

**TİTANYUMDİOKSİTİN KALP ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MESUT YARDIMCI**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
ŞUBAT- 2022**

# TİTANYUMDİOKSİTİN KALP ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MESUT YARDIMCI**

ORCID ID: 0000-0003-0203-9841

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA**

ORCID ID: 0000-0002-0342-8411

**MERSİN  
ŞUBAT- 2022**

## ÖZET

### TİTANYUMDİOKSİTİN KALP ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışmada titanyumdioksit nanopartikülünün sıçan kalp dokusu üzerine toksik etkileri incelenmiştir. Titanyumdioksit tıp, biyomedikal, diş hekimliği, tekstil, kozmetik, inşaat, gıda, hijyen ve temizlik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda ortalama 200-250 g ağırlığında, 21 adet erişkin erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Bu deney hayvanları her grupta 7 sıçan olacak şekilde rastgele 3 gruba bölünmüştür. 1. grup kontrol, 2. grup düşük doz, 3. grup ise yüksek doz deney grubu olarak belirlenmiştir. Titanyumdioksit nanopartikülünün (6-25 nm) düşük dozu 5 mg/kg, yüksek dozu 50 mg/kg belirlenmiş 2 farklı dozu 21 gün boyunca 48 saatte bir olmak üzere intraperitoneal olarak sıçanlara enjekte edilmiştir. Kontrol grubundaki sıçanlara ise intraperitoneal olarak, 21 gün boyunca 48 saatte bir olmak üzere serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra in vivo koşullarda, sıçanlara anestezi yapılmasının ardından elektrokardiyografi (EKG) kayıtları alınmıştır. Daha sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kalp dokusu çıkarılmıştır. Titanyumdioksit nanopartikülünün kalp üzerine toksik etkileri biyofiziksel, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılarak multidisipliner yaklaşımla incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Titanyumdioksit, Kalp, EKG, Oksidatif stres, Histopatolojik etki, Toksik etki, sıçan.

**Danışman:** Prof .Dr. Yusuf ÇAMLICA, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE TOXIC EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE ON THE HEART

In this study, the toxic effects of titanium dioxide nanoparticle on rat heart tissue were investigated. Titanium dioxide is widely used in medicine, biomedical, dentistry, textile, cosmetics, construction, food, hygiene and cleaning. In our study, 21 adult male Wistar albino rats with an average weight of 200-250 g were used. These experimental animals were randomly divided into 3 groups with 7 rats in each group. The 1st group was determined as the control group, the 2nd group as the low dose and the 3rd group as the high dose experimental group. Titanium dioxide nanoparticle (6-25 nm) was injected intraperitoneally into rats at 2 different doses determined as 5 mg/kg low dose and 50 mg/kg high dose every 48 hours for 21 days. The rats in the control group were injected intraperitoneally with physiological saline every 48 hours for 21 days. Electrocardiography (ECG) recordings were taken after in vivo anesthesia was applied to the rats 24 hours after the last application. Then the rats were sacrificed and the heart tissue was removed. Besides the electrophysiological effects of titanium dioxide nanoparticle on the ECG, histological and biochemical effects were also investigated. In this study, the toxic effects of titanium dioxide nanoparticle on the heart were investigated with a multidisciplinary approach using biophysical, biochemical and histological methods.

**Keywords:** Titaniumdioxide, heart, EKG, oxidative stress, histopathology, toxicological effect, rat.

**Advisor:** Prof. Yusuf ÇAMLICA, Mersin University Department of Biology, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Lisans ve özellikle yüksek lisansımın her aŐamasında bana özveri ve sabırla tüm desteklerini içtenlikle gösteren tez danışmanım çok değerli ve kıymetli hocam Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA' ya sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesi sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, ArŐ. Gör. CoŐar UZUN'a, Prof. Dr. SavaŐ AKTAŐ'a, Prof. Dr. Serap YALIN'a, Prof. Dr. Kasım OCAKOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Metin YILDIRIM'a emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her alanında her adımında koşulsuz daima yanımda olan sevgi ve desteklerini esirgemeyen canım aileme sonsuz minnettar ve teşekkür ediyorum.

Mesut YARDIMCI



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>3</b>
2.1. Titanyumdioksit Nanopartikülü	3
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi	5
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>7</b>
3.1. Kullanılan Cihazlar	7
3.2. Deney Hayvanları	7
3.3. Deney Gruplarının Hazırlanması	8
3.4. Deney Hayvanlarına Uygulanacak Enjeksiyonlar	8
3.5. TiO <sub>2</sub> Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Sıçanlara Uygulanması	8
3.6. Elektrofizyolojik Kayıtlar	9
3.6.1. Elektrokardiyografi (EKG) Kayıtları	9
3.7. Histopatolojik İnceleme	9
3.7.1. Elektron Mikroskopik Doku Takibi	9
3.8. Biyokimyasal İnceleme	10
3.8.1. Lipid Peroksidaz (MDA) Ölçümü	10
3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) Ölçümü	10
3.8.3. Katalaz (CAT) Ölçümü	11
3.8.4. Asetilkolinesteraz (AChE)Aktivitesi	11
3.9. İstatistiksel Analiz	11
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	<b>12</b>
4.1. Elektrofizyolojik Bulgular	12
4.2. Histopatolojik Bulgular	14
4.3. Biyokimyasal Bulgular	18
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>22</b>
KAYNAKLAR	23
ÖZGEÇMİŞ	26

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. Deney hayvanlarına uygulanan enjeksiyonlar	8
Tablo 4.1. Titanyum dioksidin sıçan EKG parametreleri üzerine etkileri	13
Tablo 5.1. Titanyumdioksid nanopartikülünün kalp dokusu üzerine biyokimyasal etkileri	19



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler	6
Şekil 4.1. Kontrol grubunda kalp kası hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	15
Şekil 4.2. Düşük doz grubunda kalp kası hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	16
Şekil 4.3. Yüksek doz grubunda kalp kası hücrelerinin ultrastrüktürel görüntüsü	17



## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz Enzimi
Np	Nanopartikül
°C	Santigrad derece
CAT	Katalaz
cm	Santimetre
GSHPx	Glutasyon Peroksidaz
EKG	Elektrokardiyografi
kg	Kilogram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
µm	Mikrometre
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
NO	Nitrik Oksit
XO	Ksantin Oksidaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
Apx	Askorbikasit Peroksidaz
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit dimutaz
Se	Selenyum

## 1. GİRİŞ

Nanopartikül (NP), boyutu 1-100 nm aralığında yer alan parçacıklar için kullanılan genel bir tanımlamadır. Maddeler nano boyutlara indirildiği zaman, makro boyutlardan çok daha farklı kimyasal, fiziksel veya biyolojik özellikler kazanırlar. Nanopartiküllerin, daha büyük boyutlu maddelerle karşılaştırıldığı zaman parçacık yüzey kimyası, elektron tutuculuğu, parçacık şekilleri, parçacık yüzey alanı, kristalleşebilme, manyetik ve optik ısı ve elektrik iletme özelliklerinde önemli ölçülerde artma veya azalma olmaktadır. Makro maddelerin küçülen boyutları ile bağlantılı olarak etkileşme yüzeylerinde artış meydana gelebilmektedir. Buna paralel olarak gerek yüzeyler arasındaki molekül sayısında, gerekse kuantum elektromanyetik etkileşim ve yüzey geriliminde artış meydana gelir. Bununla beraber, hacim ve şekil değişikliklerinden elektron özellikleri de etkilenebilir [1, 2]. Nanopartiküllerin son zamanlarda sanayide ve günlük hayatta giderek daha fazla artan oranlarda kullanıldığı bilinmektedir. Nanopartiküller günlük hayatta diş hekimliği, tıp, biyomedikal, askeriye, otomotiv sanayi, elektronik, gıda endüstrisi, boya sanayi, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda kullanılmaktadır [3].

Maddelerin gerek atomik gerekse moleküler düzeyde fonksiyonel mühendisliği yapılarak kullanılan nanoteknolojiden faydalanmak suretiyle, tekstilde kullanılmak üzere elde edilen nanopartiküller, kirlenmeyen kumaş yapımında, anti-mikrobiyal özellikler, koku giderici özellikler, vücut sıcaklığını düzenleme mekanizması, antistatik giysilerde kullanım, UV ışınlarından korunma, parfümlü giysiler, tıbbi koruyucu giysiler, elektromanyetik alanlara karşı özellikler geliştirilerek, giysilere konfor arttırıcı, koruyucu ve yaşamı kolaylaştırıcı gibi özellikler kazandırmak amacıyla tekstil ürünlerinde kullanılmaktadır [4].

Nanopartiküllerin buldukları kompleks yapıdan ayrılarak vücuda dermal, respiratuvar sistem ve oral yollarla girdiği bilinmektedir. Nanometreler boyutlarında olan bu parçacıkların, hücre zarı, plasenta, kan-beyin bariyeri ve kan-testis bariyeri gibi seçici geçirgen özellikteki yapıları geçerek hücre, doku, organ düzeyinde hasarlar oluşturduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [5, 6].

