



Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin *Cyprinus carpio*'da Bazı Serum Parametreleri ile Serum Enzim Aktiviteleri Üzerine Akut Toksisitesi

Mustafa TUNÇSOY* Servet DURAN

Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana/Türkiye

Geliş/Received: 30.10.2020

Kabul/Accepted: 02.12.2020

Atıf yapmak için: Tunçsoy, M. & Duran, S. (2020). Titanyum Dioksit Nanopartiküllerinin *Cyprinus carpio*'da Bazı Serum Parametreleri ile Serum Enzim Aktiviteleri Üzerine Akut Toksisitesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(4), 704-710.

How to cite: Tunçsoy, M. & Duran, S. (2020). Acute Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles on Some Serum Parameters and Enzyme Activities of *Cyprinus carpio*. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(4), 704-710.

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7306-0539>
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1496-1932>

*Sorumlu yazarın:
Mustafa TUNÇSOY
Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Adana/Türkiye
✉: mustafa_tuncsoy@hotmail.com
Cep telefonu : +90 (539) 815 28 28
Telefon : +90 (322) 338 60 60
Faks : +90 (322) 338 60 70

Öz: Titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂ NP) elektronik malzemeler, paketlenme, yiyecek endüstrisi ve kozmetik ürünler başta olmak üzere yaygın kullanıma sahip nanopartiküllerdir. Bu yaygın kullanım sonucu doğaya daha yüksek düzeylerde salınmaları, özellikle su organizmaları için tehlike oluşturmaktadır. Bu çalışmada TiO₂ NP'nin 25 ve 50 mg/L derişimlerinin 24, 48 ve 96 saatlik sürelerle etkisinde *C. carpio*'da serum glikoz, total protein ve kolesterol düzeyleri ile serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen süre ve derişimlerde TiO₂ NP etkisinde balıklarda mortalite gözlenmemiştir. TiO₂ NP etkisinde serum glikoz düzeyi her iki derişimde de 48 ve 96 saatlik etki süresinde kontrole oranla önemli düzeyde artış gösterirken, serum total protein ve kolesterol düzeyinde tüm süre ve derişimlerde kontrole oranla herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitesi ise her iki derişimde de 96 saatlik etki süresinde kontrole oranla önemli düzeyde artış göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *C. carpio*, nanopartikül, serum parametreleri, titanyum dioksit.

Acute Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles on Some Serum Parameters and Enzyme Activities of *Cyprinus carpio*

*Corresponding author's:
Mustafa TUNÇSOY
Çukurova University, Faculty of Arts and
Sciences, Department of Biology,
Adana, Turkey.
✉: mustafa_tuncsoy@hotmail.com
Mobile telephone: +90 (539) 815 28 28
Telephone : +90 (322) 338 60 60
Fax : +90 (322) 338 60 70

Abstract: Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are widely used in industries for electronics, packaging, food, and cosmetics. Due to their extensive usage of these NPs pose a great threat to the aquatic environments. Effects of 25 and 50 mg/L waterborne TiO₂ NPs on serum glucose, total protein and cholesterol levels and serum AST, ALT and ALP activities of *C. carpio* were determined after 24, 48 and 96 hours of exposure. No mortality was observed during the experiments. Serum glucose level increased at 48 and 96 hours while serum total protein and cholesterol levels unchanged compared with control at the end of the 96 hours. There was also an increased in serum AST, ALT and ALP activities compared with control at 96 hours of exposure to TiO₂ NPs.

Keywords: *C. carpio*, nanoparticle, serum parameters, titanium dioxide.

GİRİŞ

Son yıllarda sanayideki hızlı gelişim ve nüfus artışı su ortamlarının ağır metaller gibi çeşitli kirleticiler tarafından kirletilmesine neden olmaktadır (Wang vd.,

2013; Ji vd., 2015; Uncumusaoğlu & Akkan;2017; Akkan et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Abdhel-Khalek vd., 2020). Metaller, atmosferik birikim, jeolojik erozyon gibi doğal yollarla ya da kanalizasyon deşarjı, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler gibi antropojenik kaynaklar yoluyla su ortamına

girmekte ve doğal derişimlerinin aşılmasıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik kirliliğe neden olarak, çevre ve insan sağlığına önemli tehlike oluşturmaktadır (Bo vd., 2015; Palma vd., 2015).

