



## Çinko ve Çinko Oksit Nanoparçacıklarına Maruz Bırakılan *Gammarus pulex*'te Metallothionein'in Etkisi

Işıl Canan ÇİÇEK ÇİMEN<sup>1</sup>, Osman SERDAR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Su Ürünleri Fakültesi, Munzur Üniversitesi, Tunceli, Türkiye

<sup>2</sup> Su Ürünleri Fakültesi, Munzur Üniversitesi, Tunceli, Türkiye

E-Posta: [ısilcanancicek@gmail.com](mailto:ısilcanancicek@gmail.com), [oserdar@munzur.edu.tr](mailto:oserdar@munzur.edu.tr)

**Gönderim 09.11.2022; Kabul 11.04.2023**

**Özet:** Nanopartikül (NP) ürünlerinin endüstride kullanımının artmasıyla birlikte ekosistem ve tüm organizmalar doğrudan ve dolaylı olarak NP'lerin etkisiyle risk altında olmaktadır. Bu çalışmada, tatlısulara yaşayan *Gammarus pulex*'in çinko (Zn) ve çinko oksit (ZnO) NP'lere maruz bırakılmasıyla metallothionein (MT) biyobelirteç yanıtları incelenmiştir. Denemede, kontrol grubu dahil toplam dört deneysel uygulama grubu (Kontrol, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L) oluşturulmuş ve üç tekrür ile çalışılmıştır. Zn-NP'ye maruz bırakılan, 24 ve 96 saatlerde ki örneklerin MT seviyelerinde kontrole kıyasla artışa ( $p<0,05$ ) neden olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, ZnO-NP uygulama örneklerinin MT seviyelerinde de 96 saat örneklerinde kontrole kıyasla artışlara neden olduğu ( $p<0,05$ ) belirlenmiş, ancak 24 saat uygulama örneklerinde MT seviyelerinde istatistiksel açıdan fark bulunamamıştır ( $p<0,05$ ). Çalışmada yapılan analizler sonucunda, Zn ve ZnO NP'lerin organizmada MT seviyelerinde artışa sebebiyet verdiği, bu artışın oksidatif stres göstergesi olarak görülebileceği öngörülmektedir. Nano boyuttaki malzemelerin artan kullanım alanları ile birlikte, çevre için büyük bir problem olarak karşımıza çıkabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metallothionein, *Gammarus pulex*, çinko nanopartikül, çinkooksit nanopartikül

### Effect of Metallothionein on *Gammarus pulex* Exposed to Zinc and Zinc Oxide Nanoparticles

**Received 09.11.2022; Accepted 11.04.2023**

**Abstract:** With the increase in the use of nanoparticle (NP) products in the industry, the ecosystem and all organisms are directly and indirectly at risk of the effect of NPs. In this study, metallothionein (MT) biomarker responses were investigated by exposure of freshwater *Gammarus pulex* to zinc (Zn) and zinc oxide (ZnO) NPs. In the experiment, a total of four experimental application groups (Control, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L), including the control group, were formed and studied with three replications. It was determined that the samples exposed to Zn-NP at 24 and 96 hours caused an increase in MT levels compared to the control ( $p<0.05$ ). Similarly, it was determined that ZnO-NP application samples caused increases in MT levels compared to the control in 96 h samples ( $p<0.05$ ), but no statistical difference was found in MT levels in 24-hour application samples ( $p<0.05$ ). As a result of the analyzes made in the study, it is predicted that Zn and ZnO NPs cause an increase in MT levels in the organism, and this increase can be seen as an indicator of oxidative stress. It has been determined that nano-sized materials can be a big problem for the environment with the increasing usage areas.