Güneş kremleri, diş macunları, gıda boyar maddeleri, tatlandırıcılar ve bazı besin takviyeleri gibi günlük hayatımızda kullandığımız birçok üründe titanyumdioksit nanopartikülünün bulunduğunu düşündüğümüz zaman bu nanopartikülün, doğrudan ağız yolu ile alınımının vahameti de bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bazı tatlı şekerlemelerin ve kullandığımız sakızların bile titanyumdioksit nanopartikülü taşıdığı görülmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), titanyumdioksit nanopartikülünün gıda

boyası olarak kullanılmasını, “vücut ağırlığının %1’ini geçmeyecek şekilde bulunması” şartı ile onaylamıştır. [7]

Bu çalışmada özellikle tekstil, gıda, tıp, biyomedikal, implant, inşaat alanında yaygın olarak kullanılan titanyumdioksit nanopartiküllerinin, sıçan kalbi üzerine olan etkileri elektrofizyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler kullanılarak multidisipliner bir yaklaşımla incelenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Titanyumdioksit Nanopartikülü

Titanyum, doğada en çok bulunan elementlerden birisi olup oldukça fazla yayılım gösteren bir özelliğe sahiptir. Dünyamızın kabuğunda bulunma konsantrasyonu 4400 mg/kg'dır. Bu elementin, gerek oksijene gerekse diğer elementlere olan yüksek ilgisinden dolayı, doğada serbest olarak bulunmaz. En fazla oksijenle aldığı değerlik +4'tür. Fakat, oksijenle +3 ve +2 değerlikli durumları da karşımıza çıkabilmektedir. Sanayide en fazla metalik titanyum, titanyumdioksit ve titanyumtetraklorür tercih edilmektedir. titanyumdioksit, metalik titanyumun oksijenle tepkimesiyle meydana gelmektedir. Oda sıcaklığında moleküler ağırlığı; 79,9 g/mol, bağıl yoğunluğu; 4,26 g/cm<sup>3</sup>, kaynama noktası; 2972 °C, erime noktası ise; 1843 °C şeklindedir. Işığı iyi bir şekilde kırmasından ve yüksek parlaklığından dolayı titanyumdioksit, beyaz renk elde etmek için kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak titanyumdioksit en çok üretilen nanopartiküller arasında ilk beştedir. Normal bir hayvan hücresinde çok az miktarda da olsa titanyum bulunmaktadır. Günlük hayatımızda ortalama, vücudumuza 300-400 µg titanyumu alırız. İnsanların, bu miktarlardaki titanyumu vücuda alması, hem üretim hem de kullanım sırasında gerçekleşebilir. Fakat, titanyum vücut içerisine en fazla inhalasyon ve dermal olarak girmektedir. Bunların yanı sıra titanyumdioksit nanopartikülü vücudumuza ağız yolu ve medikal uygulamalarla girebilmektedir. Solunum yoluyla en fazla titanyumdioksit nanopartikülüne maruz kalanlar arasında bunları üreten bilim insanları ve işçiler yer almaktadır. Üretim sahasında çalışanlar, orta ve yüksek düzeyde titanyumdioksit nanopartikülüne maruz kalabilmektedirler. Titanyumdioksit nanopartikülü, medikal alanda, damar içine ve deri altına yapılan enjeksiyonlar ile vücut içerisine girebilmektedir. İnsan sağlığı üzerine olumsuz etkilere neden olabilen bu tür uygulamalar nanopartiküllerin vücutta birikmesine de sebep olabilmektedir [7].

Titanyumdioksit nanopartikülünün intranasal yol ile damlatılmasıyla sıçanların beyinde gerek olfaktör gerekse hipokampal sinirlerin morfolojisini değiştirerek oksidatif hasara neden olduğu ortaya çıkarılmıştır [8, 9]. Silisyumdioksit nanopartikülünün yaşlı sıçanlara inhalasyon yolu ile verilen bir çalışmada bu sıçanların kalp dokusunda miyokardiyal iskemik hasar meydana geldiği gözlenmiştir [10]. Titanyumdioksit nanopartikülünün inhalasyon yolu ile sıçanlara verildiği diğer bir çalışmada bu nanopartikülün mikrovasküler disfonksiyona neden olduğu bulunmuştur [11].

Farelere intragastrik aparat ile 60 gün boyunca her gün uygulanan 5, 10 ve 50 mg/kg dozlarındaki titanyumdioksit nanopartikülü, enzim ve nörotransmitter sistemi inhibe etmiş homeostazis üzerine olumsuz etkisi olmuş ve hafıza yetisinde azalmalara sebep olmuştur [12]. Titanyumdioksit nanopartikülünün 5, 10, 50 ve 150 mg/kg dozlarını 14 gün boyunca her gün

olmak üzere farelerin abdomen boşluğuna verildiği bir çalışmada, malondialdehit (MDA), hidrojenperoksit ( $H_2O_2$ ) düzeyinde artış olduğu, lipid peroksidasyon sisteminin olumsuz etkilendiği, katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx), askorbik asit peroksidaz (APx) gibi antioksidan enzim aktivitelerinde doza ve uygulama süresine bağlı azalma olduğu beyinde ise hasar olduğu bulunmuştur [13].

Boyutları 25 ve 80 nm olarak hazırlanan titanyumdioksit nanopartiküllerinin 5 g/kg'lık dozu oral yolla farelere uygulandığında, bu nanopartiküllerin önce sindirim sistemine, oradan karaciğer, dalak, böbrek ve akciğere taşındığı, alanin aminotranferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) gibi biyokimyasal parametrelerin olumsuz etkilendiği, 25 nm partikül uygulanan 2 dişi ve 80 nm partikül uygulanan 1 dişi farenin hareket kabiliyetini kaybettiği ve bunların 2 gün içerisinde öldüğü raporlanmıştır [14]. İntraartikular enjeksiyon yolu ile sıçanlara verilen 0,2, 2 ve 20 mg/kg dozlarındaki titanyumdioksit nanopartiküllerinin bu hayvanlarda, oksidatif stres nedeniyle kalp, karaciğer ve akciğerde histopatolojik değişiklikler meydana getirdiği tespit edilmiştir [15]. İn vitro koşullarda karbon ve titanyumdioksit nanopartiküllerinin 0,25, 2,5, 25 ve 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dozlarında natal sıçan kalp kası üzerine uygulandığı araştırmada ise, kalp hücre fonksiyonlarının olumsuz etkilendiği, miyofibrillerdeki yapısal organizasyonun bozulduğu ve reaktif oksijen türlerinin arttığı rapor edilmiştir [16]. Sprague-Dawley sıçanlardan izole edilen beyin kültürü üzerine 20-60 nm boyutlarındaki  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , HAP ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerinin uygulandığı bir diğer çalışmada ise, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 sekresyonunun önemli biçimde arttığı ve nanopartiküllerin tamamının sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir [17]. Sıçanlara 0,5, 5 ve 50 mg/kg dozlarında intratrakeal damlatma yoluyla uygulandığı 5, 21 ve 50 nm boyutlarındaki titanyumdioksit nanopartikülünün, akciğer dokusunda histopatoloji meydana getirdiği ve kan biyokimyasal parametrelerini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir [18]. Titanyumdioksit nanopartiküllerinin 3 nm boyutlarında sentezlendikten sonra 0,4, 4 ve 40 mg/kg dozlarında hazırlanarak farelere intratrakeal damlatma yoluyla uyguladığı başka bir çalışmada, bu nanopartiküllerin akciğer dokusunda biriktiği ve akciğer dokularında patolojik lezyonlar olduğu gözlenmiştir [19]. Titanyumdioksit nanopartikülü ile kaplanmış oral implant yüzeyin etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada bu nanopartikülün dişi albino sıçanların (*Rattus rattus*) siyatik siniri aksiyon potansiyeli genliğini azalttığı fakat bu azalmanın istatistiksel bakımdan önemli olmadığı tespit edilmiştir [20, 21]. Fareler üzerine 1 ve 10  $\text{mg}/\text{m}^3$  dozlarında titanyumdioksit nanopartikülünün inhalasyon yoluyla uygulandığı bir araştırmada, inflamatuvar cevaba bağlı akciğer dokusunda histolojik ve yapısal farklılıklar bulunmuştur [22]. Sıçanlara titanyumdioksit nanopartikülünün 2 ve 7  $\text{mg}/\text{m}^3$  dozlarının yine inhalasyon yoluyla uygulandığı diğer bir çalışmada ise, akciğer dokusunda oksidatif hasara bağlı sitotoksisite geliştiği tespit edilmiştir [23].

Literatür verileri ışığında, nanopartiküllerin beyinde oksidatif hasar meydana getirdiği [8, 9, 24 - 27], nörotransmitter sistemi etkileyerek beyinde histopatolojik tahribat oluşturduğu [12,13,17,28,29], kalp, akciğer, karaciğer, dalak gibi organlarda oksidatif strese neden olarak doku harabiyetine yol açtığı [14-17] birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Nanopartiküllerin periferik sınırlar üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada ise, sinir aksiyon potansiyeli parametrelerinden iletim hızı ve genlik ölçülmüş ve etkileri tespit edilmiştir [20].

Diğer bir çalışmada, 50 nm titanyumdioksit nanopartikülleri yeni doğmuş Wistar sıçanların beyinlerinden izole edilen astrositlere uygulanmış, bu nanopartiküllerin yüksek oksidant özellik göstererek, astrositlerde oksidatif strese ve bununla bağlantılı olarak mitokondriyal hasara sebep olduğu bulunmuştur [29].