Nanomateriyaller yüzey alanlarının geniş olması ve yüksek reaksiyon aktiviteleri son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Nanoteknolojinin hızlı gelişim göstermesi sonucu çeşitli boyut ve çaplardaki bu nanomateriyaller ticari ve endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Amelia vd., 2012; Tang vd., 2012). Nanopartiküller su ortamında daha dengeli olmaları, daha küçük olan boyutları ve spesifik yüzey alanlarının daha büyük olmaları nedeniyle büyük kütleli metallere oranla daha hızlı reaksiyona girmektedirler (Al-Baurity vd. 2013). Bu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak endüstrideki kullanımları ilk kullanımları olan 2000 yılından günümüze yüksek bir ivme ile artmaktadır. Ancak, bu artış doğaya daha yüksek düzeylerde salınmaları ile sonlandığından özellikle su organizmaları için tehlike oluşturmaktadır.

Titanyum dioksit nanopartikülleri elektronik malzemeler, paketleme, yiyecek endüstrisi ve kozmetik ürünler başta olmak üzere yaygın kullanıma sahip nanopartiküllerdir. Beyaz pigmentler olmaları nedeniyle şekerleme, sakız, deodorantlar, şampuanlar, duş jelleri, diş macunları ve güneş koruyucular gibi yiyecek ve kişisel bakım ürünlerinde çok yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar (Weir vd., 2012).

Omurgalı hayvanların kanında çok sayıda enzim, besin maddesi, metabolitler, hormonlar, iyonlar ve atık ürünler bulunmaktadır. Ayrıca metallerin organizmaya alındıktan sonra depolama, detoksifikasyon ve atılımın yapılacağı iç organlara taşınması da kan yoluyla olmaktadır. Kan analizlerinde hematolojik ve biyokimyasal parametreler yaygın olarak uygulanmakla birlikte, bu parametreler balıklardaki fizyolojik değişikliklerin izlenmesi için uygun göstergelerdir.

Araştırmada materyal olarak kullanılan ve protein kaynağı olarak tüketilen *C. carpio* hastalıklara ve sıcaklık derişimlerine karşı dirençli olmaları, yumurta açılım sürelerinin kısa ve kültür koşullarında büyümelerinin hızlı olması nedeniyle yetiştiriciliği yaygın bir şekilde yapılmaktadır.

Su ekosistemlerine giren ağır metallerin akut veya kronik etkisi balıkların doku ve organlarında birikimin yanı sıra, serumdaki biyokimyasal parametreleri de etkileyerek metabolik ve fizyolojik olaylarda derişime neden olmaktadır. Bu amaçla bu araştırmada titanyum dioksit nanopartiküllerinin 25 ve 50 mg/L derişimlerinin 24, 48 ve 96 saatlik süreyle etkisinde serum glikoz, total protein ve kolesterol düzeyleri ile AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada materyal olarak kullanılan *C. carpio* bireyleri Adana DSİ üretim havuzlarından alınarak deneylerin yürütüldüğü kontrollü ortam şartlarındaki Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Ekotoksikoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. Balıklar, her biri 40x120x40 cm boyutlarında, içerisinde 120 L çeşme suyu bulunan stok akvaryumlar içerisinde 2 ay süreyle tutularak laboratuvar ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre sonunda deneyde kullanılan balıklar 19,50 ± 1,70 cm boy ve 105,0 ± 10,90 g ağırlığa ulaşmışlardır.

Adaptasyon ve deney süresince ortam sıcaklığı 25±1°C sabit tutularak 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve balıklar günde iki kez toplam biyomasın %2'si kadar hazır balık yemi (Pınar hazır balık yemi Pelet No:2, Türkiye) ile beslenmişlerdir.

Deneyde 40x120x40 cm boyutlarında toplam 3 tane cam akvaryum kullanılmış olup her birine 120 L dinlendirilmiş metal içermeyen çeşme suyu konulmuştur. Her bir akvaryuma 9 balık konulmuş, toplamda 27 balık kullanılmıştır. İlk 2 akvaryuma son derişimleri sırası ile 25 ve 50 ppm Ti/L olacak şekilde TiO₂ NP, üçüncü akvaryuma ise metal içermeyen dinlenmiş çeşme suyu konulup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Deney çözeltilerinin hazırlanmasında titanyum dioksit nanopartikülü (P25 Degussa) kullanılmıştır. Deneyler süresince ortam suyunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda gösterilmiştir.

