

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**DİMETOAT İLE İNDÜKLENEN TOKSİSİTEYE KARŞI KARAYEMİŞ
(LAUROCERASUS OFFICINALIS ROEM.) MEYVE EKSTRESİNİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN SIÇANLARDA ARAŞTIRILMASI**

Proje No: TCD-2013-4127

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Ayşe EKEN

Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji AB.Dalı

Araştırmacılar:

Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK, Elçin ÖZGER
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji AB.Dalı

Ayşe BALDEMİR
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Botanik AB.Dalı

Serpil SARIÖZKAN
Veteriner Fakültesi/Dölerme ve Suni Tohumlama AB.Dalı

Arzu Hanım YAY
Tıp Fakültesi/Histoloji-Embriyoloji AB.Dalı

Fazile CANTÜRK, Yusuf CANER
Tıp Fakültesi/Biyofizik AB.Dalı

Eylül 2015
KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	3
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEMLER	7
1. Meyve ekstresinin hazırlanması.....	7
2. Meyve ekstresinin mineral içeriğinin belirlenmesi.....	7
3. Deneysel hayvanı temini ve deneysel prosedürlerin uygulanması.....	7
4. Deneysel hayvanında deneysel modelin oluşturulması.....	7
5. Kan ve doku örneklerinin elde edilmesi ve ön işlemler.....	8
6. Biyokimyasal testlerin yapılması.....	8
a) Serum aspartat aminotransferaz (AST).....	8
b) Alanin aminotransferaz (ALT).....	8
c) Alkalın fosfataz (ALP).....	8
d) Gama-glutamilttransferaz (GGT).....	8
e) Total ve direkt bilirubin.....	8
f) Kan üre nitrojen (BUN).....	8
g) Kreatinin.....	8
7. Toksikite testlerinin yapılması.....	9
7.1.Oksidatif stres parametrelerinin çalışılması.....	9
a) MDA düzeyleri.....	9
b) Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi.....	9
c) Glutasyon peroksidaz (GPX) aktivitesi.....	9
d) Katalaz (CAT) aktivitesi.....	10
e) Nitrit/nitrat ölçümü.....	10
7.2.Sperm parametrelerinin değerlendirilmesi.....	10
a) Epidimal spermatozoa yoğunluğu.....	10
b) Spermatozoa motilitesi.....	10
c) Morfolojik değerlendirme.....	11
7.3. Dokularda DNA hasarının araştırılması.....	11
a) Comet yönteminin uygulanması.....	11
b) Tunel test yönteminin yapılması.....	12
8. Histolojik inceleme.....	13
9. İstatistiksel analiz.....	13
BULGULAR	14
a) Meyvenin metal içeriği.....	14
b) Vücut ağırlık değişimi.....	15
c) Karaciğer toksisitesine ilişkin bulgular.....	15
d) Böbrek toksisitesine ilişkin bulgular.....	18
e) Beyin toksisitesine ilişkin bulgular.....	20
f) Testis toksisitesine ilişkin bulgular.....	23
TARTIŞMA VE SONUÇ	28
KAYNAKLAR	31

