-193.

Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K. (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity." *Biointerphases*, 2(4), pp. MR17–MR71.

Cabreiro, F., Picot, C. R., Perichon, M., Friguet, B., and Petropoulos, I. (2009). "Overexpression of methionine sulfoxide reductases A and B2 protects MOLT-4 cells against zinc-induced oxidative stress." *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(2), pp. 215-226.

Cadenas, E. (1989). "Biochemistry of oxygen toxicity." *Annual Reviews in Biochemistry*, 58, pp. 79–110.

Casals, E., Gonzalez, E., and Puentes, V. F. (2012). "Reactivity of inorganic nanoparticles in biological environments: insights into nanotoxicity mechanisms." *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(44), p. 443001.

Chae, Y.J., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu, M.B. (2009). "Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*).” *Aquat Toxicol.*, 94(4), pp. 320-327.

Chang, Y., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5, pp. 2850–2871.

Chatzidimitriou, E.; Bisaccia, P.; Corrà, F.; Bonato, M.; Irato, P.; Manuto, L.; Toppo, S.; Bakiu, R.; Santovito, G. (2020) "Copper/Zinc superoxide dismutase from the crocodile icefish *Chionodraco hamatus*: Antioxidant defense at constant sub-zero temperature.” *Antioxidants*, 9, p. 325.

Chausali, N., Saxena, J., and Prasad, R. (2023). "Nanotechnology as a sustainable approach for combating the environmental effects of climate change.” *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, p. 100541.

Chen, Q., Wang, Z., Xiong, Y., Xue, W., Kao, X., Gao, Y., ... and Song, D. (2009). "Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis.” *The Journal of toxicological sciences*, 34(4), pp. 399-405.

Chen, J., Dong, X., Xin, Y., and 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), pp. 493-499.

Chen, P.J., Tan, S.W., Wu, W.L. (2012). "Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish.” *Environ. Sci. Technol.*, 46, 8431–8439.

Chen, T.H., Lin, C.C., Meng, P.J. (2014). “Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*).” *J. Hazard Mat.*, 277, pp. 134–140.

Chiang H.L., Terlecky S.R., Plant C.P. (1989) “A role for HSP70 in lysosomal degradation of intracellular proteins.” *Science*, 246, pp. 382–385.

Choi, J.E., Kim, S., Ahn, J.H., Youn, P., Kang, J.S., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y. (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 100, 151–159.

Chung, S. W., Yu, J. Y., and Heath, J. R. (2000). “Silicon nanowire devices.” *Applied Physics Letters*, 76(15), pp. 2068-2070.

Clearwater, S. J., Farag, A. M., and Meyer, J. S. (2002). “Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 132(3), pp. 269-313.

Colvin, V. Point of Impact: Where Technology Collides With Society,Business, and Personal Lives;Technol. Rev.2003,106,71-73.

Commission Regulation (EU). (2011). “Amending Annex II to Regulation (EC) No.1333/2008 of the European Parliament and of the Council by Establishing a Union List of Food Additives.”, European Commission.

Cozzari, M., Elia, A.C., Pacini, N., Smith, B.D., Boyle, D., Rainbow, P.S., Khan, F.R. (2015). “Bioaccumulation and oxidative stress responses measured in the estuarine ragworm (*Nereis diversicolor*) exposed to dissolved, nano- and bulk-sized silver.” *Environ. Pollut.*, 198, pp. 32–40.

Culotta, V. C., Yang, M., and O'Halloran, T. V. (2006). “Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the

pedal.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763(7), pp. 747-758.

Danovaro, R., Bongiorni, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L., Pusceddu, A. (2008). “Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections.” *Environ. Health Perspect.*, 116, pp. 441–447.

De Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., ... and Kola, I. (1998). “Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide.” *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), pp. 22528-22536.

De, M., Ghosh, P. S., and Rotello, V. M. (2008). “Applications of nanoparticles in biology.” *Advanced Materials*, 20(22), pp. 4225-4241.

Deepak, K., Lodhi, H. S., Tiwari, K. J., Sanjive, S., and Sharma, U. D. (2009). “Cadmium toxicity to freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch).” *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23(1), pp. 149-156.

Desideri, A., Falconi, M. (2003). “Prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutases.” *Biochemical Society Transactions*, 31(6), pp. 1322-1325.

Di Giulio, R.T., Meyer, J.N. (2008). “Reactive oxygen species and oxidative stress.” In: Di Giulio RT, Hinton DE, editors., *The Toxicology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group. pp. 273–324.

Dineley, K. E., Richards, L. L., Votyakova, T. V., and Reynolds, I. J. (2005). “Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria.” *Mitochondrion*, 5(1), pp. 55-65.

Dorval, J., and Hontela, A. (2003). "Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 192, pp. 191–200.

Egaas, E., Skaare, J. U., Svendsen, N. O., Sandvik, M., Falls, J. G., Dauterman, W. C., ... and Netland, J. (1993). "A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the invitro phase II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and one plant species.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(1), pp. 141-149.

Elsayed, N. M., Gorbunov, N. V. (2003). "Interplay between high energy impulse noise (blast) and antioxidants in the lung.” *Toxicology*, 189(1-2), pp. 63-74.

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jürgens, G. (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.” *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), pp. 341-390.

Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G. (2011). "Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species.” *Aquat. Toxicol.*, 103, pp. 112–120.

Fader, S.C., Yu, Z., Spotila, J.R. (1999) "Seasonal variation in Hsps (Hsp70) in stream fish under natural conditions.” *Journal of Thermal Biology*, 19, pp. 335-341.

Fan, W., Li, Q., Yang, X., Zhang, L. (2013). "Zn subcellular distribution in liver of goldfish (*Carassius auratus*) with exposure to zinc oxide nanoparticles and mechanism of hepatic detoxification.” *PloS one*, 8(11), pp. e78123.

Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition." *Nutrition*, 18(10), pp. 872-879.