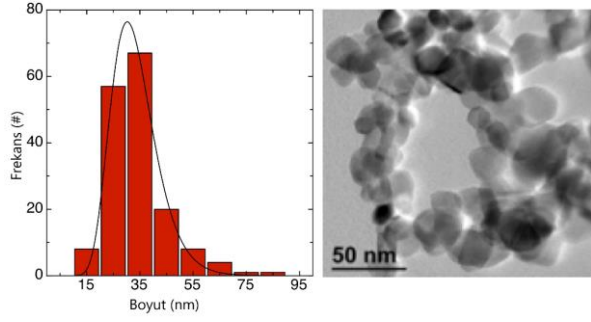
Sıcaklık (Akvaryum): 23 ± 0,5°C
Çözünmüş oksijen: 7,0 ± 0,3 mg/L
pH: 8,2 ± 0,3

Toplam alkalinite: 315 ± 0,5 mg CaCO₃/L

Deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüş olup her tekrarda bir balık olacak şekilde kullanılmıştır. Deney süresince deney çözeltileri her gün taze olarak hazırlanan 1000 ppm stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak deriştirilmiştir. Çözeltiler akvaryumlara eklenmeden hemen önce 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda sonikasyona bırakılmıştır. 24, 48 ve 96 saatlik etki süreleri sonunda balıklar çıkarılmıştır.

Titanyum dioksit nanopartikülünün karakterizasyonuna ait veriler aşağıda olup, TEM görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir.

Partikül boyut dağılımı: 28,82 nm ± 11,07 nm
Yoğunluk: 4,3384 ± 0,0057 g/cm³
Spesifik yüzey alanı: 46,45 ± 2,32 m²/g



Şekil 1. TiO₂ NP'nin Transmisyon elektron mikroskopu görüntüsü.

Figure 1. Transmission electron microscope image of TiO₂ NP.

Serum parametrelerin incelenmesinde kullanılan kan örnekleri her bir deneğin kaudal pedinkülünün vertikal doğrultuda kesilmesi yolu ile elde edilmiştir. Alınan kan örnekleri içerisinde herhangi bir antikoagülant madde bulunmayan santrifüj tüplerine aktarılarak 4000 dev/dak.'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve serum örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen serum örnekleri serum tüplerine aktarılarak analize hazır hale getirilmiş ve serum parametrelerinin analizinde Beckman Coulter DXI 800 ve DXC 800 marka otoanalizator cihazı kullanılmıştır.

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 21 Paket Programı kullanılarak Varyans Analizi ve Student-Newman Keul's Test (SNK) testleri uygulanarak yapılmıştır