**Key Words:** Metallothionein, *Gammarus pulex*, zinc nanoparticle, zinc oxide nanoparticle

## GİRİŞ

Metallothionein (MT)'ler, alışılmadık derecede yüksek bir sistein içeriği (% 22 ila 33) ve civa, kadmiyum, bakır, çinko gibi ağır metal iyonlarını bağlamada seçici bir kapasite ile karakterize edilen, yaygın bulunan, ısıya dayanıklı, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. MT ilk olarak Margoshes ve Vallee <sup>[1]</sup> tarafından kadmiyum bağlayıcı bir protein olarak keşfedilmiş, Kage ve Vallee <sup>[2]</sup> tarafından saflaştırılarak metallothionein olarak adlandırılmıştır. Prokaryotlar, bakteriler, omurgasızlar, omurgalılar ve sucul canlılar gibi farklı canlı organizma gruplarında MT'ler bulunmaktadır <sup>[3,4]</sup>. Genellikle sitozolde bulunan MT'ler düşük molekül ağırlığında (6-7 kDa), metal bağlayan, sisteince zengin, aromatik amino asit bileşikleri bulunmayan ve metal tiyolat gruplarından oluşmuş bir proteindir <sup>[4-6]</sup>. MT'ler, türe bağlı olarak, farklı amino asit bileşimi ve yükü ile proteinin bir dizi izoformu mevcuttur. Metalloitiyonein beyin, timus, kemik iliği ve üreme organları dahil olmak üzere organizmaların birçok dokusunda bulunmuştur<sup>[7]</sup>. MT'ler lizin, serin ve arjinin gibi 20 sistein rezidüsünden oluşur ve bu rezidülerin metal

\*İlgili E-posta/ Corresponding E-mail: [oserdar@munzur.edu.tr](mailto:oserdar@munzur.edu.tr)  
(ORCID: 0000-0003-1744-8883)

bağlamakta rolleri olduğu düşünülmektedir [8]. MT mekanizmasının bağışıklık sistemini düzenleme, zararlı maddelerden arınma (detoksifikasyon), katalizator ve depolama görevlerinin olduğu düşünülmektedir [9]. MT'lerin 18 farklı metal molekülleri arasında bağlanma gücü olmakla birlikte Cu, Cd, Zn, Pb, Ag'yi daha fazla bağlayabilmektedirler [10].

En az bir boyutlarındaki kristal büyüklükleri 1-100 nm arasında değişen tek fazlı ya da çok fazlı partikül (NP)'ler olarak tanımlanan [11] nanoboyutlu malzemelerin bilim ve teknolojide kullanımları eskiden beri süre gelmektedir [12-14]. Oksidatif stres oluşumunun önemli bir kaynağı olan NP metaller, biyolojik sistemlerde önemli rol oynarlar. Küçük boyutları ve geniş spesifik yüzey alanına sahip olmaları sebebiyle metal oksit NP'leri yüksek kimyasal reaksiyona girme isteği kazanırlar. Bu durum da hücre ve organellerde hasar yaratarak direk ya da metabolik yollarla hepatotoksik (intrinsik) toksisiteye neden olmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı, nanotoksosite çalışmalarının çoğu nano boyuttaki metal oksitlere odaklanmıştır [5].

Çinko endüstride yaygın olarak kullanıldığı için doğada, özellikle de endüstrinin gelişmiş olduğu yerlerde yaygın olarak bulunur. Çinko atıkları söz konusu alanlarda yüzey sularına karışır [15,16].

Fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle sürekli gelişimini sürdüren nanopartiküller (NP'ler), ulaştıkları sucul ve karasal ortamlarda çok önemli potansiyellere sahiptir [17,18]. NP'lerin sucul organizmalarda toksisitesi ile ilgili çalışmalar hızla artmakta ve bu maddelerin çevresel risk değerlendirmeleri de önemli çalışmalar olarak kabul edilmektedir [19,18]. Dünyada metal veya metal oksit NP'lerin üretimi hızla artmakta ve bunun sonucunda su ve karasal ekosistemlere erişimleri ve kontaminasyonları artmaktadır [20,21]. NPO'lar diğer canlıların yaşamları üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Bu nedenle bu tür kirletici iyonların uzaklaştırılması insan yaşamı ve çevrenin korunması için son derece önemlidir [25,26]. Ancak NP'lerin kontaminasyon [22] ve maruz kalma süreleri [23,24] sonrasında ulaştıkları ortam ile etkileşimi, bunların değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Çinko oksit (ZnO) NP'ler, katkı maddeleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibakteriyel etkisinden dolayı güneş kremi üretimi, kozmetik ürünler, tekstil üretimi, boya pigmentleri, katalizörler ve vernikler gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar [27-29]. Daha da önemlisi, seçici toksisite sergiledikleri için belirli kanser türlerinin tedavisi ve su dezenfeksiyonu için uygun antikanser ajanlar arasında ZnO NP'ler önerilmiştir [30,31].