Farré, M., Gajda-Schrantz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). "Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment." *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393, pp. 81-95.

Feder, M.E., Hofmann, G.E. (1999) "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annual Reviews of Physiology*, 61, pp. 243–282.

Federici, G., Shaw, B., Handy, R. (2007). "Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects." *Aquat Toxicol*, 84, pp. 415–30.

Fındık, F. (2021). "Nanomaterials and their applications." *Periodicals of Engineering and Natural Sciences*, 9(3), pp. 62-75.

Finney DJ. (1971). "Probit Analysis 3rd ed. Cambridge University Press, London, UK.

Formigari, A., Irato, P., and Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(4), 443-459.

Fridovich, I. (1978). "The Biology of Oxygen Radicals: The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense." *Science*, 201(4359), pp. 875-880.

Fubini, B., Ghiazza, M., Fenoglio, I. (2014). "Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity." *Nanotoxicology*, 4(4), pp. 347–63.

Gadagbui, B. K. M., and Goksøyr, A. (1996). "Biomarker Studies in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Caged in, and in Mudfish (*Clarias anguillaris*) Exposed to Sediment from a Polluted River in Ghana, West Africa." *Marine Environmental Research*, 1(42), p. 275.

Gade A, Ingle A, Whiteley C, Rai M. (2010). "Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications." *Biotechnol Lett.*, 32(5), pp. 593–600.

Gaffet, E. (2011). "Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development Nanomat'eriaux: une revue des d\efinitions, des applications, des effets sanitaires et des moyens\mettre en oeuvre pour un d\veloppement s\ecuris\le." *arXiv preprint arXiv:1106.2206*.

Gallagher, E. P., and Di Giulio, R. T. (1992). "A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)."

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 102(3), pp. 543-547.

Garner, L.V.T., Di Giulio, R.T. (2012). "Glutathione transferase pi class 2 (GSTp2) protects against the cardiac deformities caused by exposure to PAHs but not PCB-126 in zebrafish embryos." *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*, 155, pp. 573–579.

Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2002). "Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive

oxygen species production by lipoamide dehydrogenase.” *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 10064-10072.

Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., et al. (2005) “Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells.” *Cell Death Differ.*, 12, pp. 38–51.

Ghannam, H. (2022). “Protective role of vitamins (E+ C) on Cholesterol and Albumin in *Oreochromis niloticus* subjected to Zinc oxide Bulk and Nanoparticles.” *Aswan University Journal of Environmental Studies*, 3(3), pp.293-302.

Gómez-Anduro, G.A.; Barillas-Mury, C.V.; Peregrino-Uriarte, A.B.; Gupta, L.; Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J.; Yepiz-Plascencia, G. (2006). “The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression.” *Dev. Comp. Immunol.*, 30, pp. 893–900.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B. (2009). “Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO Ag, CNT, Fullerenes) for different regions.” *Environ. Sci. Technol.*, 43, pp. 9216–9222.

Grazioli, V., Schiavo, R., Casari, E., Marzatico, F., Baena, R. R., and Gaetani, P. (1998). “Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage.” *FEBS letters*, 431(2), pp. 149-153.

Gyrd-Hansen, M., Nylandsted, J., Jäättelä, M. (2004). “Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity.” *Cell Cycle*, 3(12), pp. 1484-1485.

Ha, E. M., Oh, C. T., Ryu, J. H., Bae, Y. S., Kang, S. W., Jang, I. H., ... and Lee, W. J. (2005). “An antioxidant system required for

host protection against gut infection in *Drosophila*.” *Developmental cell*, 8(1), pp. 125-132.

Hallare, A.V., Köhler, H.R. and Triebkorn, R. (2004) “Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO.” *Chemosphere*, 56, pp. 659-666.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2015). “Free radicals in biology and medicine,” 5th ed. Oxford: Clarendon Press.

Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C., Sorrell, C. C. (2012). “The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂.” *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 235-244.

Handy, R.D., Sims, D.W., Giles, A., Campbell, H.A., Musonda, M.M. (1999). “Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper.” *Aquat. Toxicol.*, 47, pp. 23–41.

Handy, R. D., Owen, R., and Valsami-Jones, E. (2008a). “The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs.” *Ecotoxicology*, 17, pp. 315-325.

Handy, R. D., Henry, T. B., Scown, T. M., Johnston, B. D., and Tyler, C. R. (2008b). “Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis.” *Ecotoxicology*, 17, pp. 396-409.

Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., et al. (2000) “Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients.” *Cell Stress Chaperones*, 5, pp. 438–442.

Hao, L., Chen, L. (2012). "Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles." *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 80, pp.103–110.

Hao, L., Chen, L., Hao, J., and Zhong, N. (2013). "Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): a comparative study with its bulk counterparts." *Ecotoxicology and environmental safety*, 91, pp. 52-60.

Harman, D. (1956). "Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry." *Journal of Gerontology*, 11, pp. 298–300.

Haroon, H. B., Hunter, A. C., Farhangrazi, Z. S., and Moghimi, S. M. (2022). A brief history of long circulating nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114396.

Harsij, M., Paknejad, H., Khalili, M., Jafarian, H., Nazari, S. (2021). "Histological study and evaluation of Hsp70 gene expression in gill and liver tissues of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to Zinc oxide nanoparticles." *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 20(3), pp. 741-760.

Hasan S. (2015). "A review on nanoparticles: their synthesis and types." *Res J Recent Sci.*, 2277, p. 2502.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005) "Glutathione transferases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 45, pp. 51– 88.

Hightower, L.E. (1991) "Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity." *Cell*, 66, pp. 191–197.

Hightower, L. E., Norris, C. E., Diiorio, P. J., and Fielding, E. (1999). "Heat shock responses of closely related species of tropical and desert fish." *American Zoologist*, 39(6), pp. 877-888.

Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O. (2020). "Oxidative

stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics.” *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 29(2), pp. 198-217.