Titanyumdioksit nanopartiküllerinin üç haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlara 90 gün boyunca 50 mg/kg dozunda günde 1mL'lik hacimde oral gavaj ile uygulandığı bir çalışmada, 5 haftanın sonunda nanopartikül uygulanan sıçanlarda kontrol gurubuna göre kilo kayıplarının yanı sıra, bu nanopartiküllere maruz kalan sıçanların aminoasit metabolik yollarının değiştiği, antioksidan enzim aktivitesinde azalma meydana geldiği ve oksidatif strese bağlı doku hasarı oluştuğu bulunmuştur [30].

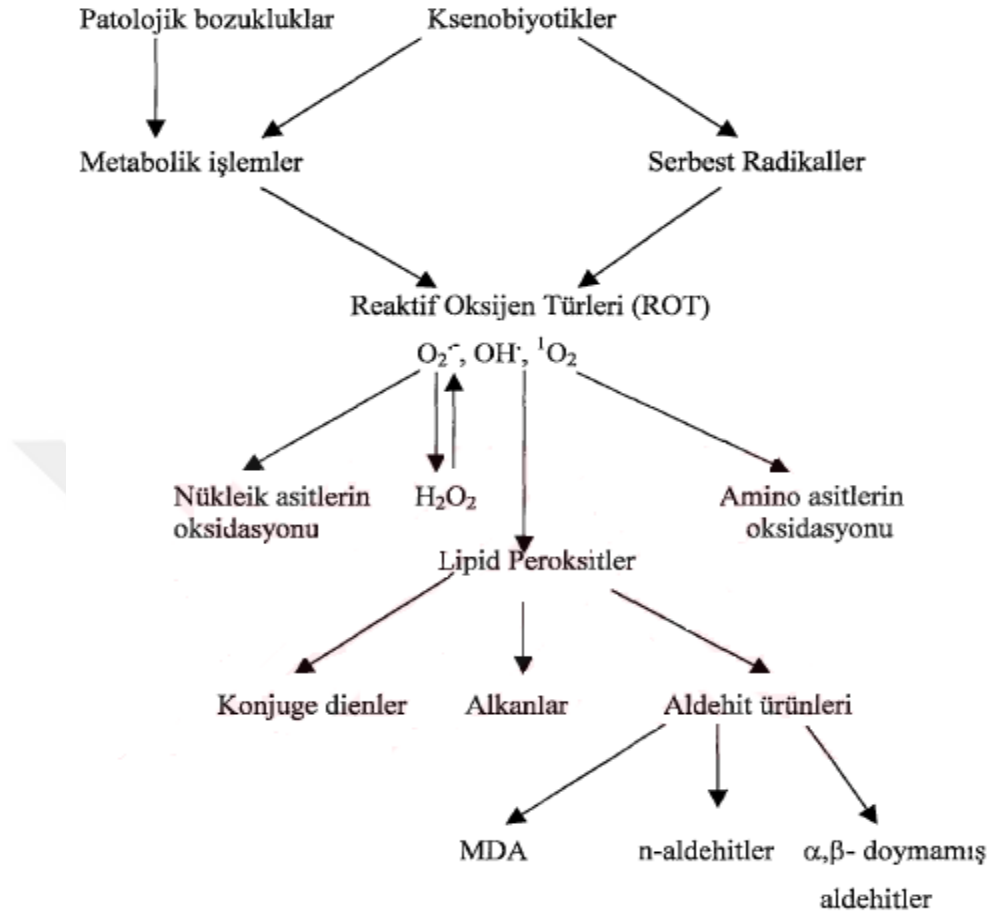
Erkek İsviçre albino farelerin periton içine 21 nm boyutundaki titanyumdioksit nanopartikülünün 45 günlük enjeksiyonu ile kurgulanan bir çalışmada, farelerin karaciğer fonksiyon enzimlerinde ve oksidatif stres enzimlerinin olumsuz etkilendiği, aynı zamanda kromozomal anormalliklerin de meydana geldiği tespit edilmiştir [31].

Sprague Dawley sıçanlar üzerine titanyumdioksit nanopartiküllerinin etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, nanopartikül uygulanan grupta kontrol gruplarına göre lipit peroksidasyon (LPO) ve karaciğer enzimlerinin büyük ölçüde arttığı, testosteron ve antioksidan enzim seviyelerinde önemli ölçüde azalmaların meydana geldiği, histopatolojik olarak da nanopartikül uygulanan sıçanlarda damar tıkanması ve hepatik sinüzoidlerin genişlemesi oluştuğu bulunmuştur [32].

## **2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi**

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektron taşıyan atom ya da moleküllerdir. Bu elektronun eşlenme eğilimi, serbest radikalleri çok fazla reaktif hale getirir ve diğer moleküllerle hızlı bir şekilde tepkimeye girmesine neden olur [33]. Bu reaktif türlere süperoksit ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH^-$ ), tiyil (RS), nitrik oksit (NO) ve triklorometil gibi örnekler verilebilir. Serbest radikaller organizmalarda gerek iç gerekse dış kaynaklı olarak meydana gelebilirler. Oksijenli solunum, oksidan enzimler, fagositik hücreler, otooksidasyon tepkimeleri ve yaşlanma iç kaynaklara, ksenobiyotikler, ilaçlar, alkol, sigara, uyuşturucu maddeler ise dış kaynaklara örnek olarak verilebilir [34]. Pestisitlerin normal standartlardan çok daha fazla

kullanılması da bu reaktif türlerinin düzeyini arttırmaktadır [35]. Serbest radikaller nükleik asitler, lipitler, proteinler gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olarak çeşitli düzeylerde canlılara zarar vermektedir.



**Şekil 2.1.** Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler [36]

Proteinlerin yapısına zarar vermeleri, enzimleri inaktive etmeleri, DNA'da hasara neden olmaları, oksijenli solunumu bozmaları, hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişikliklere yol açmaları, dokularda fagositozu arttırmaları, serbest radikallerin zararlı etkileri arasında sayılabilir. Bunların yanı sıra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de, bir radikal olmamakla beraber, benzer toksik etkilere neden olmaktadır [37].

Serbest radikal oluşumunu azaltma yoluyla oksidatif stresi baskı altına alan maddeler ise antioksidan olarak tanımlanırlar [38]. Antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ve selenyum (Se), glutatyon (GSH), vitamin A, C, ve E gibi enzim olmayan antioksidanları kapsamaktadır. Antioksidan olarak tanımlanan bu savunma sistemi içerdiği antioksidanlarla serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini detoksifiye eder [39].

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Cihazlar**

BİOPAC MP100 A kayıt sistemi  
Transmisyon elektron mikroskobu  
Analitik terazi  
Distile su cihazı (Millipore)  
Etüv  
Homojenizatör  
Manyetik karıştırıcı  
Otomatik pipet  
Ph metre  
Santrifüj  
Ultramikrotom  
UV spektrofotometre  
Vorteks

#### **3.2. Deney Hayvanları**

Çalışmada Mersin Üniversitesi (MEÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanan Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların bakımları ile doz enjeksiyon çalışmaları, MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları için, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 16.12.2020 tarih ve 52602694-622.03 sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır. Sıçanlara yapılan tüm işlemlerde National Institutes of Health (NIH) tarafından hazırlanan laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanım rehberinde belirtilen kriterler uygulanmıştır. Sıçanlar, adaptasyon ve deney süresince standart deney koşullarında (% 40-60 nem,  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık) tutulmuşlardır. Tüm çalışma gruplarında 2-3 aylık sıçanlar (250-300 g) kullanılmıştır. Sıçanlar deneyler süresince 25x35 cm. ebatlarında üstten çelik ızgara ile kapatılmış plastik kafeslerde dörderli gruplar olacak şekilde tutulmuş, standart sıçan yemi (ad libitum) ve çeşme suyu ile beslenmiş, hergün kafesleri temizlenerek yem ve suları değiştirilmiştir.

### 3.3. Deney Gruplarının Hazırlanması

Deney hayvanları rastgele olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır; 1. Grup; kontrol, 2. grup; düşük doz grubu, 3. grup; yüksek doz grubu. Titanyumdioksit nanopartikülleri %0.5'lik hidroksipropil metil selüloz (HPMC-hydroxypropyl methyl cellulose) içerisinde dilüe edilerek 5 ve 50 mg/kg dozlarında hazırlanmıştır (14, 16). 6-25 nm boyutlarındaki titanyumdioksit nanopartiküllerinin düşük dozu 5 mg/kg ve yüksek dozu 50 mg/kg olmak üzere 2 farklı dozu 21 gün boyunca 48 saatte bir olmak üzere sıçanlara intraperitoneal olarak verilmiştir. Kontrol grubundaki sıçanlara ise intraperitoneal olarak, 21 gün boyunca 48 saatte bir olmak üzere serum fizyolojik verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra in vivo koşullarda, elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak EKG kayıtları alınmıştır. Sıçanlar 75 mg/kg ketamin ve 15 mg/kg ksilazin ile anestezi altına alınmış daha sonra sakrifiye edilerek, kalp dokusu izole edilmiştir. Titanyumdioksit nanopartiküllerinin doza bağlı olarak, elektrofizyolojik etkilerinin yanı sıra histopatolojik ve biyokimyasal etkileri de araştırılarak, kalp dokusunda meydana gelen oksidatif hasar da incelenmiştir.