Ekolojik olarak toksikolojik testlerde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için sadece uygun test tipi değil, uygun test organizması da seçilmelidir [32]. Biyodeny veya toksisite araştırmalarında en önemli faktör, kullanılacak organizmaların seçimidir [33,34]. Suda yaşayan kabuklu ailesinden olan Gammaridler, kirleticilere karşı yüksek hassasiyetleri, bol miktarda bulunmaları ve kolay elde edilmeleri nedeniyle toksisite testleri için yaygın kullanılan türler arasındadır [35].

Bu çalışmada, metal bazlı Zn ve ZnO NP'lerine maruz bırakılan *G. pulex*'te, MT seviyesi değişimleri yarı kantitatif olarak ölçülmüştür. Çalışmada, kullanılan Zn ve ZnO NP'leri MT biyobelirteçlerinin 24. ve 96. saatlerdeki değişimlerinin belirlenmesi MT aktivitesinin akut etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL METOT

### *Nanopartiküller*

Çalışmada kullanılan NP materyalleri Zn (40–60 nm) ve ZnO (10–30 nm) ticari firmadan (SkySpring) temin edilmiştir. Analitik reaktif sınıfından olan kimyasallara herhangi bir arındırma veya saflaştırılma yapılmadan kullanılmıştır. Her iki NP için üretici firmanın beyan ettiği şekil ve boyut verileri referans alınarak biyodeny çalışmalarında kullanılmıştır.

### *Biyodeny Organizması*

Çalışmada kullanılan *G. pulex* organizmaları Munzur Akarsuyu yan kollarından toplanmış, uygun koşullarda kültüre edilmiştir. Model organizmalar seçilirken sağlıklı, hareket kısıtı olmayan, aynı boyuttaki erkek bireyler olmasına dikkat edilmiştir.

### *Nanopartikül Süspansiyonlarının Hazırlanması*

Zn ve ZnO NP'lerinin %10'luk (m/v) stok süspansiyonları, (18,0 MΩ) özelliğinde ultra saf su içinde çözdürülerek elde edilmiştir. Her bir stok çözelti, 5 dakika vorteks ile homojenize edildikten sonra, en yüksek NP dağılımını sağlamak için, ortalama 15-20 dakika olacak şekilde ultrasonik banyoda sonifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir NP'ün stok süspansiyonundan, deneme dizaynında

belirtilen konsantrasyon oranları dikkate alınarak, otomatik pipet yardımıyla uygun hacimler alınmış ve zaman kaybetmeden tüm deneme gruplarındaki organizmalar NP'lere maruz bırakılmıştır.

### Biyodeny Düzenegi

Nanopartiküllerin uygulanmadığı, deney organizmasının optimum yaşama ortamının sağlandığı kontrol grubu oluşturulmuştur. NP uygulama konsantrasyonları, çevreye salınım oranları göz önüne alınarak düşük oranlarda belirlenmiştir. *G. pulex* üzerinde NP'lerin etkisi ile ilgili uygulama konsantrasyonları Tablo 1'de belirtilmiştir. Deney başlangıcında her bir akvaryum (1500 mL) içerisine, 15 birey konularak deneme dizaynı kurgulanmıştır. Kontrol ve uygulama grupları birbirinden bağımsız olarak 3 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 1.** Zn ve ZnO nanopartiküllere maruz bırakılan organizmaların biyodenyel tasarımı

Gruplar	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3
NP-Zn/ZnO (ppm)	0	10	20	40
<i>G. pulex</i> (adet)	45	45	45	45
Tekerrür	3	3	3	3