Hu, Y.L., Qi, W., Han, F., Shao, J.Z. and Gao, J.Q. (2011). “Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model.” *International Journal of Nanomedicine*, 6, 3351-3359.

Huang, J. K., Wen, L., Ma, H., Huang, Z. X., Lin, C. T. (2005). “Biochemical characterization of a cambialistic superoxide dismutase isozyme from diatom *Thalassiosira weissflogii*: cloning, expression, and enzyme stability.” *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(16), pp. 6319-6325.

Huang, Y., Wu, C., Aronstam, R. (2010). “Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro Studies.” *Materials*, 3(10), pp. 4842–4859.

Ikhmayies, S.J. (2014). “Characterization of nanomaterials.” *JOM.*, 66(1), pp. 28–9.

Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., and Nakagawa, Y. (1998). “Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.” *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), pp. 1990-1997.

Islam, M. N., Rauf, A., Fahad, F. I., Emran, T. B., Mitra, S., Olatunde, A., ... and Mubarak, M. S. (2022). “Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(26), pp. 7282-7300.

Iwama G.K., Afonso L.O.B., Todgham A., Ackerman P.A., Nakano K. (2004). “Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?” *Journal of Experimental Biology*, 207, pp. 115–119.

Jaattela, M. (1999). "Escaping cell death: survival proteins in cancer." *Exp Cell Res*, 248, pp. 30-43.

Jakoby, W.B. (1978) "The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification enzymes." *AdvEnzymol*, 46, pp.383-414.

Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., Boveris, A. (1986). "The relation of free radical production to hyperoxia." *Annual Reviews in Physiology*, 48, pp. 703-719.

Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., Seifalian, A. M. (2007). "Biological applications of quantum dots." *Biomaterials*, 28(31), pp. 4717-4732.

Jeng, S. S., and Sun, L. T. (1981). "Effects of dietary zinc levels on zinc concentrations in tissues of common carp." *The Journal of Nutrition*, 111(1), pp. 134-140.

Jiang, J., Maes, E. G., Taylor, A. B., Wang, L., Hinck, A. P., Lafer, E. M., and Sousa, R. (2007). "Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70." *Molecular cell*, 28(3), pp. 422-433.

Jin, B. J., Bae, S., Lee, S. Y., Im, S. (2000). "Effects of native defects on optical and electrical properties of ZnO prepared by pulsed laser deposition." *Materials Science and Engineering: B*, 71(1-3), pp. 301-305.

Jin, T., Sun, D., Su, J. Y., Zhang, H. W., Sue, H. J. (2009). "Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli* O157: H7." *Journal of food science*, 74(1), pp. M46-M52.

Joo, S.H., Zhao, D. (2017). "Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review." *J Hazard Mater*. 322 (Pt A), pp. 29-47.

Joshi, S. G., Cooper, M., Yost, A., Paff, M., Ercan, U. K., Fridman, G., ... and Brooks, A. D. (2011). "Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*." Antimicrobial agents and chemotherapy, 55(3), pp. 1053-1062.

Jothiprakasam, V., Sambantham, M., Chinnathambi, S., Vijayaboopathi, S. (2017). "Candida tropicalis biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA." Archives of Oral Biology, 73, pp. 21-24.

Joudeh, N., Linke, D. (2022). "Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists." Journal of Nanobiotechnology, 20(1), p. 262.

Juhasz, K., Lipp, A. M., Nimmervoll, B., Sonnleitner, A., Hesse, J., Haselgruebler, T., Balogi, Z. (2013). "The complex function of hsp70 in metastatic cancer." Cancers, 6 (1), pp. 42-66.

Kanelakis, K. C., Morishima, Y., Dittmar, K. D., Galigniana, M. D., Takayama, S., Reed, J. C., and Pratt, W. B. (1999). "Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery." Journal of Biological Chemistry, 274(48), pp. 34134-34140.

Kaya, H., Aydın, F., Gürkan, M., Yılmaz, S., Ates, M., Demir, V., Arslan, Z. A. (2016). "Comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Organ pathologies, osmoregulatory responses and immunological parameters." Chemosphere, 144, pp. 571–582.

Kayhan, F. E., Duman, B. S. (2010). "Heat shock protein genes in fish." Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10(2), pp. 287-293.

Keller, J.M., Escara-Wilke, F., Keller, E.T. (2008). "Heat stress-induced heat shock protein 70 expression is dependent on ERK activation in zebrafish (*Danio rerio*) cells." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 150, pp. 307-314.

Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D. (1998). "Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems." *Environ Health Perspect*, 106(7), pp. 375-384.

Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. (2019). "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities." *Arabian journal of chemistry*, 12(7), pp. 908-931.

Kiang, J.G, and Tsokos, G.C. (1998) "Hsps 70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology." *Pharmacology and Therapeutics*, 80, pp. 183-201.

Kim, B., Richards, S. M., Gunn, J. S., Slauch, J. M. (2010). "Protecting against antimicrobial effectors in the phagosome allows SodCII to contribute to virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." *Journal of bacteriology*, 192(8), 2140-2149.

Kim, C. H., Kim, E. J., Nam, Y. K. (2021). "Superoxide dismutase multigene family from a primitive chondrosteian sturgeon, *Acipenser baerii*: Molecular characterization, evolution, and antioxidant defense during development and pathogen infection." *Antioxidants*, 10(2), p. 232.

Kindermann, B., Döring, F., Fuchs, D., Pfaffl, M. W., and Daniel, H. (2005). "Effects of increased cellular zinc levels on gene and protein expression in HT-29 cells." *Biometals*, 18, pp. 243-253.

Kinnear, P.R., Gray, C.D. (1995). "SPSS for Windows Made Simple." Lawrence Erlbaum Associates, East Sussex, UK, p. 275.

Kocaefe, Ç. (2007). “NANOTIP: Yaşam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları.” Hacettepe Tıp Derg, 38, pp. 33-38.

Kono, Y., Fridovich, I. (1982). “Superoxide radical inhibits catalase.” J Biol Chem., 257, pp. 5751– 5754.