ÖZET

Dimetoat (O,O-dimethylS-methylcarbamoylphosphorodithioate), en önemli ve yaygın kullanılan organofosfat insektisitlerden biri olup birçok organa toksik etkisi olduğu rapor edilmiştir. Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roem. syn: *Prunus laurocerasus* L.) ülkemizin Karadeniz Bölgesinde doğal olarak yetişen ve lokal olarak “Taflan” veya “Lazkirazi” olarak adlandırılan yerli bir meyvedir. Bu meyvenin antioksidan ve mineral yönünden çok zengin olduğu bilinmektedir ve bitkisel ilaç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, dimetoatın oksidatif stresi indükleyerek yol açtığı karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki toksik etkilerini ve bu etkilere karşı karayemiş meyvesinin koruyucu/iyileştirici özelliğini belirlemektir. Bu çalışma yönteminde, 60 erkek Wistar albino sıçanlar her bir grupta 10 deney hayvanı olmak üzere rastgele 6 gruba ayrıldı ve 60 gün boyunca oral gavaj ile maddeler verildi. Grup I (kontrol) yalnızca NaCl (%0.9) verilen, Grup II dimetoat verilen, Grup III meyve ekstresi uygulanan, Grup IV dimetoat verilmesinden 30 dk önce meyve ekstresi verilen, Grup V dimetoat verilmesinden 30 dk önce vit C verilen, Grup VI ilk bir ay boyunca sadece dimetoat, ikinci ay boyunca meyve ekstresi verilmesinden 30 dk önce dimetoat verilen gruplardı. Dimetoat, karayemiş meyvesi ve vitamin C sırası ile 7 mg/kg/gün, 4 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün dozlarında uygulandı. Dimetoatın toksik etkileri ve karayemiş meyvesinin koruyucu etkileri; sıçan dokularında oksidatif stress parametreleri [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), total oksidan durum (TOS), total antioksidan durum (TAS), lipid peroksidasyon indeksi malondialdehit (MDA), DNA hasar indeksi olan comet testi, apoptoz indeksi olan TUNEL, organ ağırlık değişimi, sperm değerlendirme parametreleri (motilite, konsantrasyon ve anormal sperm oranı), biyokimyasal parametreler (aspartat transaminaz (AST), alanine transaminaz (ALT), gama-glutamilttransferaz (GGT), Total bilirubin ve direkt bilirubin kan üre nitrojen (BUN), kreatin) ve histolojik incelemeler yapılarak değerlendirildi. Ayrıca, kurutulmuş karayemiş meyvesi ve tohumunda toksik metal ve esansiyel element içeriği indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar gösterdi ki, dimetoat uygulaması ile plazma AST, ALT, direkt-bilirubin, GGT, BUN ve kreatin düzeylerinde artış gözlemlendi. Meyve ekstresi verilen gruplarda ise bu düzeylerde azalma gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dimetoat uygulaması ile dokularda MDA, TOS düzeyleri artışına yol açarken TAC, SOD, CAT ve GPX’de ise azalmaya yol açtı. Yalnızca dimetoat verilen grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat grubuna meyve ekstresinin verilmesi (Grup 4 ve 6) oksidatif stres durumunda, DNA hasarında ve apoptotik hücre sayısında azalma sağladı. Karayemiş meyve ve tohumu çok sayıda esansiyel element içerirken toksik metal içermemektedir. Sonuç olarak, karayemiş meyve uygulaması dimetoat toksisitesine karşı koruyucu/iyileştirici etkileri sağladı. Bu nedenle, karayemiş doğal antioksidan kaynağı ve mineral takviyesi olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Dimetoat, taflan, oksidatif stres, DNA hasarı

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Araştırma Fonu (Proje No: TCD-2013-4127) tarafından mali olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

Dimethoate (O,O-dimethylS-methylcarbamoylphosphorodithioate) is one of the most important and widely used organophosphate insecticides has been reported to be toxic to many organs. Cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem. syn: *Prunus laurocerasus* L.) is a native fruit locally called “Taflan” or “Lazkirazi” and grows naturally in the Black Sea region of Turkey. It is known to be very rich in terms of antioxidant and minerals and widely used as an herbal medicine. The aim of this study was to determine the toxic effects of dimethoate caused by inducing oxidative stress in the tissues of liver, kidney, brain and testis and the protective/ameliorative effect of cherry laurel fruit. In this study method, sixty male Wistar albino rats were divided randomly into six groups consisting of ten rats each and were treated daily by oral gavage for 60 days as follows: Group I (control) received only NaCl (0.9 %), Group II was administered with dimethoate, Group III was given cherry laurel fruit extract, Group IV was treated with fruit extract 30 minutes prior to dimethoate administration, Group V was given vitamin C 30 minutes prior to dimethoate administration, Group VI was given the daily dimethoate for the first month, during the second month the rats were treated with dimethoate 30 minutes before administration of fruit extract. Dimethoate, cherry laurel fruit (70% methanol extract), and Vitamin C were applied at 7 mg/kg/day 4 mg/kg/day, and 100 mg/kg/day doses, respectively. The toxicity of dimethoate and the protective effects of cherry laurel were evaluated using by oxidative stress parameters (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS), malondialdehyde (MDA) for lipid peroxidation index), comet assay for DNA damage index, TUNEL assay for apoptosis, organ weight changes, sperm evaluation parameters (motility, concentration and abnormal sperm rate), biochemical parameters (aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and histologic examination in tissue of rats. Additionally, the content of toxic metals and essential elements in the dried fruit and seed samples was determined by using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Our results indicated that dimethoate-treatment caused an increase in AST, ALT, direct-bilirubin, GGT, BUN, creatine in plasma. In the groups treated with the fruit extract showed a decrease in these levels. Dimethoate-treatment caused an increase in MDA, TOS levels and a decrease in TAC, SOD, CAT, GPx as compared to control group in tissues. Administration of fruit extract to dimethoate-treated groups (Group 4 and 6) provided a reduction oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell number compared to the only dimethoate-treated group. The fruit and seed of cherry laurel contented plentiful essential elements but not toxic metals. In conclusion, treatment with cherry laurel fruit provided protective/ameliorative effects against dimethoate-induced toxicity. Therefore, cherry laurel might be used as a source of natural antioxidant and mineral supplementation.