### 3.4. Deney hayvanlarına uygulanan enjeksiyonlar

**Tablo 3.1.** Deney hayvanlarına uygulanan enjeksiyonlar

Adı	Dozu	Hacmi	Veriliş Yolu	Veriliş Sıklığı	Etki Süresi
6-25 nm TiO <sub>2</sub> düşük doz (5 mg/kg)	1 mg/ml	1 mL	İntraperitoneal	1x1	21 gün
6-25 nm TiO <sub>2</sub> yüksek doz (50 mg/kg)	10 mg/ml	1 mL	İntraperitoneal	1x1	21 gün
Serum fizyolojik (Kontrol grubu)	%0.9 NaCl	1 mL	İntraperitoneal	1x1	21 gün
Ketamin (Anestezik ajan)	75 mg/kg	0,9 mL	İntramusküler	Tek doz	
Ksilazin (Anestezik ajan)	15 mg/kg	0,1 mL	İntramusküler	Tek doz	

### 3.5. TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin hazırlanması ve sıçanlara uygulanması

Titanyumdioksit nanopartikülleri Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MEİTAM) hazırlanmıştır. Titanyumdioksit nanopartiküllerinin sentezi daha önce literatürde yer alan "Titanyumdioksit Nanopartiküllerinin İki Fazlı Yöntemle Termal Sentezi" yöntemine dayanılarak yapılmıştır (40, 41). Tipik bir nanopartikül sentezinde teflon kaplı paslanmaz çelikten bir otoklav içerisinde *tert*-bütilamin ve su karıştırılır. Başka bir kaptaki titanyum (IV) propoksit ile stearik asidin toluendeki karışımı hazırlanır ve yine otoklav içerisine ilave edilir. Otoklav kapatılarak karışım 16 saat boyunca 180 °C'de ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulur. Yüzeyi stearik asitle modifiye edilen titanyumdioksit

nanopartiküller, ortama asetonitril ilavesiyle çöktürülür ve süzülerek ortamdaki alınır. Böylece titanyumdioksit nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu tamamlanmış olmaktadır. Elde edilen 6-25 nm boyutlarındaki titanyumdioksit nanopartiküller %0.5'lik hidroksipropil metil selüloz (HPMC-hydroxypropyl methyl cellulose) içerisinde dilüe edilerek 5 ve 50 mg/kg dozlarında hazırlanmıştır. Bu nanopartiküller deney gruplarındaki sıçanlara intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verilmiştir.

### **3.6. Elektrofizyolojik Kayıtlar**

#### **3.6.1. Elektrokardiyografi (EKG) Kayıtları**

Elektrokardiyografi (EKG) kayıtları, 21 günün sonunda sıçanlara anestezi yapılmasını takiben, invaziv girişim gerektirmeyen EKG cihazı ile kayıtlanmıştır. Elektrokardiyogramlar, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Laboratuvarında bulunan BIOPAC MP 100 veri toplama sistemi (Santa Barbara, USA) kullanılarak alınmıştır. Sağ kola negatif, sol kola pozitif ve sağ ayağa toprak gelecek şekilde (Derivasyon I) yerleştirilen yüzeyel elektrotlar ile EKG kayıtları alınmıştır. Sıçanların EKG parametrelerinden P dalgasının süresi, P dalgasının genliği, QRS kompleksinin süresi (Q dalgasının başlangıcı ve S dalgasının sonu arasındaki aralık), R dalgasının genliği, T dalgasının süresi, T dalgasının genliği, QT aralığının süresi (Q dalgasının başlangıcı ve T dalgasının sonu arasındaki aralık) ve kalp hızındaki değişiklikler belirlenmiştir.

### **3.7. Histopatolojik İnceleme**

#### **3.7.1. Elektron Mikroskopik Doku Takibi**

Elektron mikroskopik incelemeler için alınan 1mm<sup>3</sup> büyüklüğündeki kalp dokuları %2,5'lik gluteraldehit çözeltisinde 4-6 saat tespit edilmiştir. Dokular daha sonra fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile yıkanmış ve aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlanmıştır.

1. %1'lik osmium tetraoksit	1 saat
2. PBS ile yıkama	3x5 dakika
3. % 50 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
4. % 60 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
5. % 70 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
6. % 80 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
7. % 96 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
8. % 100 Etil alkol	15 dakika (4 °C)

9. % 100 Etil alkol	15 dakika (4 °C)
10. %100 Etil alkol	15 dakika (25 °C)
11. Propilen oksit	15 dakika (25 °C)
12. Propilen oksit	15 dakika (25 °C)
13. Propilen oksit + Epoksi rezin	30 dakika (25 °C)
14. Propilen oksit + Epoksi rezin	30 dakika (25 °C)
15. Epoksi rezin	16-24 saat (25 °C)

Bu işlemlerden sonra dokular epoksi rezin içine (Electron Microscopy Sciences® katalog no:13940) gömülmüş ve 60 °C'lik etüvde 18 saat süreyle polimerize edilmiştir. Elde edilen bloklardan ultramikrotom (Leica® Ultracut UCT125, Leica Avusturya-Viyana) ile 70 nm kalınlığında kesitler, 300 gözenekli bakır gridlere alınmıştır. Alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. Kontrastlama işlemi için;

1. Uranil asetat	5 dakika
2. Distile su ile yıkama	
3. Kurşun sitrat	5 dakika
4. Distile su ile yıkama	

Kontrastlanan kesitler transmisyon elektron mikroskobu (JEM-1011; JEOL Ltd, Tokyo, Japan) ile incelenmiş ve mikroskoba eklenmiş dijital kamera (Megaview III, Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanmıştır.

### **3.8. Biyokimyasal İnceleme**

#### **3.8.1. Lipid peroksidasyon ölçümü**

Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) ile tiyobarbitürük arasındaki reaksiyon sırasında oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu çalışma için Cayman TBARS deney kiti kullanılacaktır.

#### **3.8.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi**

Ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikalinin tayini prensibine dayanır. Oluşan radikaller tetrazolium tuzu ile kırmızı renkli formazon boyayı oluşturur. SOD

aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyonu ile ölçülür. Enzimin ürettiği %50 inhibisyon bir ünite enzim aktivitesine denk gelir. Bu çalışma için Cayman SOD deney kiti kullanılacaktır.

### **3.8.3. Katalaz aktivitesi**

Katalaz hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) suya ve moleküler oksijene yıkar. Deney katalazın  $H_2O_2$  varlığında metanol ile reaksiyon oluşturması prensibine dayanmaktadır. Bu çalışma için Cayman katalaz deney kiti kullanılacaktır.

### **3.8.4. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi**

Asetilkolinesteraz, asetiltiyokolinin tiyokolin ile asetata parçalanması reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. AChE aktivitesi, tiyokolin ile DTNB arasındaki reaksiyonun sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin verdiği sarı rengin yoğunluğunun, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlenmektedir **(40)**.

## **3.9. İstatistiksel Analiz**

Sürekli yapıda elde edilen ölçümlerin her grup için normal dağılım kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Veriler normal dağılıma uygun ise, tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart hata, normal dağılıma sahip değil ise, medyan ve quartiller verilmiştir. Grupların istatistiksel karşılaştırmasında veriler normal dağılıma uygun ise, One Way Anova, normal dağılmıyorsa Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde IBM SPSS 26 paket programı kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık olarak ( $P<0.05$ ) alınmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Elektrofizyolojik Bulgular

Düşük doz ve yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülünün, sıçan elektrokardiyografisi parametrelerinden P dalgasının süresi ve P dalgasının genliği üzerine etkileri incelendiği zaman, kontrol gruplarına göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Benzer şekilde düşük doz ve yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülünün QRS kompleksinin süresi ve T dalgasının genliği üzerine etkileri incelendiği zaman, kontrol gruplarına göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ) (**Tablo 4.1**). Düşük doz titanyumdioksit nanopartikülü R dalgasının genliğini kontrol grubuna anlamlı olmayacak şekilde arttırmış, yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülü ise, yine anlamlı olmayacak şekilde azaltmıştır ( $P>0.05$ ). Düşük doz titanyumdioksit nanopartikülü ile yüksek doz karşılaştırıldığında ise, yüksek dozun R dalgasının genliğini düşük doza göre istatistiksel olarak önemli biçimde azalttığı tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ) (**Tablo 4.1**). Düşük doz titanyumdioksit nanopartikülü R dalgasının genliğini, kontrol grubuna göre arttırmakla beraber bu artış anlamlı değildir ( $P>0.05$ ). Düşük doz titanyumdioksit nanopartikülünün T dalgasının süresi üzerine etkileri incelendiği zaman, kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülü ise, T dalgasının süresini hem kontrol grubuna göre hem de düşük doz grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır ( $P<0.05$ ). Düşük doz ve yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülü Q-T aralığının süresini kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttırmıştır ( $P<0.05$ ). Yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülünün kalp hızı üzerine etkileri incelendiği zaman, hem kontrol grubu hem de düşük doz grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Bununla beraber düşük doz titanyumdioksit nanopartikülü kalp hızını kontrol grubuna göre önemli biçimde azaltmıştır ( $P<0.05$ ) (**Tablo 4.1**).