Kovacık, A., Tvrdá, E., Miskeje, M., Arvay, J., Tomka, M., Zbynovska, K., ... and Massanyi, P. (2019). “Trace metals in the freshwater fish *Cyprinus carpio*: effect to serum biochemistry and oxidative status markers.” Biological trace element research, 188, pp. 494-507.

Krishnamurthy, P., and Wadhwani, A. (2012). “Antioxidant enzymes and human health.” Antioxidant enzyme, 1, pp. 3-18.

Kumar, N., Singh, D. K., Chandan, N. K., Thorat, S. T., Patole, P. B., Gite, A., and Reddy, K. S. (2023). “Nano zinc enhances gene regulation of non specific immunity and antioxidative status to mitigate multiple stresses in fish.” Scientific Reports, 13(1), 5015.

Lanno, R. P., Hicks, B., and Hilton, J. W. (1987). “Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper.” Aquatic toxicology, 10(5-6), pp. 251-263.

Lanone, S., Boczkowski, J. (2006). “Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms.” Curr. Mol. Med., 6, pp. 651–663.

Latif, A., Ali, M., Sayyed, A. H., Iqbal, F., Usman, K., Rauf, M., and Kaoser, R. (2013). “Effect of copper sulphate and lead nitrate, administered alone or in combination, on the histology of liver and kidney of *Labeo rohita*.” Pakistan Journal of Zoology, 45(4), pp. 913-920.

Lazarow, P.B. ve De Duve, C. (1973). "The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. V. Intracellular pathway of catalase synthesis." *J. Cell Biol.* 59, pp. 507–524.

Lee, K. W., Raisuddin, S., Rhee, J. S., Hwang, D. S., Yu, I. T., Lee, Y. M., ... and Lee, J. S. (2008). Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology*, 89(3), 158-166.

Lee, S.-W., Kim, S.-M., and Choi, J. (2009). "Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure." *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, pp. 86–91.

Lele, Z., Engel, S. and Krone, P.H. (1997) "Hsp47 and Hsp70 gene expression is differentially regulated in a stressand tissue specific manner in zebrafish embryos." *Developmental Genetics*, 21, pp. 123-133.

Lemire, J., Mailloux, R., and Appanna, V. D. (2008). "Zinc toxicity alters mitochondrial metabolism and leads to decreased ATP production in hepatocytes." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 28(2), pp. 175-182.

Li, S. D., and Huang, L. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), pp. 496-504.

Li, X., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, X., Starkey, S. R., Zhu, K. Y. (2009). "Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae)." *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(10), pp. 745-754.

Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M. E. (2009). "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective

responses to environmentally induced oxidative stress.” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), pp. 137-147.

Lindquist, S. (1986). “The heat-shock response.” *Annual review of biochemistry*, 55(1), pp. 1151-1191.

Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988) “The heat shock proteins.” *Annual Review of Genetics*, 22, pp. 631-677.

Lines, M. G. (2008). “Nanomaterials for practical functional uses.” *Journal of Alloys and Compounds*, 449 (1-2), pp. 242-245.

Liu, H., He, J., Chi, C., Gu, Y. (2015). “Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*.” *Fish Shellfish Immunol.*, 43, pp. 491–501.

Livak, K.J., Smittgen, T.D. (2001). “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method.” *Methods*, 25, pp. 402–408.

Livingstone, D.R. (2003). “Oxidative stress in aquatic organism in relation to pollution and agriculture.” *Revue de Medecine Veterinaire*, 154, pp. 427–430.

Locke M. (1997) “The cellular response to exercise: role of stress proteins.” *Exercise and Sports Science Reviews*, 25, pp. 105–136.

Lushchak, V.I. (2011). “Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.” *Aquatic Toxicology*, 1, pp. 13–30.

Maharramov, A. M., Hasanova, U. A., Suleymanova, I. A., Osmanova, G. E., and Hajiyeva, N. E. (2019). “The engineered nanoparticles in food chain: Potential toxicity and effects.” *SN Applied Sciences*, 1, pp. 1-25.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., and Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 70(1), 83-93.

Mao, L., Bryantsev, A.L., Chechenova, M.B. and Shelden, E.A. (2005) "Cloning, characterization, and heat stress induced redistribution of a protein homologous to human Hsp27 in the zebrafish *Danio rerio*." *Experimental Cell Research*, 306, pp. 230-241.

Margulis, B.A., Antropova, O.Y., Kharazova, A.D. (1989) "70kDa heat shock proteins from mollusk and human cells have common structural and functional domains." *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94, pp. 621-627.

Martins, D., English, A.M. (2014). "SOD1 oxidation and formation of soluble aggregates in yeast: Relevance to sporadic ALS development." *Redox. Biol.*, 2, pp. 632-639.

Masciangioli, T., Zhang, W. X. (2003). "Environmental Technologies at the Nanoscale." *Environ. Sci. Technol.*, 37, pp. 102a-108a.

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), pp. 577-586

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., and De Castro, I. N. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical biochemistry*, 32(8), pp. 595-603.

Mayer, M. P., Rüdiger, S., and Bukau, B. (2000). "Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates.", pp. 877-885.

Mayer, M. P., and Bukau, B. (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cellular and molecular life sciences*, 62, pp. 670-684.

McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). "An enzymic function for erythrocyte." *J Biol Chem*, 244 (22), pp. 6049-6055.

Meiler, K. A., Cleveland, B., Radler, L., and Kumar, V. (2021). Oxidative stress-related gene expression in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with organic and inorganic zinc. *Aquaculture*, 533, p. 736149.

Melegaria, S.P., Perreault, F., Costa, R.H., Popovic, R., Matiasa, W.G. (2013). "Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga; *Chlamydomonas reinhardtii*." *Aquat. Toxicol.*, 142–143, pp. 431–440.