### Metallothionein Analizi

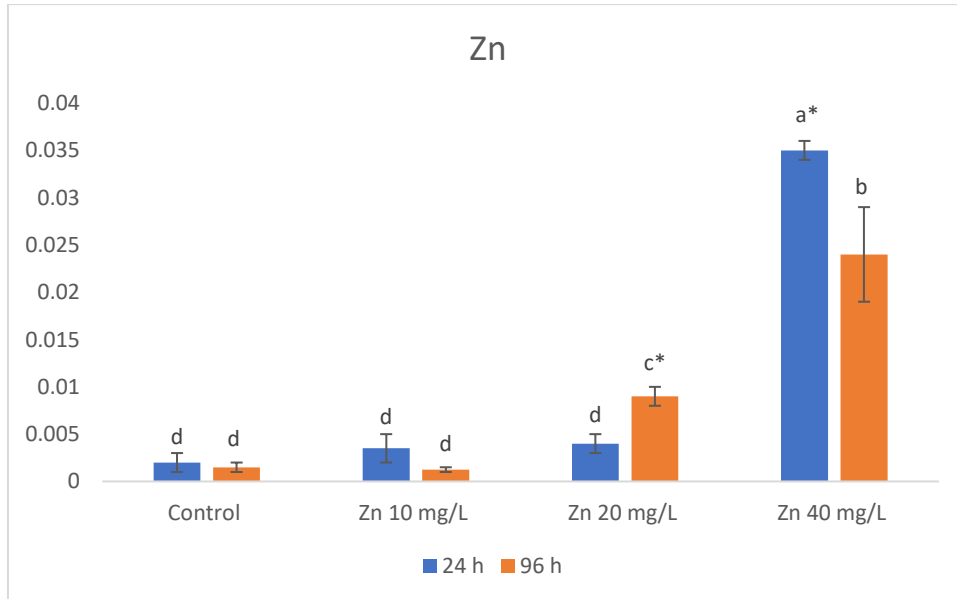
Yapılan çalışmada Biosense marka (semi-quantitative biomarkers Ürün No: B00400402/B00400404) ELISA kit kullanılmıştır. Bu kit, Metallothionein (MT) biyobelirteci yarı kantitatif tespiti için kullanılacak bir dizi Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) reaktifi içerir. Alınan örneklerde, dolaylı antikor yakalama ELISA formatında uygun bir monoklonal veya poliklonal antikor kullanılarak biyobelirteç tespitine dayanmaktadır.

### İstatiksel Analiz

Çalışmadaki tüm deneyler bağımsız olarak üç tekerrürlü olarak tekrarlanmış ve veriler standart sapmalı ortalamalar olarak kaydedilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar tek yönlü analiz ANOVA, SPSS/24.0 paket programı TUKEY çoklu karşılaştırmaları ile belirlenmiştir.

### BULGULAR

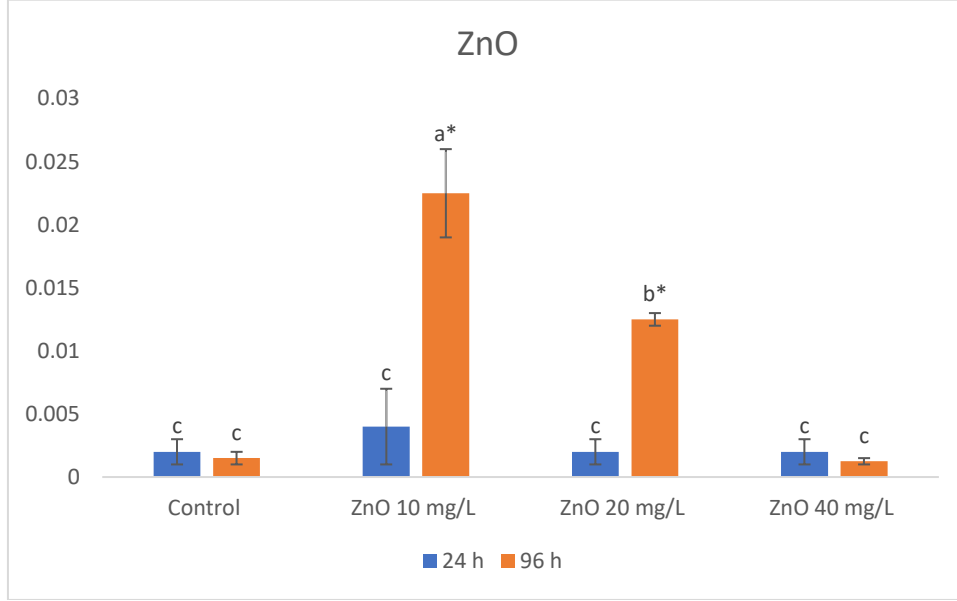
Zn ve ZnO'ya maruz kalmanın Zn vücut yükü üzerindeki etkileri, kontrol değerlerinin yüzdesi olarak ifade edilen MT seviyeleri Şekil 1 ve 2'de sunulmaktadır.