**Tablo 4.1. Titanyum dioksitin sıçan EKG parametreleri üzerine etkileri**

Gruplar	Kontrol (n=7)	Düşük doz (n=7)	Yüksek doz (n=7)
Parametreler	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
P dalgasının süresi (s)	0.022±0.002 a	0.021±0.003 a	0.019±0.003 a
P dalgasının genliği (mV)	0.026±0.002 a	0.023±0.002 a	0.022±0.003 a
QRS kompleksinin süresi (s)	0.024±0.002 a	0.028±0.001 a	0.026±0.002 a
R dalgasının genliği (mV)	0.381±0.031 ab	0.449±0.033 a	0.262±0.073 b
T dalgasının süresi (ms)	0.026±0.002 a	0.027±0.002 a	0.041±0.004 b
T dalgasının genliği (mV)	0.036±0.005 a	0.037±0.005 a	0.052±0.007 a
Q-T aralığının süresi (ms)	0.023±0.001 a	0.028±0.001 b	0.031±0.002 b
Kalp hızı (beats/min)	228.11±10.08 a	185.75±5.43 b	208.87±8.55 ab

$\bar{X} \pm s\bar{x}$ : Aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata

\*; a ve b gruplar arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde farklılık bulunmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, 20-60 nm boyutlarındaki titanyumdioksit, silisyumdioksit, demiroksit ve hidroksilapatit nanopartiküllerinin Sprague-Dawley sıçanlardan izole edilen beyin kültürü üzerine uygulandığı çalışmada, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 salgısının önemli biçimde arttığı, aynı zamanda bu nanopartiküllerin beyin hücreleri üzerine sitotoksik etki yaptığı rapor edilmiştir [17]. Titanyumdioksit nanopartikülünün burundan damlatma yoluyla sıçanlara verildiği diğer bir çalışmada, sıçan beyninde olfaktör ve hipokampal sinirlerin morfolojisinin değiştiği ve oksidatif hasar meydana geldiği tespit edilmiştir [8, 9].

Diğer bir çalışmada, 50 nm titanyumdioksit nanopartikülleri yeni doğmuş Wistar sıçanların beyinlerinden izole edilen astrositlere uygulanmış, bu nanopartiküllerin yüksek oksidant özellik göstererek, astrositlerde oksidatif strese ve bununla bağlantılı olarak mitokondriyal hasara sebep olduğu bulunmuştur [29].

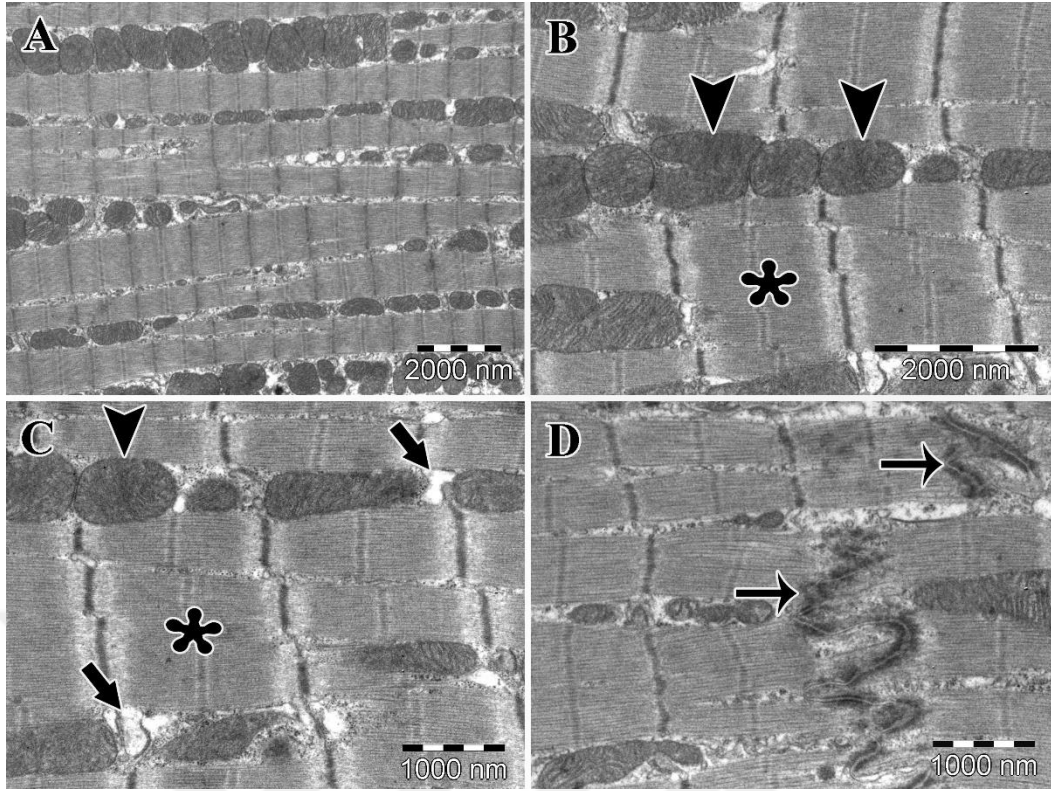
EKG ölçümlerinde, T dalgası kalbin ventrikülünün repolarizasyonunu gösterir [42, 43]. Yapılan elektrokardiyografik ölçümlere göre, titanyumdioksit nanopartikülünün yüksek dozunun, T dalgasının süresini hem kontrol grubuna göre hem de düşük doz grubuna göre anlamlı biçimde arttırması, kalpte koroner tıkanıklığa işaret etmektedir [42, 43]. Bunun yanı sıra T dalgası değişiklikleri gerek hiperkalemi gerekse miyokardiyal iskemi ile de ilişkilendirilebilmektedir. Ayrıca, titanyumdioksit nanopartikülünün her iki dozunun T dalgasının süresini uzatmakla birlikte, sadece yüksek dozdaki etkinin anlamlı olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bunlara ek olarak titanyumdioksit nanopartikülünün her iki dozunun da kontrol grubuna göre, Q-T dalgasının süresini uzatması Q-T uzaması sendromu ile de ilişkilendirilir [44]. Aynı zamanda, titanyumdioksit nanopartikülünün düşük dozunun kontrol grubuna göre, kalp hızını anlamlı bir şekilde azaltması kalbin pompalama gücünün azaldığına işaret eder [42, 43].

EKG ölçümlerinde, R dalgası ise kalbin ventrikülünün depolarizasyonunu gösterir. Bulgularımızda yüksek doz titanyumdioksit nanopartikülünün R dalgasının genliğini düşük doza göre istatistiksel olarak önemli biçimde azalttığı tespit edilmiştir. Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulaması sonucunda kalp hızının azalması, R dalgasının genliğinin azalması, T dalgasının ve Q-T dalgasının sürelerinin uzaması, bu nanopartikülün kalp üzerine toksik bir etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir [42].

Elektrofizyolojik olarak elde ettiğimiz bütün bu bulgular titanyumdioksit nanopartikülünün memeli kalbinin ritmik karakteristiklerini değiştirdiğini göstermektedir [43]. Bu nedenlerden dolayı titanyumdioksit nanopartikülü, endüstride dikkatli biçimde kullanılmalıdır.

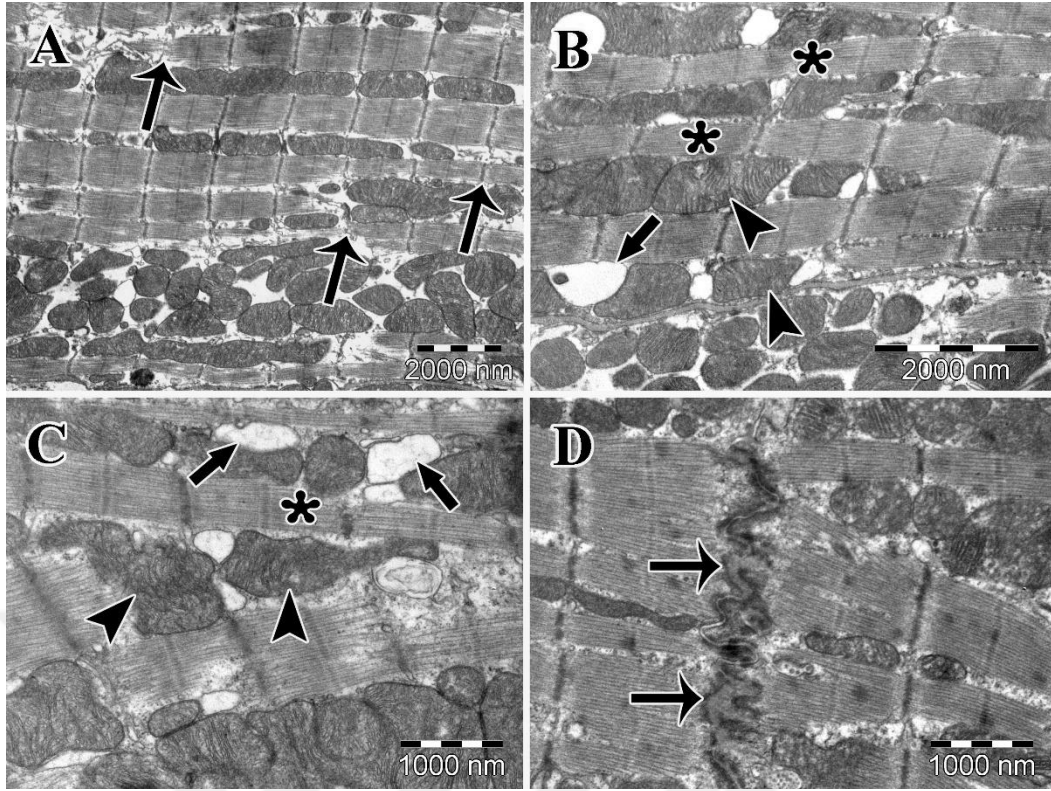
#### **4.2. Histopatolojik Bulgular**

Kontrol grubuna ait kalp dokuları incelendiği zaman kalp kası hücrelerindeki miyofibrillerin düzenlenişinin ve kalınlıklarının normal yapıda olduğu, miyofibrillerdeki aktin ve miyozin miyofilamentlerinin normal dizilim gösterdiği ve miyofibrillerdeki bantlaşmanın da (A bandı, I bandı, Z çizgisi) normal olduğu gözlemlenmiştir. Miyofibrillerin arasında yerleşim gösteren mitokondriyonların ve sarkoplazmik retikulumların normal yapıda olduğu izlenmiştir. Ayrıca kalp kası hücreleri arasında bulunan diskus interkalarisler de normal yapıda olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.1**).