Merchant, S., and Korbelik, M. (2011). "Heat shock protein 70 is acute phase reactant: response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy." *Cell stress and chaperones*, 16, pp. 153-162.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). "Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free radical Biology and medicine*," 17(3), pp. 235-248.

Mikhailova, O. N., Gulyaeva, L. F., and Filipenko, M. L. (2005). "Gene expression of drug metabolizing enzymes in adult and aged mouse liver: a modulation by immobilization stress." *Toxicology*, 210(2-3), pp. 189-196.

Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Gomez-Amores, L., Mate, A., Vazquez, C. M., and Camean, A. M. (2005). "Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally." *Toxicol*, 45(4), pp. 395-402.

Morimoto, R. I. (1998). "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators." *Genes and development*, 12(24), pp. 3788-3796.

Mosleh, S. Paris-Palacios, M. Couderchet, S. Biagianti-Risbourg, G. Vernet. (2005). "Metallothioneins induction, antioxidative response, glycogen and growth changed in *Tubifex tubifex* (*Oligochaete*) exposed to the fungicide, fenhexamid." *Environ. Pollut.*, 135, pp. 73–82.

Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., et al. (1995) "A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells." *Int J Cancer*, 61, pp. 272–279.

Multhoff, G., Hightower, L.E. (1996) "Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones.*, 1, pp. 167–176.

Murali, M., Suganthi, P., Athif, P., Bukhari, A. S., Mohamed, H. S., Basu, H., and Singhal, R. K. (2017). "Histological alterations in the hepatic tissues of *Al₂O₃* nanoparticles exposed freshwater fish *Oreochromis mossambicus*." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44, pp. 125-131.

Nair, S., Sasidharan, A., Rani, V.V.D., Menon, D., Nair, S., Manzoor, K., vd. (2009). "Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells." *J Mater Sci Mater Med*, 20, pp. 235–241.

Nakano, K., Iwama, G.K. (2002) “The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins *Oligocottus maculosus* and *Oligocottus synderi*: relationship of Hsp70 and thermal tolerance.” *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, pp. 79-94.

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., Das, N. (2019). “Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases.” *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.

National Nanotechnology Initiative (NNI). (2004) “NNI Strategic Plan.” <https://www.nano.gov/2004-Strategic-Plan>.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., ... and Sigg, L. (2008). “Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.” *Ecotoxicology*, 17, pp. 372-386.

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., ..., Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7), pp. 543-557.

Nishida, M., Kitajima, N., Saiki, S., Nakaya, M., and Kurose, H. (2011). “Regulation of angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF- κ B.” *Nitric Oxide*, 25(2), pp. 112-117.

Oberdörster, E. (2004). “Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass.” *Environmental health perspectives*, 112(10), pp. 1058-1062.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. (1992) “Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test Organization for Economic Cooperation and Development.” Paris, France.

Onyedineke, N.E., Odukoya, A.O., Ofoegbu, P.U. (2010) "Acute toxicity tests of cassava and rubber effluents on the Ostracoda *Strandesia prava* Klie, 1935 (Crustacea, Ostracoda)." *Res J Environ Sci*, 4, pp.166–172.

Osmond, M. J., Mccall, M. J. (2010). "Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard." *Nanotoxicology*, 4(1), pp. 15-41.

Ovelgonne, J.H., Souren, J.E.M., Wiegant, F.A.C., Van Wijk, R. (1995) "Relationship between cadmium induced expression of heat shock genes, inhibition of protein synthesis and cell death." *Toxicology*, 99, pp. 19-30.

Owsiak, A., Bartosz, G., Bilinski, T. (2010). "Oxidative stress during aging of the yeast in a stationary culture and its attenuation by antioxidants." *Cell biology international*, 34(7), pp. 731-736.

Pal, S.L., Jana, U., Manna, P.K., Mohanta, G.P., Manavalan, R. (2011). "Nanoparticle: An overview of preparation and characterization." *JAPS*, 1(6), pp. 228-234.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., and Raisuddin, S. (2003). "Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.)." *Science of the total environment*, 309(1-3), pp. 105-115.

Park, H., Ahn, I.Y., Lee, H.E. (2007) "Expression of Hsp70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*." *Cell Stres and Chaperons*, 12, pp. 275- 282.

Parlak, E. B. (2013). "Gümüş (ag0) ve Alüminyum (al0) Nanoparçacıklarının Aktif Çamurdaki Mikrobiyal Yapıya Olan Nanotoksikolojik Etkilerinin Belirlenmesi", Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü.

PEN (2013). "The Project on emerging nanotechnologies." <http://www.nanotechproject.org/>. Accessed 14 June 2013

Pérez-López, M., Anglade, P., Bec-Ferte, M. P., Debrauwer, L., Perdu, E., Cravedi, J. P., and Rouimi, P. (2000). "Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their induction by 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl." *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(1), pp. 21-32.

Pockley, A. G. (2001). "Heat shock proteins in health and disease: therapeutic agents." Erişim adresi: <http://www.wermm.cbcu.cam.ac.uk>, 21.

Pockley, A.G. (2003) "Heat shock proteins as regulators of the immune response." *Lancet*, 362, pp. 469–476.

Pockley, A.G., Henderson, B., Multhoff, G. (2014) "Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans.*, 42, pp. 1744–1751.

Prashanth, S. R., Sadhasivam, V., and Parida, A. (2008). "Over expression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance." *Transgenic research*, 17, pp. 281-291.

Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T., Riddell, G. E., and Dunn, A. M. (2004). "Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods." *Water Research*, 38(12), pp. 2847-2850.

Puerto, M., Prieto, A.I., Pichardo, S., Moreno, I., Jos, A., Moyano, R., Camean, A.M. (2009). "Effects of dietary N-acetylcysteine (NAC) on the oxidative stress induced in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing

cyanobacterial water bloom.” *Environ. Toxicol. Chem.*, 28, pp. 1679–1686.

Qiang, J.L. (2001). “The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles.” *Appl Surf Sci.*, 180, pp. 308–314.