**Şekil 1.** Zn-NP'ye maruz bırakılan *G. pulex*'teki MT seviyeleri

Sütunlar üzerindeki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları, Yıldız (\*) işareti ise aynı grubun farklı saatleri (24 ve 96 saat) arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterir.

Zn-NP'e maruz bırakılan *G. pulex*'te kontrole kıyasla 24 ve 96 saatlerde istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar ( $p<0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 1). Zn-NP için maruziyet süresi ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak MT seviyelerinde doğrusal bir artış göstermiştir.



**Şekil 2.** ZnO-NP'ye maruz bırakılan *G. pulex*'teki MT seviyeleri  
Sütunlar üzerindeki farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları, Yıldız (\*) işareti ise aynı grubun farklı saatleri (24 ve 96 saat) arasındaki istatistiksel farklılıkları gösterir.

ZnO-NP'ne maruz bırakılan *G. pulex*'te kontrole kıyasla 96 saat 10 ve 20 mg/L uygulama grupları MT seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı artış ( $p<0,05$ ), 40 mg/L uygulama grubunda ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 2). ZnO-NP'ne grupların maruziyet süresi göz önüne alındığında ise 10 ve 20 mg/L uygulama grupları arasında süre (24-96 saat) istatistiksel açıdan anlamlı artış ( $p<0,05$ ), diğer uygulama grupları MT seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

## TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada Zn-NP ve ZnO-NP'lerinin olası sucul ekosisteme karışması durumunda sucul ekosistem üzerindeki etkisini model bir organizma *G. pulex*'teki MT biyobelirteçlerine tepkilerinin ve bunların ekotoksikolojik çalışmalarda kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Her iki NP'lün ölümcül olmayan konsantrasyonları ön çalışmalarla belirlenmiştir.

Canlılar ve dokular arasındaki MT-metal bileşenleri arasındaki farklılık, maruz kalınan metal çeşidine ve maruz kalma şekline göre farklılık göstermesine rağmen MT'lerin değişik metalleri bağlama yönünde ilgisi  $Zn^{+2}<Pb^{+2}<Cd^{+2}<Cu^{+2}<Ag^{+2}=Hg^{+2}=Bi^{+3}$  olarak sıralanabilir [36,37]. Doğrudan metal alımı, depolanması ve atılımına dahil olan dokuların yüksek bir MT sentez kapasitesine sahiptir [38]. Esansiyel metallerden bazıları canlı organizmalar için gerekli olmalarına rağmen, yüksek konsantrasyona ulaştıklarında toksik olabilirler [39].

Hogstrand ve ark. [40], yaptıkları çalışmada tatlısu levreğini (*Perca fluviatilis*) Cu, Zn ve Cd'a maruz bırakarak metalotiyonein proteinin metal bağlanmadaki rolünü araştırmışlardır. Çalışma bulgularına göre Zn miktarları ile MT düzeyleri arasında pozitif korelasyonun olduğunu rapor etmişlerdir. Van Campenhout ve ark. [41], kaya balıklarında Cd, Zn metal birikimi ve MT düzeylerini araştırmışlardır. Cd ve Zn ile MT düzeyleri arasında pozitif korelasyon, olduğunu rapor etmişlerdir. Bervoets ve ark. [42], dere kaya balığı (*Gobio gobio*), kızılkanat (*Rutilus rutilus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarında Cd, Cu ve Zn düzeyleri ve MT indüksiyonunu araştırmışlardır. MT seviyeleri ile hepatik çinko düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bayhan [43], yaptığı çalışmada, doğadan yakaladıkları kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levrek (*Perca fluviatilis*) balıklarının Cu, Cd, Zn değerleriyle MT düzeylerini belirlemişlerdir. Avladıkları balıkların ağır metal düzeyleri, yasal limitlerin altında

olması sebebiyle MT değerlerinde ağır metallerle ilişkili bir değişiklik olmadığını ileri sürmüşlerdir. Çimen ve Serdar [44] yaptıkları çalışmada Cu ve CuO NP'lerinin *G. pulex*'te MT düzeylerinde artışa neden olduğu ve bu artışın oksidatif strese neden olabileceğini bildirmişlerdir. Genel olarak, suda yaşayan organizmalarda esansiyel olmayan veya esansiyel metallerin yüksek konsantrasyonları mevcut olduğunda hücrelerde MT konsantrasyonu artar [45], bu da ortamdaki yüksek metal biyoyararlanımını yansıtır [46-48, 38].