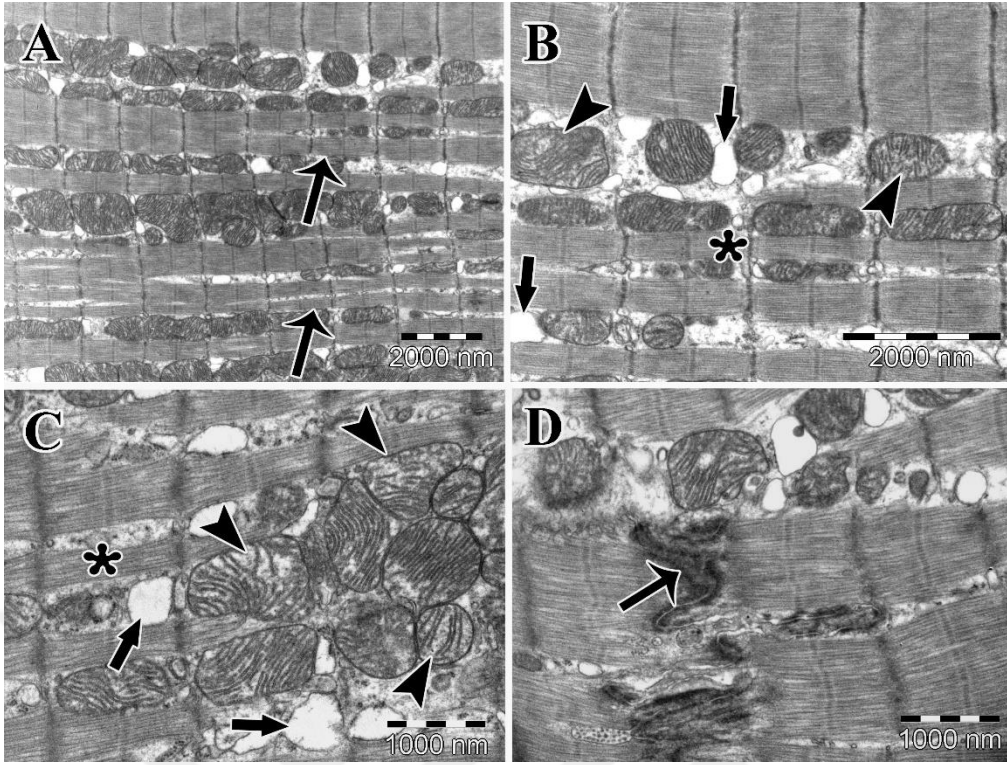
**Şekil 4.1.** Kontrol grubunda kalp kası hücresinin ultrastrüktürel görüntüsü. (A) Normal yapıda kalp kası hücresi. (B, C) Normal yapıda miyofibriller (asteriskler), mitokondriyonlar (ok başları), sarkoplazmik retikulumlar (kalın oklar). (D) Normal yapıda diskus interkalaris (ince oklar). (Büyütme: A; X10000, B; X20000 C ve D; X25000 uranil asetat-kurşun sitrat).

Titanyumdioksit nanopartikülünün düşük doz grubunda, normal yapıdaki miyofibrillerin arasında yer yer incemiş ve dejenere olmuş miyofibriller görülmüştür. Bazı alanlarda mitokondriyonların membran ve krista yapılarının bozulduğu, sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemelerin olduğu saptanmıştır. Diskus interkalarislerde ise bazı bölgelerde hücreler arası bağlantı komplekslerinin birbirinden uzaklaştığı ve hücreler arası mesafelerin genişlediği gözlenmiştir (**Şekil 4.2**).



**Şekil 4.2.** Düşük doz grubunda kalp kası hücresinin ultrastrüktürel görüntüsü. (A) Kalp kası hücresi miyofibrillerinde incelleme ve dejenerasyon (oklar). (B, C) İncelmiş miyofibriller (asteriskler), dejenere olmuş mitokondriyonlar (ok başları), genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları (kalın oklar). (D) Diskus interkalarisde hücreler arası bağlantı kompleksleri arasında genişlemeler (ince oklar). (Büyütme: A; X10000, B; X20000 C ve D; X25000 uranil asetat-kurşun sitrat).

Titanyumdioksit nanopartikülünün yüksek doz grubunda ise, düşük doz grubuna benzer şekilde kalp kası hücrelerinde bazı alanlarda dejeneratif bulguların olduğu görülmüştür. Dejenere bölgelerde miyofibrillerde incelleme ve organizasyon bozukluğu, mitokondriyonlarda vakuolizasyon, krista ve membran yapılarında bozulma, sarkoplazmik retikulum sisternalarında belirgin genişlemeler olduğu gözlenmiştir. Bu grupta düşük doz grubuna benzer olarak diskus interkalarislerde yer yer bazı alanlarda hücreler arası mesafelerin genişlediği saptanmıştır (**Şekil 4.3**).



**Şekil 4.3.** Yüksek doz grubunda kalp kası hücresinin ultrastrüktürel görüntüsü. (A) Kalp kası hücresi miyofibrillerinde yer yer incelmeye ve dejenerasyon (oklar). (B, C) Miyofibrillerde incelmeye (asteriskler), mitokondriyonlarda vakuolizasyon ve krista yapılarında bozulma (ok başları), sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişleme (kalın oklar). (D) Diskus interkalarisde hücreler arası bağlantı kompleksleri arasında genişleme (ince ok). (Büyütme: A; X10000, B; X20000 C ve D; X25000 uranil asetat-kurşun sitrat).

Daha önceki çalışmalarda, karbon ve titanyumdioksit nanopartiküllerinin 0.25, 2.5, 25 ve 50 µg/ml dozlarında natal sıçanlardan izole edilen kalp kası üzerine uygulandığı bir çalışmada, kalp hücre fonksiyonlarının değiştiği, reaktif oksijen türlerinin arttığı ve kalp kası miyofibrillerindeki yapısal organizasyonun tamamen bozulduğu tespit edilmiştir [16].

Sıçanların eklem içine 0.2, 2 ve 20 mg/kg dozlarında titanyumdioksit nanopartiküllerinin enjekte edildiği bir çalışmada, oksidatif strese bağlı kalp, akciğer ve karaciğer dokularında histopatolojik değişiklikler meydana geldiği rapor edilmiştir [15]. Sıçanlara intratrakeal olarak 5, 21 ve 50 nm boyutlarındaki titanyumdioksit nanopartiküllerinin 0.5, 5 ve 50 mg/kg dozlarında uygulandığı diğer bir araştırmada ise, akciğer dokusunda histopatoloji geliştiği ve kan biyokimyasal parametrelerinin olumsuz etkilendiği bulunmuştur [18]. Farelere 1 ve 10 mg/m<sup>3</sup> dozlarında titanyumdioksit nanopartikülünün inhalasyon yoluyla verildiği çalışmada, inflamatuvar cevaba bağlı olarak akciğer dokusunda histopatolojik ve ultrasütrüktürel değişiklikler meydana geldiği gözlenmiştir [22]. Yine farelere 3 nm boyutlarındaki titanyumdioksit nanopartikülünün intratrakeal damlatma yoluyla 0.4, 4 ve 40 mg/kg dozlarında

uyguladığı diğer bir çalışmada ise, bu nanopartiküllerin akciğer dokusunda biriktiği ve patolojik lezyonlar oluştuğu tespit edilmiştir [19].

Histopatolojik çalışmalarda, kontrol grubunda kalp dokuları incelendiği zaman kalp kası hücrelerindeki miyofibrillerin düzenlenişinin ve kalınlıklarının normal yapıda olduğu, miyofibrillerdeki aktin ve miyozin miyofilamentlerinin normal dizilim gösterdiği ve miyofibrillerdeki bantlaşmanın da normal olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 4.1**). Bununla beraber titanyumdioksit nanopartikülünün düşük doz grubunda, normal yapıdaki miyofibrillerin arasında yer yer incelmış ve dejenere olmuş miyofibriller görülmüştür. Bazı alanlarda mitokondriyonların membran ve krista yapılarının bozulduğu, sarkoplazmik retikulum sisternalarında genişlemelerin olduğu saptanmıştır. Diskus interkalarislerde ise bazı bölgelerde hücreler arası bağlantı komplekslerinin birbirinden uzaklaştığı ve hücreler arası mesafelerin genişlediği gözlenmiştir (**Şekil 4.2**).