Key words: Dimethoate, cherry laurel, oxidative stress, DNA damage

This research was financially supported by Research Fund of the Erciyes University Scientific Research Project Unit (Project number: TCD-2013-4127).

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Bilinen insektisitler arasında dimetoat, tarım ve endüstride yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dimetoat'ın ürün korumada ve ev böceklerine karşı yaygın kullanımına rağmen, oksidatif strese yol açtığına ve sağlık üzerine olumsuz etkilerine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak, dimetoat'ın potansiyel olarak reproduktif sisteme toksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Taflan (*Prunus laurocerasus*), besin olarak tüketilmesinin yanı sıra, hem meyvesi hem de tohumu mide ülserleri, sindirim sistem şikayetleri, bronşit, ekzama, hemoroid tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır. Karayemiş meyvesinin çeşitli radikallere karşı radikal temizleme aktivitesinin olması, yüksek antioksidan aktivitesinin olması ve zengin mineral içeriğinden dolayı değerli bir gıda takviye kaynağı olabileceği önerilmektedir.

Yapacağımız bu çalışma ile deneysel hayvan modeli kullanarak doğal bitkisel bir ürün olan karayemiş meyvesinin kansere karşı koruyucu etkilerini belirlemek, bu etkiler altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasını sağlayabilecektir. Dolayısı ile önerdiğimiz bu çalışma, çeşitli doku hasarlarına karşı meyvenin koruyucu etkilerinin belirlenmesi konusunu aydınlatacak olması açısından büyük önem taşımaktadır.

Yurt içi ve yurt dışı literatürleri incelediğimizde, gerek dimetoat toksisitesi gerekse karayemiş meyvesinin doku hararlarına karşı koruyucu/önleyici veya iyileştirici etkileri konusundaki çalışmalar sınırlı sayıdadır. Dolayısı ile bu çalışma literatürlerde yer alacak kapsamlı bir çalışma olacaktır. Elde edeceğimiz sonuçlar açısından literatüre katkı sağlayıcı özelliğinden dolayı, ileriki dönemde yapılabilecek projelerin üretilmesine zemin oluşturabilecek özelliktedir.

Yukarıdaki veriler ışığında yapılan bu çalışmada; karayemiş meyvesinin antioksidan özelliğinden yola çıkarak karaciğer, böbrek, testis ve beyin doku hasarlarına karşı koruyucu etkilerinin tespit edilmesi halinde, bireylere kanser dahil çeşitli hastalıklara karşı koruyucu olarak bu meyve hakkında faydalı etkileri belirtilerek düzenli ve kontrollü antioksidan takviyesi olarak kullanmaları önerilebilir. Ayrıca, tarım alanında yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması sağlanarak gıda sektörüne katkıda bulunabilir ve ilaç sanayisinde kullanımı tavsiye edilebilir.

GENEL BİLGİLER

Taflan (*Prunus laurocerasus*), gülgiller (*Rosaceae*) familyasından küçük beyaz çiçekler açan, yaprak dökmeyen bir ağaç türüdür. Taflan bitkisinin meyveleri “Karayemiş” veya “Lazkirazi” ismiyle tanınmaktadır ve Türkiye’de Doğu Karadeniz Bölgesinde doğal olarak yetişmektedir (1,2). Türkiye’de Trabzon, Giresun, Ordu, Rize ve Artvin civarında yüksek dağlık bölgelerde doğal olarak bulunur. Meyve, kiraz görünümünde parlak, koyu kırmızı veya siyah renklidir. Taze meyveler pazarlarda satılmakta, meyve taze tüketilmesinin yanında kurutulmuş olarak ta yenilmektedir. Kurutulmuş meyveden elde edilen tohumları halk tarafından şeker hastalığına karşı kullanılmaktadır. Taflan bitkisi besin olarak tüketilmesinin yanı sıra, hem meyvesi hem de tohumu mide ülserleri, sindirim sistem şikayetleri, bronşit, ekzama, hemoroid tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır (3, 4). Taze meyvelerinin idrar artırıcı ve taş düşürücü etkileri vardır (1) ve lokal ağrılarda analjezik etki göstermektedir (4).