Zhang ve Wang [49] yaptıkları çalışmada, Zn'ya maruz bıraktıkları *Acanthopagrus schlegeli*'de MT seviyelerinde önemli ölçüde artış olduğunu bildirmişlerdir. Mosleh Yahia ve ark. [50] yaptıkları çalışmada *Tubifex tubifex*, sucul omurgasız organizmayı 7 ve 15 gün boyunca farklı bakır konsantrasyonlarına (50, 100 ve 200 µg/l) maruz bırakmışlardır. Maruz kalan organizmalardaki MT seviyeleri, farklı bakır konsantrasyonlarında maruz kaldıkları süreyle ilişkili olarak önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) arttığını bildirmişlerdir.

Khater ve ark. [51] yaptıkları çalışmada, Cd ve Cu'ya (200 µg/l, 30 µg/l) maruz bıraktıkları *Perna perna* midyesinin MT'lerin indüklenmesi arasında bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir.

Benzer şekilde metal ile kontamine olmuş çeşitli sucul organizmalarda metallothionein indüksiyonunun olduğu bilimsel çalışmalarla rapor edilmiştir [52-55].

MT içeriklerindeki artış, metal maruziyetinin spesifik bir biyobelirteci olarak kabul edilir. Mao ve ark. [56] MT'nin genel yapısı ve işlevi, gen yapısı, transkripsiyon regülasyonu, indüksiyon faktörleri ve ağır metallerin suda yaşayan omurgasızların gelişimini etkilediğini rapor etmişlerdir. Danabaş ve ark. [57] *Artemia salina* ve *Daphnia magna* üzerindeki Zn ve ZnO nanoparçacıklarının toksik etkisini araştırdıkları çalışmada, NP'lerin biyokimyasal ve toksikolojik etkilerinin tam olarak anlaşamadığını, çünkü gözlemlenen etkiler nanoboyutlu malzemenin boyutuna, fiziko-kimyasal özelliklerine ve çevre ve organizma çeşitliliği gibi birçok parametreye bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak Zn (40–60 nm), Zn (80–100 nm) ve ZnO (10–30 nm) NP'leri farklı bir karakteristik özellik sergilediğini, özellikle Zn (80-100 nm) NP'lerin birikim oranlarının orantılı olarak çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da Zn (40–60 nm) ve ZnO (10–30 nm) NP'leri kullanılmış olup ZnO NP'lünün 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarında MT seviyelerinin maksimumna ulaştığı belirlenmiştir. ZnO NP bağlama için MT konsantrasyonunun arttığı ve yüksek konsantrasyondaki belirli bir kapasiteye ulaştıktan sonra MT sentez kapasitesinin düştüğü tahmin edilmektedir. Yapılan bu çalışmada literatürdeki çalışmalara benzer şekilde artan Zn-NP ve ZnO-NP'ün artan konsantrasyonları kontrole kıyasla arttığı belirlenmiştir.

## SONUÇ

MT seviyelerini biyolojik matris olarak *G. pulex* kullanarak metalik NP olan Zn-NP ve ZnO-NP'lerine maruziyeti MT biyobelirteçleri için izleme programlarında kullanılmasına yararlı sonuçlar alınabilir. Bu NP'lerin kullanımı ve doğaya salınımı ile ilgili bir kontrol mekanizması oluşturulmalı ve etkileri üzerinde farklı organizmalarda kullanılarak sitotoksiste, genotoksisite, histopatoloji gibi kapsamlı çalışmalar yürütülmelidir.

## KAYNAKLAR

- [1] Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society. 1957; 79: 813-814.
- [2] Kage, J. H. R., & Vallee, B. L. (1961). A cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. J. Biol. Chem, 236, 2435-2442.
- [3] Roesijadi, G. (1992). Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Review. Aquatic Toxicology 22 (2) 81-113.
- [4] Newman, M. C. (2009). Fundamentals of ecotoxicology. CRC press.
- [5] Wang, G., and Fowler, B. A. (2008). Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. Toxicology and applied pharmacology, 233(1), 92-99.
- [6] Szcurek, E. I., Bjornsson, C. S., & Taylor, C. G. (2001). Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. The Journal of nutrition, 131(8), 2132-2138.