Rabergh, C.M., Airaksinen, S., Soitomo, A., Bjorklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M. and Sistonen, L. (2000) “Tissue specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor1 mRNAs in response to heat stress.” *Journal of Experimental Biology*, 203, pp. 1817- 1824.

Ranson, H., Hemingway, J. (2010) “Glutathione transferases” I.G. Lawrence, S.G. Sarjeet (Eds.), *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*, vol. 8.” Academic Press, London, pp. 307-326.

Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. and Babujee, L. (2004) “AraPerox. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes.” *Plant Physiology*, 136(1), pp. 2587–2608.

Riol, M. M., Valinas, M. N., Fernandez, M. G., and Lopez, M. P. (2001). “Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 128(2), pp. 227-235.

Roberts, M., and Boyce, C. B. C. (1972). “Chapter IV Principles of Biological Assay.” In *Methods in microbiology*, Academic Press, 7, pp. 153-190.

Roco, M. C. (2003a). “Broader societal issues of nanotechnology.” *Journal of nanoparticle research*, 5, pp. 181-189.

Roco, M.C. (2003b). "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine." *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, pp. 337–346.

Roduner, E. (2006). "Size matters: why nanomaterials are different." *Chemical society reviews*, 35(7), pp. 583-592.

Rokutan, K. (2000). "Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection." *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15, pp.12-19.

Ruas, C. B. G., dos Santos Carvalho, C., de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., and Fernandes, M. N. (2008). "Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), pp. 86-93.

Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., Aschner, M. (2017). "Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review." *Toxicology reports*, 4, pp. 245-259.

Ryan, J.A., Hightower, L.E. (1994) "Evaluation of heavy metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay." *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, pp. 1231-1240.

Saddick, S., Afifi, M., Abu Zinada, O.A. (2017). "Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*." *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), pp. 1672-1678.

Salahuddin, N.A., El-Kemary, M.A., Ibrahim, E.M. (2015). "Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles via Precipitation Method: Effect of Annealing Temperature on Particle Size." *Nanoscience and Nanotechnology*, 5, pp. 82-88.

Sanders, B.M. (1993) “Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective.” *Critical Reviews in Toxicology*, 23, pp. 49-75.

Santacruz, H., Vríz, S., Angelier, N. (1997) “Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, Hsc70 and developmental expression of the corresponding transcripts.” *Developmental Genetics*, 21, pp. 223-233.

Santos, C. S., Gabriel, B., Blanchy, M., Menes, O., García, D., Blanco, M., ... and Neto, V. (2015). “Industrial applications of nanoparticles—a prospective overview.” *Materials Today: Proceedings*, 2(1), pp. 456-465.

Sato, K. (1989). “Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia.” *Adv Cancer Res*, 52, pp. 205–255.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). (2012). “Opinion on zinc oxide (nano form)”, COLIPA NS 76., SCCS, European Union.

Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A., Syed, A.F. (2010). “Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment.” *Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2, pp. 544–568.

Sensi, S. L., Yin, H. Z., and Weiss, J. H. (1999). “Glutamate triggers preferential Zn^{2+} flux through Ca^{2+} permeable AMPA channels and consequent ROS production.” *Neuroreport*, 10(8), pp. 1723-1727.

Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., and Svobodova, Z. (2011). “Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review.” *Veterinární medicína*, 56(11), 537-546.)

Shahzad, K., Khan, M. N., Jabeen, F., Kosour, N., Chaudhry, A. S., Sohail, M., and Ahmad, N. (2019). “Toxicity of zinc oxide

nanoparticles (ZnO-NPs) in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): tissue accumulation, oxidative stress, histopathology and genotoxicity.” International journal of environmental science and technology, 16, pp. 1973-1984.

Sharifzadeh, M. (2006). “Nanotechnology sector report.” Cronus Capital Markets, 1st Quarter, p.5.

Sharma, A. K., Singh, V., Gera, R., Purohit, M. P., and Ghosh, D. (2017). “Zinc oxide nanoparticle induces microglial death by NADPH-oxidase-independent reactive oxygen species as well as energy depletion.” Molecular Neurobiology, 54, pp. 6273-6286.

Sharma, V. K., Sayes, C. M., Guo, B., Pillai, S., Parsons, J. G., Wang, C., ... and Ma, X. (2019). “Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review.” Science of the Total Environment, 653, pp. 1042-1051.

Sheng, Y., Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Maroney, M. J., Miller, A. F., Teixeira, M., and Valentine, J. S. (2014). “Superoxide dismutases and superoxide reductases.” Chemical reviews, 114(7), pp. 3854-3918.

Shiau, S. Y., and Jiang, L. C. (2006). “Dietary zinc requirements of grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on immune responses.” Aquaculture, 254(1-4), pp. 476-482.

Si, L. F., Wang, C. C., Guo, S. N., Zheng, J. L., and Xia, H. (2019). “The lagged effects of environmentally relevant zinc on non-specific immunity in zebrafish.” Chemosphere, 214, pp. 85-93.

Sies, H. (2015). “Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.” Redox biology, 4, pp. 180-183.

Singh, B. O., and Manjeet, K. (2015). “Determination of LC50 of Lead Nitrate for a fish, *Labeo rohita* (Hamilton-

Buchanan).” International Research Journal of Biological Sciences, 4(8), pp. 23-26.

Slaninova A, Smutna M, Modra H, Svobodova Z (2009). “A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides.” Neuroendocrinology Letters 30, pp. 2–12.

Smith, T.R., Tremblay, G.C. and Bradley, T.M. (1999). “Characterization of the Hsp response of Atlantic salmon (*Salmo salar*).” Fish Physiology and Biochemistry, 20, pp. 279-292.

Sóti, C., Pal, C., Papp, B., Csermely, P. (2005). “Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks.” Current opinion in cell biology, 17(2), pp. 210-215.

Stolze K, Nohl H (1994). “Effect of xenobiotics on the respiratory activity of rat heart mitochondria and the concomitant formation of superoxide radicals.” Environ Toxicol Chem., 13, pp. 499–502.