BULGULAR VE TARTIŞMA

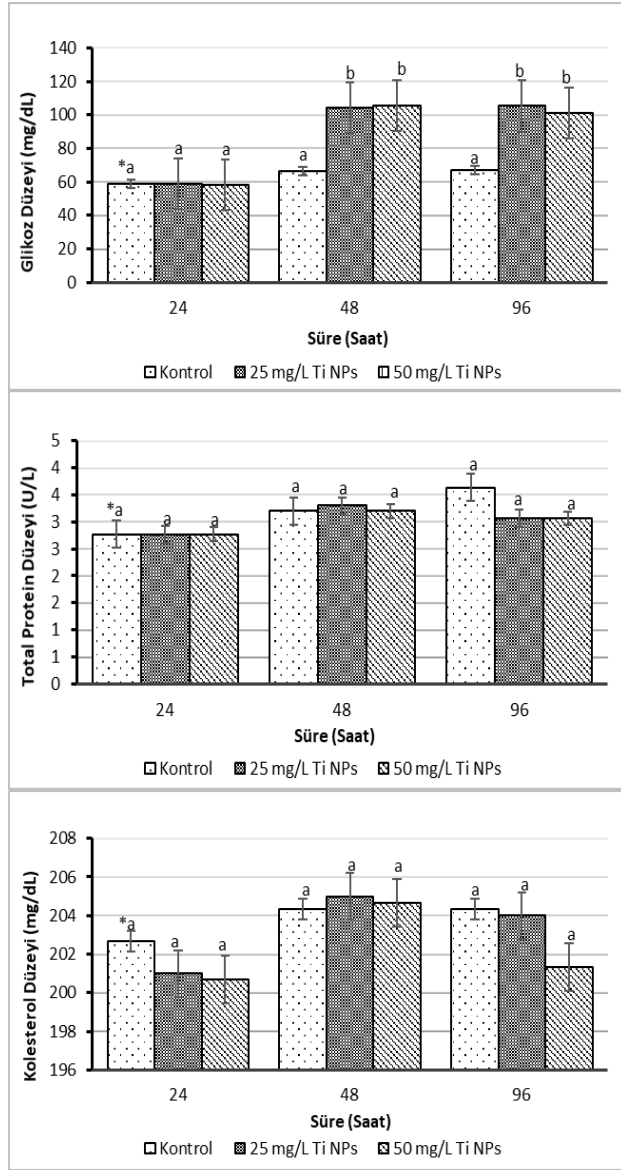
Glikoz, total protein ve kolesterol gibi serum parametreleri, hayvanların sağlık durumlarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Metal etkisinde kalma gibi çevresel stres faktörleri, belirtilen parametrelerin bir ya da daha fazlasında değişikliğe neden olmaktadır (Yang & Chen, 2003; McDonald & Grosell, 2006). Glikoz, stres metabolitlerine karşı dokuların gereksinim duyduğu acil enerjiyi karşılamaktadır. Bir stres hormonu olan kortizolün balıklarda glukoneojenez ve glikojenoliz yoluyla glikojenden glikoz üretimini artırdığı ve bu yolla plazma glikoz düzeyinde artışlara neden olduğu bilinmektedir (Javed & Usmani, 2015). Total protein ve kolesterol organizmadaki beslenme durumunun belirteçleridir (Yang & Chen, 2003). Serum total proteini karaciğerde sentezlenen temel serum proteinleri olup karaciğer hasarının bir belirteci olarak ifade edilmektedir. Kolesterol akut ve kronik stres etkisindeki balıklarda çevresel stres yapıcıların etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır (Wedemeyer & McLeay, 1981).

Yapılan birçok çalışmada, hematolojik parametrelerin, balıkların çevresel stres faktörlerine ve kirlenmelerin varlığına verdikleri fizyolojik tepkiler hakkında önemli bilgiler sağlayabileceği (Li vd., 2011) ve

balık kanındaki birçok biyokimyasal parametrenin ağır metal toksisitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilceği ileri sürülmüştür (Fırat & Kargın, 2010). Kan glikoz düzeyindeki artış, stres durumuyla karşılaşan hayvanlarda sıkça görülen bir durumdur ve bu gibi durumlarda ortaya çıkan katekolamin ve kortikosteroid gibi hormonların salgılanmasının ana etkilerinden biridir (Brown, 1993). Kan glikoz düzeyindeki artış, artan adrenokortikotropik ve glukagon hormonları ve/veya azalmış insülin aktivitesinin aracılık ettiği, karaciğer glikojeninin parçalanmasındaki artışın yol açtığı bozulmuş karbonhidrat metabolizmasını göstermektedir (Raja vd., 1992). Cicik ve Engin, (2005) tarafından stres altındaki balıklarda artmış serum glikoz seviyeleri bildirilmiştir. Serum total protein düzeyi suda yaşayan organizmalarda ksenobiyotik kaynaklı stresin önemli bir göstergesidir (Singh & Sharma, 1998). Serum total proteini yani karaciğerde sentezlenen serum proteini, karaciğer yetmezliğinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Yang & Chen, 2003). Kolesterol, hücre membranlarının yapısında, safra ve steroid hormonlarının sentezinde kullanılan ve balıklarda gelişme, eşeysel olgunluğa ulaşma ve üreme için gerekli bir yapı elemanıdır. Kolesterolün yaklaşık % 80'i karaciğer tarafından üretilmektedir (Hasheesh vd., 2011). Kolesterolün sentezinde ve salgılanmasında en önemli organ karaciğerdir, dolayısıyla karaciğerde meydana gelebilecek herhangi bir hasar kolesterol düzeyinde değişikliklere neden olmaktadır. Kolesterol lipoprotein metabolizmasını ve lipit üretimini düzenlemektedir (Dietschy vd., 1993).