- [7] Bremner, I. and Beattie, J.H. (1990). Metallothionein and trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.* 10:63-83.
- [8] Mitropoulos D, Kyroudi-Voulgari A, Theocharis S, Serafetinides E, Moraitis E, Zervas A, Kittas C. Prognostic significance of metallothionein expression in renal cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology.* 2005; 3(1): 5.
- [9] Webb M. Toxicological significance of metallothionein. *experientia.* Elsevier Science Publishers. 1987; 52: 109-134.
- [10] Coyle P, Philcox JC, Careya LC, Rofea AM. Metallothionein: the multipurpose protein cmls, *Cellular and Molecular Life Sciences,* 2002; 59: 627–647
- [11] Işık, K. (2015). Farklı özellikteki ZnO nanopartiküllerinin fibroplast hücreleri üzerindeki etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- [12] Delatte, N.J. (2001), Lessons from roman cement and concrete, *J. Prof. Issues Eng. Educ. Pract.* 127, 109–115.
- [13] Edwards, P.P. ve Thomas, J.M. (2007), Gold in a metallic divided state—from faraday to present-day nanoscience, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 5480–5486
- [14] Sanchez, C., Lebeau, B., Chaput, F. ve Boilot, J.P. (2003), Optical properties of functional hybrid organic-inorganic nanocomposites, *Adv. Mater.* 15, 1969– 1994.
- [15] Bunker VW, Hinks LJ, Lawson MS, Clayton BE. Assessment of zinc and copper status of healthy elderly people using metabolic balance studies and measurement of leukocyte concentrations. 1984; 40: 1096-1102.
- [16] Thomas AJ, Bunker VW, Hinks U, Sodha N, Mullee MA, Clayton BE. Energy, protein zinc and copper status of twenty-one elderly in patients: analyzed dietary intake and biochemical indices. 1988; 59: 181-194.
- [17] Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella Jr., M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769-1780.
- [18] Martin, J.D., Telgmann, L., Metcalfe, C.D., 2017. A method for preparing silver nanoparticle suspensions in bulk for ecotoxicity testing and ecological risk assessment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 589–594. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2067-9>.
- [19] Garner, K.L., Suh, S., Lenihan, H.S., Keller, A.A., 2015. Species sensitivity distributions for engineered nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5753–5759.
- [20] Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43 (24), 9216–9222.
- [21] Morales-Diaz, A.B., Ortega-Ortiz, H., Juarez-Maldonado, A., Juarez-Maldonado, A., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., 2017. Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems.
- [22] Ben-Moshe, T., Frenk, S., Dror, I., Minz, D., Berkowitz, B., 2013. Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere* 90, 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.018>.
- [23] Aruoja, V., Pokhrel, S., Sihtmäe, M., Mortimer, M., Mädler, L., Kahru, A., 2015. Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. *Environ. Sci. Nano.* 2, 630–644. <https://doi.org/10.1039/C5EN00057B>.
- [24] Baysal, A., Saygin, H., Ustabasi, G.S., 2019. Influence of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on the soil elements. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 98–104. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2481-7>.
- [25] Altıntig, E., Altundag, H., Tuzen, M., Sarı, A., 2017. Effective removal of methylene blue from aqueous solutions using magnetic loaded activated carbon as novel adsorbent. *Chem. Eng. Res. Des.* 122, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.03.035>.
- [26] Baysal, A., Saygin, H., 2018. Effect of zinc oxide nanoparticles on the trace element contents of soils. *Chem. Ecol.* 34 (8), 713–726. <https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1491556>.
- [27] Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5–22.
- [28] Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* 360, 794–802.