Fazla meyve tüketimi, kanser, kalp damar hastalıkları, koroner arter hastalığı ve arterosklerozis gibi bazı kronik hastalıkların riskini azaltmaktadır. Antioksidanları ve karotenoitler yönünden zengin meyvelerin tüketiminin koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir (5). Son zamanlarda az bilinen meyve türlerinin, çeşitli kanserler ve yaşla ilgili hastalıkların önlenmesinde antioksidanları, antimutajenleri ve antikarsinojenleri içeren sağlığa yararlı maddeler olarak daha çok ilgi çeken bir konu olmaktadır. Bu nedenle böyle özelliklerin araştırılması, özellikle doğal antioksidanların yeni kaynaklarını tespit etmek (6), ilgi çekici ve faydalı bir uğraş olmaktadır (3). Karayemiş meyvesi de Türkiye’de son zamanlarda önemli bir konu haline gelmiştir ve tıbbi etkileri vardır (5).

Kolaylı ve ark. (2003), karayemiş meyvesinin antioksidan, mineral, askorbik asit ve protein yönünden çok zengin olduğunu tespit etmişlerdir. Potasyum, magnezyum, kalsiyum ve sodyum gibi makroelementlerin düzeylerini sırası ile 2215, 179, 153 ve 55 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Mangan, demir, çinko ve bakır gibi eser elementlerin düzeylerini ise sırası ile 24.2, 8.3, 1.9 ve 0.8 mg/kg olarak bulmuşlardır. Kurşun, nikel, kobalt ve krom gibi ağır metal düzeylerinin çok düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, karayemiş meyvesinin çeşitli radikallere karşı radikal temizleme aktivitesinin olması, yüksek antioksidan aktivitesinin olması ve zengin mineral içeriğinden dolayı değerli bir gıda takviye kaynağı olabileceğini önermektedirler (6). Halilova ve Ercisli (2010), yaptıkları çalışmada taflan meyvesinin fenolik bileşikler ve antosiyaninler yönünden zengin bir kaynak olduğunu belirlemişlerdir. Ucuz ve iyi bir doğal antioksidan kaynak olabileceğini, gıda takviye formülasyonlarında ise potansiyel olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (3). Liyana-

Pathirana ve ark. (2006), taflan meyvesinin ve bundan yapılan pekmezinin fenolik bileşikler yönünden zengin olduğunu tespit etmişler ve oksidatif stresin yol açtığı dejeneratif hastalıkların iyileştirilmesinde faydalı etkileri olabileceğini önermişlerdir (7). Yaylacı-Karahalil ve Şahin (2011), karayemiş meyvesinde 17 farklı fenolik bileşikleri ve total antioksidan özellikleri araştırmışlardır. Meyvenin metanolik ekstresinin esas fenolik bileşeni olan klorojenik asit tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre, karayemiş meyvesinin iyi bir antioksidan kaynak olduğunu ve bazı hastalıklara karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini önermektedirler (8).

İnsanlar ve diğer canlılar yaşamları boyunca vücut için yabancı olan birçok kimyasal maddelere devamlı maruz kalmaktadır. Organofosforlu insektisitlerle ilgili toksikolojik çalışmaların çoğu hepatotoksitesisi, nefrotoksitesisi, nörotoksitesisi ve testis toksitesisi üzerine olmuştur (9). Organofosforlu insektisitler insanlarda ve hayvanlarda akut maruz kalma sonucu oksidatif strese yol açabileceği bildirilmiştir. Bazı pestisitlerin eş zamanlı reaktif oksijen türlerinin üretimi ile hepatik ve beyin dokularının hücresel bileşenlerine elektrofilik saldırı yaparak biyolojik etkilerini gösteren bildiriler mevcuttur (10). Dimetoat (*O,O*-dimetil-*S-N*-metilkarbamoilmetil)-fosforoditioat [CAS Nu. 60-51-5], temas ve sistemik etkili organofosforlu bir insektisittir (11). Bilinen insektisitler arasında dimetoat, tarım ve endüstride yaygın şekilde kullanılmaktadır. Nüfusun çoğunluğu dimetoat içeren insektisit düşük dozlarına besinle, kontamine içme suyu ile veya ev uygulaması aracılığı ile maruz kalmaktadır. Dimetoat'ın yüksek dozlarına maruz kalan risk grupları, bu kimyasalın üreticileri, pestisit işçileri ve çiftlik sahipleridir. Dimetoat'ın ürün korumada ve ev böceklerine karşı yaygın kullanımına rağmen, oksidatif strese yol açtığına ve sağlık üzerine olumsuz etkilerine dair bir bilgi bulunmamaktadır (11). Dimetoat'ın potansiyel olarak reproduktif sisteme de toksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Çevresel kontaminant olarak sperm sayısında, motilitede canlılığında azalmaya, anormal spermatozoa oranında artmaya dolayısıyla üreme yeteneğinde kalıcı azalmaya yol açtığı bildirilmektedir (12).