Yapılan birçok çalışmada stres koşullarında serum glikoz düzeyinde artış meydana geldiği belirtilmiştir (Iwama vd., 1999; Cicik & Engin, 2005; Ramesh, 2007; Tunçsoy, 2019). Serum total protein düzeyinin belirlenmesi karaciğer hasarının indikatörü olarak kullanılmakla birlikte balıkların beslenme durumlarıyla ilgili bir parametredir ve ksenobiyotik kaynaklı stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Schaperclaus vd., 1992; Yang & Chen, 2003). Yapılan çalışmalarda genellikle uzun süreli metal etkisinin serum total protein (Singh & Reddy, 1990; Preto vd., 2014; Zaghoul vd., 2006) ve kolesterol (Dutta & Haghghi, 1986; Shaheen & Akhtar, 2012; Heydarnejad vd., 2013) düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir. *C. carpio* ile yürütülen bu çalışmada TiO₂ NP etkisinde serum glikoz düzeyi her iki derişimde de 48 ve 96 saatlik etki süresinde kontrole oranla önemli düzeyde artış gösterirken (Şekil 2; P<0,05), serum total protein ve kolesterol düzeyinde tüm süre ve derişimlerde kontrole oranla herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 2; P>0,05). Serum glikoz düzeyindeki bu artış metal etkisinin yarattığı stres nedeniyle enerji gereksiniminin glikojenlisisin artması sonucunda oluşan glikozdan sağlanması ile açıklanabilir. Serum total protein ve

kolesterol düzeyinde değişimin olmaması sürenin kısa ve derişimin düşük olması ve stres kaynaklı gereken enerji gereksiniminin glikozdan sağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 2. TiO₂ NP'nin etkisinde *C. carpio*'da serum glukoz, total protein ve kolesterol düzeyleri.

SNK; a ve b ile gösterilen harfler derişimler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Figure 2. Impacts of TiO₂ NPs on serum glucose, total protein and cholesterol levels of *C. carpio*.

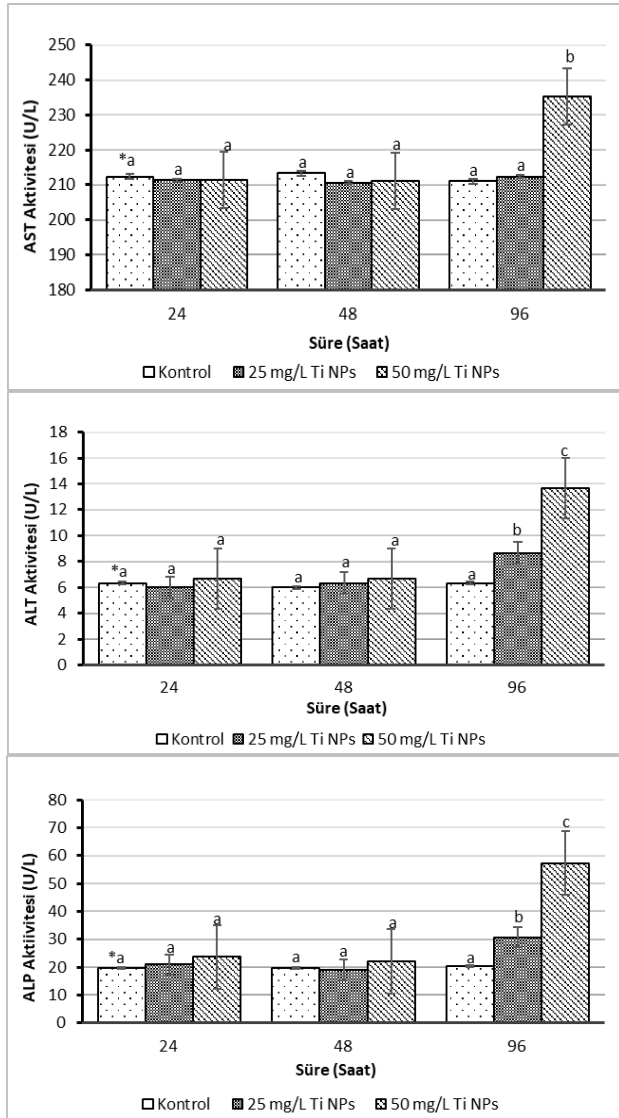
*=SNK; Letters a and b show differences between concentrations. Data shown with different letters are significant at the P<0.05 level.