Sun, S., Zhu, J., Jiang, X., Li, B., Ge, X. (2014). “Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis of a manganese superoxide dismutase in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*.” Fish and shellfish immunology, 38(2), pp. 340-347.

Suttiaponarnit K, Jiang J, Sahu M, Suvachittanont S, Charinpanitkul T, Biswas P. (2011). “Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties.” Nanoscale Res Lett., 6(1), pp. 1–8.

Takemura, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Karube, I. (2002).” Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorrhiza*.” Trees, 16, pp. 94-99.

Tappel, A. L. (1978). "Glutathione peroxidase and hydroperoxides." In *Methods in enzymology*, Academic Press, Vol. 52, pp. 506-513.

Taylor, S. D., Davenport, L. D., Speranza, M. J., Mullenbach, G. T., Lynch, R. E. (1993). "Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat." *Archives of biochemistry and biophysics*, 305 (2), pp. 600-605.

Temiz, Ö., and Kargın, F. (2022). "Toxicological impacts on antioxidant responses, stress protein, and genotoxicity parameters of aluminum oxide nanoparticles in the liver of *Oreochromis niloticus*." *Biological Trace Element Research*, 200(3), pp. 1339-1346.

Tew, K.D. (1994) "Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance." *Cancer Res*, 54, pp. 4313–4320.

Torgal, P.F., Jalali, S. (2011). "Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building materials." *Construction and building materials*, 25(2), pp. 582-590.

Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J. J., Milani, M. R., Bainy, A. C. D., and Dafre, A. L. (2014). "Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 159, pp. 22-30.

Triebskorn, R., Köhler, H. R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S. M., and Müller, E. F. (1997). "Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field?" *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, pp. 57-73.

Ul-Haq, B., Ahmed, R., Goumri-Said, S., Shaari, A., and Afaq, A. (2013). "Electronic structure engineering of ZnO with the

modified Becke–Johnson exchange versus the classical correlation potential approaches.” *Phase Transitions*, 86(12), pp. 1167-1177.

Uysal, K., Emre, Y., Köse, E. (2008). “The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (Icp-Oes) in beymelek Lagoon (Antalya/Turkey).” *Microchem. J.*, 90, pp. 67–70.

Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. (2006). “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.” *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp. 1-40.

Vallee, B. L., and Falchuk, K. H. (1993). “The biochemical basis of zinc physiology.” *Physiological reviews*, 73(1), pp. 79-118.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003) “Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, pp. 57-149.

Vannuccini, M.L., Grassi, G., Leaver, M.J., Corsi, I. (2015). “Combination effects of nano-TiO₂ and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on biotransformation gene expression in the liver of European sea bass *Dicentrarchus labrax*.” *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 176-177, pp. 71-78.

Veal, E. A., Day, A. M., Morgan, B. A. (2007) “Hydrogen peroxide sensing and signaling.” *Molecular cell*, 26(1), pp. 1-14.

Vernet, P., Rock, E., Mazur, A., Rayssiguier, Y., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1999). “Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency.” *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 54(4), pp. 362-370.

Vidya, P. V., and Chitra, K. C. (2018). "Aluminium oxide nanoparticles induced irrevocable damages in gill, liver and brain tissues of the freshwater Fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852)." *Int. J. Fish. Aquat. Res.*, 3, pp. 13-17.

Wahab, R., Kim, Y. S., Hwang, I. H., and Shin, H. S. (2009) "A non-aqueous synthesis, characterization of zinc oxide nanoparticles and their interaction with DNA." *Synthetic metals*, 159 (23-24), pp. 2443-2452.

Wang, L., Zhao, W., and Tan, W. (2008). "Bioconjugated silica nanoparticles: development and applications." *Nano Research*, 1, pp. 99-115.

Wang, Y., Osatomi, K., Nagatomo, Y., Yoshida, A., and Hara, K. (2011). "Purification, molecular cloning, and some properties of a manganese-containing superoxide dismutase from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(4), pp. 289-296.

Wang, F., Wu, Q., Zhang, Z., Chen, S., and Zhou, R. (2013). "Cloning, expression, and characterization of iron superoxide dismutase in *Sonneratia alba*, a highly salt tolerant mangrove tree." *The Protein Journal*, 32, pp.259-265.

Wang W., Xia M.X., Chen J., Yuan R., Deng F.N., Shen F.F. (2016). "Gene Expression Characteristics and Regulation Mechanisms of Superoxide Dismutase and Its Physiological Roles in Plants under Stress." *Biochemistry*, 81, pp. 465–480.

Wang, X., Song, Q., Wang, Z., Xie, Y., Zhang, D., Ye, K., Han, F. (2019). "Characterizations of intracellular copper/zinc superoxide dismutase from yellow drum (*Nibea albiflora*, Richardson 1846) and its gene expressions under the ammonia/nitrite stress." *Aquatic Toxicology*, 214, p. 105254.

Wang, J., Xiao, J., Zhang, J., Chen, H., Li, D., Li, L., ... and Luo, Y. (2020). "Effects of dietary Cu and Zn on the accumulation, oxidative stress and the expressions of immune-related genes in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).” *Fish and Shellfish Immunology*, 100, pp. 198-207.

Watanabe, T., V. Kiron, S. Satoh. 1997. "Trace minerals in fish nutrition.” *Aquaculture* 151, pp. 185–207.

Wedler, F.C. (1987) "Determinants of molecular heat stability. In: *Thermotolerance, Vol II Mechanisms of Heat Resistance*" (ed. By K.J. Henle), pp. 132–148. CRC Press, Baton Rouge, USA.

Welch, W.J. (1993) "How cells respond to stress.” *Scientific American*, 268, pp. 56–64.

Wigginton, N.S., Haus, K.L., Hochella Jr., M.F. (2007). "In: *Aquatic environmental nanoparticles*.” *J. Environ. Monit*, 9, pp. 1306–1316.