Yüksek doz grubunda ise, düşük doz grubuna benzer şekilde kalp kası hücrelerinde bazı alanlarda dejeneratif bulguların olduğu görülmüştür. Dejenere bölgelerde miyofibrillerde incelme ve organizasyon bozukluğu, mitokondriyonlarda vakuolizasyon, krista ve membran yapılarında bozulma, sarkoplazmik retikulum sisternalarında belirgin genişlemeler olduğu gözlenmiştir. Bu grupta düşük doz grubuna benzer olarak diskus interkalarislerde yer yer bazı alanlarda hücreler arası mesafelerin genişlediği saptanmıştır (**Şekil 4.3**).

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanan her iki dozu da kontrol grubuna göre sıçan kalp dokusunda histopatolojik değişiklikler meydana getirmesine rağmen, meydana gelen dejenerasyonun yüksek doz grubunda düşük doz grubuna göre daha fazla görülmesi, bu nanopartikülün kalp dokusunda oksidatif strese bağlı doku hasarı meydana getirdiğini göstermektedir.

### **4.3. Biyokimyasal Bulgular**

Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanan düşük dozunun, sıçan kalp dokusu malondialdehit düzeyi üzerine etkileri incelendiği zaman, kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Bununla beraber bu nanopartikülün uygulanan yüksek dozunun kalp dokusu malondialdehit düzeyini kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan önemli biçimde arttırdığı tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ) (**Tablo 5.1**). Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanan düşük dozunun, sıçan kalp dokusu süperoksitdismutaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiği zaman, kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark görülmemiştir ( $P>0.05$ ) (**Tablo 5.1**). Bununla birlikte bu

nanopartikülün uygulanan yüksek dozunun kalp dokusu süperoksitdismutaz aktivitesini kontrol grubuna göre önemli biçimde azalttığı gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanan düşük dozu ve yüksek dozunun, sıçan kalp dokusu katalaz ve asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldığı zaman, kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ) (**Tablo 5.1**). Bunların yanı sıra, uygulanan dozlar kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman, titanyumdioksit nanopartikülünün uygulanan yüksek dozunun, süperoksitdismutaz, katalaz, asetilkolinesteraz ve malondialdehit üzerine etkileri göz önünde bulundurulduğu zaman düşük doz gruplarına göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p > 0,05$ ) (**Tablo 5.1**).

**Tablo 5.1.** Titanyumdioksit nanopartikülünün kalp dokusu üzerine biyokimyasal etkileri

Parametreler	Gruplar		Kontrol (n=6)	Düşük doz (n=6)	Yüksek doz (n=6)	
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	*	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	
MDA	4.571 ± 0.402	a	5.879 ± 0.780	ab	7.344 ± 0.501	b
SOD	12.500 ± 7.170	a	10.500 ± 5.830	ab	5.500 ± 4.170	b
CAT	13.797 ± 3.484	a	20.780 ± 5.436	a	12.747 ± 0.623	a
AChE	0.094 ± 0.014	a	0.106 ± 0.017	a	0.087 ± 0.016	a

$\bar{X} \pm s\bar{x}$ : Aritmetik ortalama ± standart hata

\*; a ve b gruplar arası ayrımı belirtmek için kullanılmıştır.

Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında  $p < 0.05$  düzeyinde farklılık bulunmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda, farelerin abdomen boşluğuna 5, 10, 50 ve 150 mg/kg dozlarındaki titanyumdioksit nanopartikülünün 14 gün boyunca her gün olmak üzere uygulandığı bir çalışmada, lipid peroksidasyon sisteminin olumsuz etkilendiği, malondialdehit (MDA), hidrojenperoksit ( $H_2O_2$ ) düzeyinde artış olduğu, buna karşılık süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbik asit peroksidaz (APx), glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi antioksidan enzim aktivitelerinde doza bağlı azalma olduğu ve beyinde histopatolojik hasar meydana geldiği tespit edilmiştir [13]. Titanyumdioksit nanopartikülünün farelerin midesine 60 gün boyunca her gün uygulandığı 5, 10 ve 50 mg/kg dozlarının kullanıldığı diğer bir çalışmada, bu nanopartikülün enzim ve nörotransmitter sistemi inhibe ettiği homeostazis üzerine olumsuz etkisi olduğu ve hafızada azalmalara sebep olduğu bulunmuştur [12].

Boyutları 25 ve 80 nm olarak hazırlanan titanyumdioksit nanopartiküllerinin 5 g/kg'lık dozu oral yolla farelere uygulandığında, bu nanopartiküllerin önce sindirim sistemine, oradan karaciğer, dalak, böbrek ve akciğere taşındığı, alanin aminotranferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH) gibi biyokimyasal parametrelerin olumsuz etkilendiği, 25 nm partikül uygulanan 2 dişi ve 80 nm partikül uygulanan 1 dişi farenin hareket kabiliyetini kaybettiği ve bunların 2 gün içerisinde öldüğü raporlanmıştır [14]. Titanyumdioksit nanopartiküllerinin üç haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlara 90 gün boyunca 50 mg/kg dozunda günde 1mL'lik hacimde oral gavaj ile uygulandığı bir çalışmada, 5 haftanın sonunda nanopartikül uygulanan sıçanlarda kontrol gurubuna göre kilo kayıplarının yanı sıra, bu nanopartiküllere maruz kalan sıçanların aminoasit metabolik yollarının değiştiği, antioksidan enzim aktivitesinde azalma meydana geldiği ve oksidatif strese bağlı doku hasarı olduğu bulunmuştur [30].

Erkek İsviçre albino farelerin periton içine 21 nm boyutundaki titanyumdioksit nanopartikülünün 45 günlük enjeksiyonu ile kurgulanan bir çalışmada, farelerin karaciğer fonksiyon enzimlerinde ve oksidatif stres enzimlerinin olumsuz etkilendiği, aynı zamanda kromozomal anormalliklerin de meydana geldiği tespit edilmiştir [31].

Sprague Dawley sıçanlar üzerine titanyumdioksit nanopartiküllerinin etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, nanopartikül uygulanan grupta kontrol gruplarına göre lipit peroksidasyon (LPO) ve karaciğer enzimlerinin büyük ölçüde arttığı, testosteron ve antioksidan enzim seviyelerinde önemli ölçüde azalmaların meydana geldiği, histopatolojik olarak da nanopartikül uygulanan sıçanlarda damar tıkanması ve hepatik sinüzoidlerin genişlemesi olduğu bulunmuştur [32].

Çalışmamızda, titanyumdioksit nanopartikülleri sıçan kalp kası malondialdehit düzeyini anlamlı biçimde arttırmış, süperoksitdismutaz düzeyini ise anlamlı biçimde azaltmıştır. Bu biyokimyasal parametrelerin değişmesi, meydana gelen serbest radikallere antioksidan sistemin yeterli savunmayı gösteremediğinin kanıtı olarak kabul edilebilir. Ortamdaki serbest radikallerin, lipit moleküllerine verdiği zararın en önemli göstergesi malondialdehit düzeyidir. Bulgularımızda malondialdehit miktarının artması, titanyumdioksit nanopartiküllerinin kalp dokusunda oksidatif strese bağlı hasara yol açtığına işaret etmektedir. Oksidatif stres, serbest radikal ortaya çıkararak, antioksidan aktivitedeki dengeyi bozmak suretiyle gerek hücrelerde gerekse dokularda hasara sebep olmaktadır [45, 46].

Bulgularımızda çalışılan biyokimyasal parametrelerin tamamının etkilenmesi fakat özellikle malondialdehit ve süperoksitdismutaz düzeylerinin anlamlı biçimde etkilenmesi,

nanopartiküllerin sıçan kalp dokusunda serbest radikallerde artışa sebep olarak, oksidatif strese bağlı kalp dokusunda hasara sebep verdiğini açığa çıkarmaktadır.



## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda diş hekimliği, tıp, biyomedikal, askeriye, otomotiv sanayi, elektronik, gıda endüstrisi, boya sanayi, kozmetik ve tekstil gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan titanyumdioksit nanopartiküllerinin, sıçan kalbi üzerine olan etkileri elektrofizyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler kullanılarak multidisipliner bir yaklaşımla incelenmiştir.

Çalışmamız sonucunda:

1. Titanyumdioksit nanopartikülleri EKG parametrelerini etkilemiştir.
2. Bu nanopartikül kalpte R dalgasının genliğini düşürmüş, kalp hızını düşürmüş, T dalgasının süresini ve Q-T dalgasının süresini uzatmıştır.
3. Bu nanopartikül kalp dokusunda histopatolojik değişiklikler meydana getirmiştir.
4. Bu nanopartikül kalp kası dokusu miyofibrillerinde incelleme ve organizasyon bozukluğu, mitokondriyonlarda vakuolizasyon, krista ve membran yapılarında bozulma, sarkoplazmik retikulum sisternalarında belirgin genişlemeler ve diskus interkalarislerde hücreler arası mesafelerin genişlemesine sebep olarak dejeneratif doku hasarı meydana getirmiştir.
5. Bu nanopartikül kalp kası malondialdehit ve süperoksitdismutaz parametrelerini değiştirerek kalp kası hücrelerinde oksidatif strese bağlı hasara sebep olmuştur.
6. Kullanılan nanopartikülün boyutu, çalışanların bu nanopartiküle maruz kalma süresi (doz) ve çalışma alanına bağlı olarak maruz kalma yolu toksik etkileri etkileyebilmektedir.
7. Nanoteknoloji yaygın olarak kullanılmaktadır ve nanopartiküllerin kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde ve Dünya ölçeğinde çevre ve insan sağlığına en az zarar veren nanopartiküllerin kullanılması önemlidir. Biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen nanopartiküllere karşı iş sağlığı güvenliği kapsamında önlem alınması zorunlu hale gelmiştir. Bu çalışma, nanoteknolojik ürünlerin gerek üretilmeleri gerekse kullanılmaları aşamalarında çevre ve insan sağlığının korunması için katkı yapacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1]. Seaton, A., & Donaldson, K., (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small, *The Lancet*, 365, 923-4.
- [2]. Roco, M.C. (1999). Nanoparticles and Nanotechnology Research, *Journal of Nanoparticle Research*, 1, 1-6.
- [3]. Özdoğan, E., Demir, A., & Seventekin N. (2006). Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3, 159-68.
- [4]. Sawhney, A.P.S., Condon, B., Singh, K.V., Pang, S.S., Li, G., & Hui D. (2008). Modern Applications of Nanotechnology in Textiles, *Textile Research Journal*, 78 (8), 731-9.
- [5]. Mauliffe, M.E., & Perry, M.J. (2007). Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review *Nanotoxicology*, 1, 204 - 10.
- [6]. Al, J., Biazar, E., Jafarpour, M., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., Zafari, M. R., Akbari, H., & Rad, H.G. (2011). Nanotoxicology and Nanoparticle Safety in Biomedical Designs, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1117-27.
- [7]. Zorlu T. (2016). *Farklı dozlardaki dozlardaki titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) nanopartikülünün Galleria mellonella (L.) (LEPIDOPTERA:PYRALIDAE)'nın biyolojisine ve enzim sistemine etkisi*, yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul
- [8]. Dorman, D.C., McManus, B.E., Parkinson, C.U., Manuel, C.A., McElveen, A.M., & Everitt J.I., (2004). Nasal toxicity of manganese sulfate and manganese phosphate in young male rats following subchronic (13-week) inhalation exposure, *Inhalation Toxicology*, 16, 481-8.
- [9]. Wang, J.X., Chen, C.Y., Liu, Y., Jiao, F., Li, W., Lao, F., Li, Y.F., Li, B., Ge, C.C., Zhou, G.Q., Gao, Y.X., Zhao, Y.L., & Chai Z.F. (2008). Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases, *Toxicology Letters*, 183, 72-80,
- [10]. Ye, Y., Liu, J., Chen, M., Sun, L., & Lan, M., (2010). In vitro toxicity of silica nanoparticles in myocardial cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29, 131-7.
- [11]. Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W., Hubbs, A.F., Cumpston, J.L., Chen, B.T., Frazer, D.G., & Astranowa, V. (2008). Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction, *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 1-12.
- [12]. Hu, R., Gong, X., Duan, Y., Li, Na., Che, Yi., Cui, Y., Zhou, M., Liu, C., Wang, H., & Hong F. (2010). Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Biomaterials*, 31, 8043-50.
- [13]. Ma, L., Liu, J., Li, N., Wang, J., Duan, Y., Yan, J., Liu, H., Wang, H., & Hong F. (2010). Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO<sub>2</sub> delivered to the abdominal cavity, *Biomaterials*, 31, 99-105.
- [14]. Oosthuizen, M.A., Oberholzer, H.M., Scriba, M.R., van der Spuy, W.J. & Pretorius, E. (2012). Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles, *Micron*, 43, 863-9.
- [15]. Wang, J.X., Fan, Y.B., Gao, Y., Hu, Q.H., & Wang, T.C. (2009). TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection, *Biomaterials*, 30, 4590-600.
- [16]. Helfenstein, M., Miragoli, M., Rohr, S., Müller, L., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., & Rutishauser, B.R. (2008). Effects of combustion-derived ultrafine particles and manufactured nanoparticles on heart cells in vitro, *Toxicology*, 253, 70-78.
- [17]. Xue, Y., Wu, J., & Sun, J. (2012). Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro, *Toxicology Letters*, 214, 91-8.
- [18]. Liu, R., Yin, L., Pu, Y., Liang, G., Zhang, J., Su, Y., Xiao, Z., & Ye, B. (2009). Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal installation in rats, *Progress in Natural Science*, 19, 573-9.
- [19]. Li, J., Li, Q., Xu, J., Li, J., Cai, X., Liu, R., Li, Y., Ma, J., & Li W. (2007). Comparative study on the acute pulmonary toxicity induced by 3 and 20 nm TiO<sub>2</sub> particles in mice, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24, 239-44.

- [20]. Onur, M.A., Cehreli, M.C., Tas, Z., & Sahin S., (2003). Effects of Machined/Turned, TiO<sub>2</sub>-Blasted and Sandblasted/Acid-Etched Titanium Oral Implant Surfaces on Nerve Conduction: A Study on Isolated Rat Sciatic Nerves, *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*, 67B: 772-778.
- [21]. Onur, M.A., Tas, Z., Gurpinar, A., Sahin, S., & Cehreli, M.C., Morphologic, functional and behavioral effects of titanium dioxide exposure on nerves-An experimental study on rats, *Clinical Oral Implants Research*, 15, 513-519, (2004).
- [22]. Oosthuizen, M.A., Oberholzer, H.M., Scriba, M.R., van der Spuy, W.J. & Pretorius, E., (2012). Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles, *Micron*, 43, 863-9.
- [23]. Noel, A., Maghni, K., Cloutier, Y., Dion, C., Wilkinson, K.J., Halle, S., Tardif, R., & Truchon, G. (2012). Effects of inhaled nano-TiO<sub>2</sub> aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs, *Toxicology Letters*, 214, 109-19.
- [24]. Iavicoli, I., Leso, V., Fontana L., & Bergamaschi, A. (2011). Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 481-508.
- [25]. Shin, J.A., Lee, E.J., Seo, S.M., Kim, H.S., Kang, J.L., & Park E.M. (2010). Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse, *Neuroscience*, 165, 445-54.
- [26]. Hu, Y.L., Gao, & J.Q. (2010). Potential neurotoxicity of nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 394, 115-121.
- [27]. Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J., (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving studies of ultrafine particles, *Environmental Health Perspectives*, 113, 823-
- [28]. Wu, J. Wang, C. Sun, J. & Xue, Y. (2011). Neurotoxicity of Silica Nanoparticles: Brain Localization and Dopaminergic Neurons Damage Pathways, A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system *ACS Nano*, 5 (6), 4476-89.
- [29]. Pérez-Arízti, J. A., Ventura-Gallegos, J. L., Juárez, R. E. G., del Pilar Ramos-Godínez, M., Colín-Val, Z., & López-Marure, R. (2020). Titanium dioxide nanoparticles promote oxidative stress, autophagy and reduce NLRP3 in primary rat astrocytes. *Chemico-biological interactions*, 317, 108966
- [30]. Chen, Z., Han, S., Zhou, D., Zheng, P., Zhou, S. ve Jia, G. (2020). Titanyum dioksit nanopartiküllerinin oral uygulamasından sonra Sprague-Dawley sıçanlarının serum metabolomik imzaları. *NanoImpact*, 19, 100236.
- [31]. Rizk, M. Z., Ali, S. A., Hamed, M. A., El-Rigal, N. S., Aly, H. F., & Salah, H. H. (2017). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 90, 466-472.
- [32]. Hassanein, K. M., & El-Amir, Y. O. (2018). Ameliorative effects of thymoquinone on titanium dioxide nanoparticles induced acute toxicity in rats. *International journal of veterinary science and medicine*, 6(1), 16-21.
- [33]. Southorn, A.P., Pawis, G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions, *Mayo Clin.*, 63:381-389.
- [34]. Boveris, A. (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria, *Methods in Enzymology*, 105:358-365.
- [35]. Markert, M., Andrews, P.C., Baibor, B.M. (1984). Measurement of O<sub>2</sub> production by human neutrophils, *Methods in Enzymology*, 105:358-365.
- [36]. Livingstone, D.R. (2001). Contaminant - Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 42:656-666.
- [37]. Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Bio. Med.*, 26:202-226.
- [38]. Nordeberg, J., Arner, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system, *Free Radical Bio. Med.*, 31:1287-1312.

- [39]. Dekkers, C., Doornen, V.L., Kemper, H.G. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage, *Sports Med.* 21:213-238.
- [40]. Pan, D.C., Zhao, N.N, Wang, Q., Jiang, S.C., Ji, X.L., & An, L.J. (2005). Facile synthesis and characterization of luminescent TiO<sub>2</sub> nanocrystals, *Advanced Materials*, 17, 1991-5.
- [41]. Fabian, E., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Wiench, K., Wohleben, W., & van Ravenzwaay B. (2008). Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats, *Archives of Toxicology*, 82, 151-7.
- [42]. Miles, J. R., Harris, C.R. (1971). Insecticide residues in a stream and a controlled drainage system in agriculture areas of southwestern ontario, *Pest monitor J*, 5(3):289-294.
- [43]. Casida, J.E. Quistad, G.B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future?, *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 1-16.
- [44]. Thapar, A., Sandhir, R., Kiran, R.(2002). Acephte Induced Oxidative Stress in Erythrocytes, *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(8), 963-966.
- [45]. Çamlıca, Y., Bediz, S.C. and Yalın, S. (2017). Investigation of effect of acetamiprid and d-tubocurarine on frog nerve tissue (I: Oxidative potential). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 149-155.
- [46]. Yu, M., Li ,S.M., Li, X., Zhang, B. And Wang, J.J. (2008). Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 903-908.