Alkali fosfataz (ALP), alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) gibi serum enzimleri yoğun olarak karaciğerde bulunmaktadır ve hayvan türlerinin sağlık durumlarının belirlenmesinde kullanılan önemli serum parametreleri olarak kabul edilmektedir. ALP, alkalik pH değerinde bir transfosforilaz görevi yapan ve suda yaşayan hayvanların iskelet mineralizasyonunda

önemli rol oynayan çok işlevli bir enzimdir (Lan vd., 1995; Zikic vd., 2001). Buna ek olarak, iki önemli aminotransferaz olan, AST ve ALT, protein ve amino asit metabolizmasında yer alan en önemli enzimlerdir (Folmar, 1993). Bu enzimlerin kan serum düzeyleri, karaciğer hücrelerinin uğradığı yıkım düzeyini göstermektedir. Normal koşullarda, bu enzimlerinin kan serum düzeyleri düşüktür, ancak karaciğer dokularında yıkım olmuşsa, kan dolaşımına daha fazla salınmakta ve böylece kan serum düzeyleri yükselmektedir. Dolayısıyla bu enzimlerin aktivitelerindeki artış veya azalış doku yıkımının, çevresel stresin veya hastalıkların göstergesi olarak kullanılmaktadır (Kori-Siakpere vd., 2012).

Federici vd., (2007) titanyum dioksit nanopartiküllerinin 0,1, 0,5 ve 1 mg/L'lik derişimlerinin 14 günlük süreyle etkisinde *O. mykiss*'in dokularındaki birikim düzeylerini tespit etmişler ve karaciğer dokusunda tüm derişimlerde Ti birikiminde artış gözlenirken, solungaç ve kas dokusunda tüm derişimlerde herhangi bir değişim olmadığını belirtmişlerdir. Mansouri vd., (2016) TiO₂ nanopartikülünün 10 mg/L derişiminin 4 günlük süreyle etkisinde *C. carpio*'nun solungaç ve karaciğer dokusunda histopatolojik anomaliye neden olduğunu belirtmişlerdir. Hao vd., (2009) TiO₂ NP'nin 10 mg/L'lik derişimlerinin 8 günlük süreyle etkisinde *C. carpio*'da solungaç, karaciğer ve beyin dokusundaki SOD ve CAT enzim aktivitesini incelemişler ve bu enzimlerin karaciğer dokusundaki aktivitesinin diğer dokulara oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Wu vd., (2003) stres faktörlerinin etkisinde *Epinephelus areolatus* 'da serum AST ve ALT düzeyinin artış gösterdiğini ve bunu da karaciğer hasarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Metal etkisinde dokulardaki fizyolojik değişikliklerden dolayı serum ALP aktivitesinin artış gösterdiğini belirtilmiştir (Jiraungkoorskul vd., 2003). Kaviani vd., (2018) *Salmo trutta caspius*'da TiO₂ NP'nin akut etkisinde ALP aktivitesinin artış gösterdiğini belirtmişlerdir. *C. carpio* ile yürütülen bu çalışmada TiO₂ NP etkisinde serum AST, ALT ve ALP enzim aktivitesi her iki derişimde de 96 saatlik etki süresinde kontrole oranla önemli düzeyde artış göstermiştir (Şekil 3; P<0,05). Serum enzim aktivitelerindeki bu derişimlerin metal etkisinin karaciğer, böbrek ve solungaç gibi dokularda meydana gelen hasarlardan dolayı serumdaki düzeyinin arttığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak incelenen metalin etkisinde anılan türde incelenen parametrelerin değişikliklere neden olması, balıklarda meydana gelen değişikliklerin hızlı bir şekilde tespit edilmesine ve bu parametrelerin kirlilik belirteci olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 3. TiO₂ NP'nin etkisinde *C. carpio*'da serum serum AST, ALT ve ALP enzim aktiviteleri.

*SNK; a, b ve c ile gösterilen harfler derişimler arası ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0.05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

Figure 3. Impacts of TiO₂ NPs on serum serum AST, ALT and ALP enzyme activities of *C. carpio*.

*=SNK; Letters a, b and c show differences between concentrations. Data shown with different letters are significant at the P<0.05 level.