Will, J., Hruschka, M. K., Gubler, L., Gauckler, L. J. (2001). "Electrophoretic deposition of zirconia on porous anodic substrates.” *Journal of the American Ceramic Society*, 84(2), pp. 328-332.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T. (1991) "Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.” *Aquat Toxicol.*, 19, pp. 137–161.

Winterbourn, C. C. (2008). "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.” *Nature chemical biology*, 4(5), pp. 278-286.

Wong, S.W.Y., Leung, P.T.Y., Djurisic, A.B., Leung, K.M.Y. (2010). "Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility.” *Anal Bioanal Chem*, 396, pp. 609–618.

Wu, C., Zhang, W., Mai, K., Xu, W., and Zhong, X. (2011). “Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai*.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 154(1), pp. 1-6.

Wu, P., Liu, Y., Jiang, W. D., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, Y. A., ... and Feng, L. (2017). “A comparative study on antioxidant system in fish hepatopancreas and intestine affected by choline deficiency: Different change patterns of varied antioxidant enzyme genes and Nrf2 signaling factors.” *PLoS One*, 12(1), p. e0169888.

Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., Zhu, W. (2011). “Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage.” *Science of the Total Environment*, 409, pp. 1444–1452.

Xu, R., Wu, C., Xu, H. (2007) “Particle size and zeta potential of carbon black in liquid media.” *Carbon*, 45(14), pp. 2806-2809.

Yadav, A., Neraliya, S., Gopesh, A. (2007) “Acute toxicity levels and ethological responses of *Channa striatus* to fertilizer industrial wastewater.” *J Environ Biol*, 28, pp. 159–162.

Yalçınkaya, M. (2013). “Fluvalinate'In *Lebistes Balıkları* (*Poecilia Reticulata*) Üzerine Akut Etkisinin Belirlenmesi.”, Yüksek lisans tezi.

Yılmaz, M. B., Wolfe, A., Cheng, Y. H., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J. L., Bulun, S. E. (2009). “Aromatase promoter If is regulated by estrogen receptor alpha (ESR1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines.” *Biology of reproduction*, 81(5), pp. 956-965.

Yılmaz, S. S., Guzel, E., Karatas, O. F., Yılmaz, M., Creighton, C. J., and Ozen, M. (2015). “Mi R-221 as a pre-and

postoperative plasma biomarker for larynx cancer patients.” The laryngoscope, 125(12), pp. E377-E381.

Yu, L.P., Fang, T., Xiong, D.W., Zhu, W.T., Sima, X.F. (2011). “Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation, (OH)-O-center dot production and particle dissolution in distilled water.” Journal of Environmental Monitoring, 13, pp. 1975–1982.

Yula, E., Deveci, Ö. (2010). “Nanotıp, mikrodizilimler ve klinik mikrobiyolojide kullanımları.” Dicle Tıp Derg, 37 (4), pp. 422-428.

Yuvaraja, G., Prasad, C., Vijaya, Y., Subbaiah, M. V. (2018). “Application of ZnO nanorods as an adsorbent material for the removal of As (III) from aqueous solution: kinetics, isotherms and thermodynamic studies.” International Journal of Industrial Chemistry, 9, pp. 17-25.

Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2008). “Evolution of catalases from bacteria to humans.” Antioxidants and redox signaling, 10(9), pp. 1527-1548.

Zemanovic, S., Ivanov, M. V., Ivanova, L. V., Bhatnagar, A., Michalkiewicz, T., Teng, R. J., ... and Afolayan, A. J. (2018). “Dynamic phosphorylation of the C terminus of Hsp70 regulates the mitochondrial import of SOD2 and redox balance.” Cell reports, 25(9), pp. 2605-2616.

“Zinc Oxide Market Global Forecast to 2024” Markets and Markets, <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/zinc-oxide-market-16672256.html> (22.01.2024).

Zhang, Z., Berg, A., Levanon, H., Fessenden, W., Meisel, D. (2003). “On the interactions of free radicals with gold nanoparticles.” Journal of the American Chemical Society, 125(26), pp. 7959–7963.

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., York, D. (2007). “Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids).” *J Nanopart Res.*, 9, pp. 479–489.

Zhang, Z. W., Li, Z., Liang, H. W., Li, L., Luo, X. Z., and Zou, G. W. (2011). “Molecular cloning and differential expression patterns of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in *Hypophthalmichthys molitrix*.” *Fish and Shellfish Immunology*, 30(2), pp. 473-479.

Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H., Lva, L. (2013). “Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish.” *Aquatic Toxicology*, 136–137, pp. 49–59.

Zhang, H., Gong, W., Wu, S., and Perrett, S. (2022). “Hsp70 in redox homeostasis.” *Cells*, 11(5), p. 829.

Zheng, J. L., Luo, Z., Chen, Q. L., Liu, X., Liu, C. X., Zhao, Y. H., and Gong, Y. (2011). “Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation, enzymatic activities and histology of *Synechogobius hasta*.” *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), pp. 1864-1873.

Zheng, M., Lu, J., and Zhao, D. (2018). “Effects of starch-coating of magnetite nanoparticles on cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in adult zebrafish.” *Science of the total environment*, 622, pp. 930-941.

Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y. (2008). “Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage.” *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 43(3), pp. 278-284.

Zhu, X.S., Wang, J.X., Zhang, X.Z., Chang, Y., Chen, Y.S. (2009). “The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the

embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*).” *Nanotechnology*, 19, p. 195103.

Zito, P., Shipley, H. J. (2015). “Inorganic nano-adsorbents for the removal of heavy metals and arsenic: a review.” *Rsc Advances*, 5(38), pp. 29885-29907.

Zhu, J., Ozdemir, S. K., Xiao, Y. F., Li, L., He, L., Chen, D. R., and Yang, L. (2010). “On-chip single nanoparticle detection and sizing by mode splitting in an ultrahigh-Q microresonator.” *Nature photonics*, 4(1), 46-49.