Karaciğer, vücutta başlıca metabolik ve sekresyon fonksiyonlarında önemli bir role sahip bir organdır. Çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişen çeşitli ve çok sayıda yetmezlik, fonksiyon bozukluğu gibi hastalıklar söz konusudur. Günümüzde karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaç sayısının sınırlı olmasına karşın, hem bitkisel hem de hayvansal kaynaklı halk ilaçlarının geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanımı giderek artmaktadır. Ancak halk tarafından bir bitkisel ürünün karaciğeri koruyucu (hepatoprotektif) etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Çok az sayıda bitkinin karaciğer üzerinde koruyucu etkili olduğu dikkate

alınırsa, karaciğer fonksiyonları üzerinde etkili ilaçların seçiminde geniş bir yelpazede olan çok sayıda parametrenin değerlendirilmesi gerekir (13).

Serbest radikaller; yaşlanma, inflamasyon, koroner kalp hastalığı, diyabet, romatizma, karaciğer bozuklukları, böbrek yetmezliği ve kanser gibi çeşitli hastalık türlerinin temel nedeni olarak bilinmektedir (14). Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri (ROT), hücrel hasarlara yol açabilir ve biyolojik membranlarda doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu başlatabilirler. ROS; DNA ve protein hasarı, enzimlerin oksidasyonu gibi doku hasarlarına yol açar (15). Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ile enzimatik olmayan antioksidanlar; vitamin E, karotenoidler, flavonoidler, tanenler ve bazı çinko (Zn) selenyum (Se) gibi mikronutrientler hücrel sistemde oksidatif hasarların önlenmesinde önemli rol oynarlar. Dolayısı ile çok sayıda bitkisel antioksidanlar yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. Bu tür antioksidanların günlük besinsel alınımı sağlıklı yaşamın sürdürülmesinde bir strateji olarak kabul edilmektedir (6).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Meyve Ekstresinin Hazırlanması

Metanol Ekstresinin Hazırlanması; Karayemiş meyvesi değirmende toz edildi ve Metanol kullanılarak 8 saat oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile masere edildi. Ekstre süzüldü ve bu işlem aynı şartlar altında üç kez tekrarlandı. Toplanan metanol ekstresinden, solvan vakum altında rotavapor ile 40 °C'de kuruluğa kadar uçuruldu (1). **Sulu Ekstresinin Hazırlanması;** Meyveler toz edilerek distile su ile 30 dakika boyunca kaynatıldı ve sıcakken süzüldü. Süzülen bu sulu ekstre daha sonra liyofilize edildi (1). Meyve ekstreleri bu iki yöntemle hazırlandı ve metanol ekstresinin antioksidan yönünden zengin içeriğe sahip olduğu tespit edildi. Deney süresince ekstreler günlük olarak hazırlanıp deney hayvanına uygulandı.

Meyvenin Mineral İçeriğinin Belirlenmesi

Kalsiyum (Ca), kobalt (Co), krom (Cr), bakır (Cu), demir (Fe), potasyum (K), Magnezyum (Mg), mangan (Mn), molibden (Mo), sodyum (Na), nikel (Ni), çinko (Zn), alüminyum (Al), kurşun (Pb), gümüş (Ag), arsenik (As), kadmiyum (Cd), civa (Hg), selenyum (Se), vanadyum (V) elementlerinin derişim ölçümleri ICP-MS cihazı ile Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM) yapıldı.