TEŞEKKÜR

Danışman Hocam Prof. Dr. Cahit ERDEM'e ve Titanyum dioksit nanopartikül karakterizasyonuna katkı sağlayan Harvard Üniversitesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Philip DEMOKRİTOU ve Dr. Georgios PYRGIOTAKIS'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, Gökhan ÇALYAN'a da teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

Abdel-Khalek, A.A., Badran, S.R. & Marie, M.S. (2020). The Effective Adsorbent Capacity of Rice

Husk to Iron and Aluminum Oxides Nanoparticles Using *Oreochromis niloticus* as a Bioindicator: Biochemical and Oxidative Stress Biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27**, 23159-23171.

Akkan, T., Yazicioglu, O., Yazici, R. & Yilmaz, M. (2018). Assessment of irrigation water quality of Turkey using multivariate statistical techniques and water quality index: Siddıklı Dam Lake. *Desalination and Water Treatment*, **115**, 261-270.

Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D. & Henry, T.B. (2013). Histopathological Effects of Waterborne Copper Nanoparticles and Copper Sulphate on the Organs of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, **126**, 104-115.

Amelia, M., Lincheneau, C., Silvi, S. & Credi, A. (2012). Electrochemical Properties of CdSe and CdTe Quantum Dots. *Chemical Society Review*, **41**, 5728-5743.

Bo, J., Wang, D.J., Li, T.L., Li, Y., Zhang, G., Wang, C. & Zhang, S.Q., (2015). Accumulation and Risk Assessment of Heavy Metals in Water, Sediments and Aquatic Organisms in Rural Rivers in the Taihu Lake Region, China. *Environmental Science & Pollution Research*, **22**, 6721-6731.

Brown, J.A. (1993). *Endocrine Responses to Environmental Pollutants*. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (eds.) *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, UK, 276-296.

Cicik, B. & Engin, K. (2005). The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*, **29**, 113-117.

Dietschy, J.M., Turley, S.D. & Spady, D.K. (1993). Role of Liver in the Maintenance of Cholesterol and Low Density Lipoprotein Homeostasis in Different Animal Species, Including Humans. *Journal of Lipid Research*, **34**, 1637-1659.

Dutta, H.M. & Haghghi, A.Z. (1986). Methylmercuric Chloride and Serum Cholesterol Levels in Blugill *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, **36**, 181-185.

Federici, G., Shaw, B.J. & Handy, R.D. (2007). Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill Injury, Oxidative Stress, and Other Physiological Effects. *Aquatic Toxicology*, **84**(4), 415-430.

Firat, Ö. & Kargın, F. (2010). Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, **58**, 151-157.

Folmar, L.C. (1993). Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A Bibliography and Synopsis of Selected Effects. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **12**, 337-375.

Hao, L., Wang, Z. & Xing, B. (2009). Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Science*, **21**, 1459-1466.