- [29] Becheri, A., Dürr, M., Nostro, P.L., Baglioni, P., 2008. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: Application to textiles as UV-absorbers. *J. Nanopart. Res.* 10 (4), 679–689.
- [30] Hanley, C., Layne, J., Punnoose, A., Reddy, K.M., Coombs, I., Coombs, A., Feris, K., Wingett, D., 2008. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. *Nanotechnology* 19, 295103.
- [31] Lin, D., Xing, B., 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 42 (15), 5580–5585.
- [32] Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment.* CRC Press.
- [33] Danabas, D., Ates, M., Tastan, B. E., Cimen, I. C. C., Unal, I., Aksu, O., & Kutlu, B. (2020). Effects of Zn and ZnO nanoparticles on *Artemia salina* and *Daphnia magna* organisms: toxicity, accumulation and elimination. *Science of the total environment*, 711, 134869.
- [34] Kargın, F., & Palandökenlier, E. (2019). Çinko Oksit Nanopartikülleri ve Çinko Sülfatın *Oreochromis niloticus*' un Kan Dokusunda Bazı Biyokimyasal Parametreler üzerine Etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(3), 447-453.
- [35] Serdar, O. (2019). The effect of dimethoate pesticide on some biochemical biomarkers in *Gammarus pulex*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21905-21914.
- [36] Thomas, J.P., Bachowski, G.J., & Girotti, A.W., (1986). Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium-and zinc-metallothioneins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 884(3), 448-461.
- [37] Vašák, M., (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 13-17.
- [38] Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P.S., (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic toxicology*, 76(2), 160-202.
- [39] Torres, P., Tort, L., & Flos, R., (1987). Acute toxicity of copper to mediterranean dogfish. *Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology*, 86(1), 169-171.
- [40] Hogstrand C, Lithner G, Haux C. Relationship between metallothionein, copper and zinc in perch (*Perca fluviatilis*) environmentally exposed to heavy metals. *Marine Environmental Research*. 1989; 28: 179–182.
- [41] Van Campenhout K, Bervoets L, Blust R. Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003; 22: 1548–1555.
- [42] Bervoets L, Knapen D, De Jonge M, Van Campenhout K, Blust R. Differential hepatic metal and metallothionein levels in three Feral fish species along a metalpollution gradient. *Plos One*. 2013; p. 8-3.
- [43] Bayhan, T. (2015). Büyük Menderes deltasından avlanan kefal (*Leuciscus cephalus*) ve levreklerde (*Perca fluviatilis*) Cu, Zn ve Cd düzeylerinin belirlenmesi ve metalotiyoinin ile ilişkisinin araştırılması (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- [44] Çimen, İCÇ., ve Serdar O. 2022. Effect of Metallothionein Levels in *Gammarus pulex* Exposed to Copper And Copperoxide Nanoparticles. *Ecological Life Sciences* 17(2):59-67.
- [45] Shariati, F., & Shariati, S. (2011). Review on methods for determination of metallothioneins in aquatic organisms. *Biological trace element research*, 141(1), 340-366.
- [46] Geffard, A., Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C., (2002a). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*, 7(2), 123-137.
- [47] Geffard, A., Geffard, O., His, E., & Amiard, J.C., (2002b). Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Marine Ecology Progress Series*, 233, 131-142.
- [48] Geffard, A., Amiard-Triquet, C., & Amiard, J. C. (2005). Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 209-220.
- [49] Zhang, L., & Wang, W. X. (2005). Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquatic Toxicology*, 73(4), 353-369.

- [50] Mosleh, Yahia Y.; Paris-Palacios, Severine; Biagianti-Risbourg, Sylvie. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere*, 2006, 64.1: 121-128.
- [51] Khati, W., Ouali, K., Mouneyrac, C., & Banaoui, A. (2012). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia*, 18, 784-794.
- [52] Zhang, Y.S., Schlenk, D., 1995. Induction of hepatic metallothionein expression from cadmium-induced channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1425–1431.
- [53] Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Metallothionein analyzed in liver of *Rutilus rutilus* exposed to Cu with three methods: metal summation, SH determination and original spectrofluorimetric method. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 126, 122–133.
- [54] Barka, S., Pavillon, J.F., Amiard, J.C., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 128, 479–493.
- [55] Pourang, N., Dennis, J.H., 2005. Distribution of trace elements in tissues of two shrip species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. *Environ. Int.* 31, 325–341.
- [56] Mao, H., Wang, D. H., & Yang, W. X. (2012). The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquatic toxicology*, 110, 208-213.
- [57] Danabas, D., Ates, M., Tastan, B. E., Cimen, I. C. C., Unal, I., Aksu, O., & Kutlu, B. (2020). Effects of Zn and ZnO nanoparticles on *Artemia salina* and *Daphnia magna* organisms: toxicity, accumulation and elimination. *Science of the total environment*, 711, 134869.