- Hasheesh, W.S., Marie, M.A.S., Abbas, H.H., Eshak, M.G. & Zahran, E.A. (2011).** An Evaluation of the Effect of 17 α -Methyltestosterone hormone on some biochemical, molecular and histological changes in the liver of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Life Science Journal*, 8(3), 343-358.
- Heydarnejad, M.S., Khosravian-Hemami, M., Nematollahi, A. & Rahnama, S. (2013).** Effects of copper at sublethal concentrations on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Review of Hydrobiology*, 98, 71-79.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. & Ackerman, P.A. (1999).** Heat shock proteins and physiological in fish. *American Zoologist*, 39, 901-909.
- Javed, M. & Usmani, N. (2015).** Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: A review. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 889- 900.
- Ji, C.L., Wang, Q., Wu, H.F., Tan, Q.G. & Wang, W.X. (2015).** A metabolomic investigation of the effects of metal pollution in oysters *Crassostrea hongkongensis*. *Marine Pollution Bulletin*, 90, 21-222.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Shaphong, S., Vichasri-Grams, S. & Pokethitiyook, P. (2003).** Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18, 260-267.
- Kaviani, F.E., Naeemi, A.S. & Salehzadeh, A. (2018).** Acute toxicity and effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) on some metabolic enzymes and hematological indices of the endangered Caspian trout juveniles (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(3), 1253-1267.
- Kori-Siakpere, O. & Ubogu, E. (2008).** Sublethal hematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclaris sp.* (Osteichthyes: Clariidae). *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 2068-2073.
- Lan, W.G., Wong, M.K., Chen, N. & Sin, Y.M. (1995).** Effect of combined copper, zinc, chromium, and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *Aquaculture*, 131, 219-230.
- Li, Z.H., Velisek, J., Grabic, R., Li, P., Kolarova, J. & Randak, T. (2011).** Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*, 83, 572-578.
- Mansouri, B., Maleki, A., Davari, B., Johari, S.A., Shahmoradi, B., Mohammadi, E. & Shahsavari, S. (2016).** Histopathological effects following short-term coexposure of *Cyprinus carpio* to nanoparticles of TiO₂ and CuO. *Environmental Monitoring & Assessment*, 188(575), 5-12.
- McDonald, M.D. & Grosell, M. (2006).** Maintaining osmotic balance with an aglomerular kidney. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 143, 447-58.
- Mutlu, C., Eraslan, Akkan. & B, Verep, B. (2018).** Water quality assessment of Harşit stream (Giresun, Turkey) using multivariate statistical techniques. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12B),9851-9858.
- Palma, P., Ledo, L. & Alvarenga, P. (2015).** Assessment of trace element pollution and its environmental risk to freshwater sediments influenced by anthropogenic contributions: The case study of alqueva reservoir (Guadiana Basin). *Catena*, 128, 174-184.
- Pretto, A., Loro, V.L., Silva, V.M.M., Salbego, J., de Menezes, C.C., Souza, C.F., Goda, C.R. & Baldissarotto, B. (2014).** Exposure to sublethal concentrations of copper changes biochemistry parameters in silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Quoy & Gaimard, 1824). *Bulletin Environmental Contamination & Toxicology*, 392-399.
- Ramesh, M., Senthil Kumaran, S., Kavith, C., Saravanan, M. & Mustafa, A. (2007).** Primary stress responses of common carp, *Cyprinus carpio* exposed to copper toxicity. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37, 81-85.
- Schaperclaus, W., Kulow, H. & Schreckenbach, K. (1992).** In: Fish Diseases, vol. 1. Rotterdam, Septicemia of Fish, *Fish Disease Leaflet*, 68, 1-24
- Shaheen, T. & Akhtar, T. (2012).** Assessment of Chromium Toxicity in *Cyprinus carpio* through Hematological and Biochemical Blood Markers. *Turkish Journal of Zoology*, 36, 682-690.
- Singh, H.S. & Reddy, T.V. (1990).** Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepatosomatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 20, 30-35.
- Singh, R.K. & Sharma, B. (1998).** Carbufuran induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide Science*, 53, 285-290.
- Tang, F., Li, L. & Chen, D. (2012).** Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advance Materials*, 24, 1504-1534.
- Tunçsoy, M. (2019).** Influence of copper oxide nanoparticles on some serum parameters of *Clarias gariepinus*. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, 4(3), 387-392.
- Uncumusaoglu A. & Akkan, T. (2017).** Assessment of water quality of Yağlıdere stream (Turkey) using multivariate statistical techniques. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(4), 1715-1723.
- Wang, S.L., Xu, X.R., Sun, Y.X., Liu, J.L. & Li, H.B. (2013).** Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A Review. *Marine Pollution Bulletin*, 76(1-2), 7-15.
- Wedemeyer, G.A. & Mcleay, D.J. (1981).** *Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors*. In Stress and Fishes. (Edited by Pickering, A.D.), 247-275.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K. & von Goetz, N. (2012).** Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products.

Environmental Science & Technology, **46**(4), 2242-50.

Wu, R.S., Pollino, C.A., Au, D.W., Zheng, D.W., Yuen, B. & Lam, P.K. (2003). Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) on food-borne exposure to benzo-a-pyrene. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **22**, 68-73.

Yang, J.L. & Chen, H.C. (2003). Effects of gallium on common carp (*Cyprinus carpio*): Acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology. *Chemosphere*, **53**, 877-882.

Zaghloul, K.H., Omar, W.A. & Abo-Hegab, S. (2006). Toxicity specificity of copper in some freshwater fishes. *Egyptian Journal of Zoology*, **47**, 383-400.

Zikic, R.V., Stajn, S., Pavlovic, Z., Ognjanovic, B.I. & Saicic, Z.S. (2001). Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiological Research*, **50**, 105-111.