Deney Hayvanı Temini Ve Deneysel Prosedürlerin Uygulanması

Çalışmada 60 Wistar Albino erkek rat (200-250 g ağırlığında) kullanıldı. Ratlar Erciyes Üniversitesi, Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ratlar standart laboratuvar koşullarında laboratuvar koşulları (22±3 °C sıcaklık, % 55±5 bağıl nem ve 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) altında tutuldu. Ticari pelet yem (2600 kcal/kgME, % 7 ham selüloz ve % 23 ham protein) ve taze içme suyu *ad libitum* olarak verildi.

Deney Hayvanında Deneysel Modelin Oluşturulması

Sıçanlar her grupta 10 birey olmak üzere rastgele 6 gruba bölündü;

Grup 1 (kontrol): kontrol grubu olarak seçildi ve sadece 2 ay boyunca her gün ağızdan gavaj ile serum fizyolojik verildi (%0.9, w/v).

Grup 2 (toksik madde): 2 ay boyunca günlük oral doz olarak serum fizyolojik içinde çözülmüş toksik madde'den (**dimethoate**) 20 mg/kg vücut ağırlığında verildi.

Grup 3 (meyve ekstresi): 2 ay boyunca günlük oral doz olarak meyve ekstresinden 4ml/kg olarak verildi.

Grup 4 (meyve ekstresi + toksik madde): 2 ay boyunca günlük oral doz olarak 20 mg/kg toksik madde uygulamasından 30 dakika önce günlük 4 ml/kg meyve ekstresi verildi.

Grup 5 (Vitamin C + toksik madde): 2 ay boyunca günlük oral doz olarak 20 mg/kg toksik madde uygulamasından 30 dakika önce günlük oral doz olarak 100 mg/kg Vitamin C verildi.

Grup 6 (toksik madde + meyve ekstre): İlk 1 ay boyunca günlük oral doz olarak 20 mg/kg toksik madde verildi. Sonra da diğer 1 ay boyunca günlük oral doz olarak toksik madde aldıktan 30 dakika sonra 4ml/kg meyve ekstresi verildi.

Not: deney hayvanına dozlama başlanıldığı ilk hafta, toksik madde uygulanan grupta 2 deney hayvanı öldüğünden ve diğerlerinin de durumu iyi olmadığı için, toksik maddenin dozu 1/3 oranında düşürülerek deney süresince toksik madde uygulanan gruplara dimetoat 7 mg dozda uygulanmıştır.

Kan Ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi Ve Ön İşlemler İçin Hazırlanması

Deney süresi sonunda (2 ay), dozlamadan 24 saat sonra ksilazin/ketamin anestezisi altında kalpten kan örnekleri heparinize tüplere alındı. Kan örnekleri 4°C'de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Plazma örnekleri analiz yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı. Daha sonra sıçanlara ötenazi uygulandı ve her bir sıçanın karaciğeri, böbreği, beyini ve testis dokuları çıkartılıp hemen soğuk serum fizyolojik (%0.9, w/v) ile yıkanıp kurulandı ve tartıldı. Küçük miktar örnek dilimleri, rutin histolojik inceleme için %10 nötral formalin tamponunda fikse edildi.

Geri kalan doku örneklerinin bir kısmı comet testi ve tunel için küçük parçalara bölündü, bir kısmı ise 2 ml soğuk uygun tamponda homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenattan doğrudan malondialdehit düzeyi ölçüldü. Diğer homojenatlar ise 9000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant örneklerinde antioksidan enzim aktiviteleri ölçüldü.

Biyokimyasal Testlerin Yapılması

Karaciğer fonksiyonun biyokimyasal belirteçleri olarak; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalın fosfataz (ALP), gama-glutamilttransferaz (GGT), Total bilirubin ve direkt bilirubin düzeyleri ticari kit ile ölçümleri yapıldı.

Böbrek fonksiyonun biyokimyasal belirteçleri olarak; kan üre nitrojen (BUN) düzeyi ve kreatinin konsantrasyonları ticari kitle ölçümleri yapıldı.

Toksisite Testlerinin Yapılması

Lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin ölçülmesi: Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır (16).

Yöntem kısaca, homojenize dokudan 0,1 ml alınarak üzerine 50 µl sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1) eklendi, vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 375 µl asetik asit (pH 3.5, 20%) ve 375 µl tiobarbitürik asit (0.6%) eklendi ve kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildi. Örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. 1.25 ml of bütanol: piridin (15:1) eklendi, vortekslendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tiyobarbitürik asit ile MDA reaksiyonundan sonra oluşan reaksiyon ürünü 750 µl organik pembe tabaka 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı. Sonuçlar nmol/g protein olarak tanımlandı.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçülmesi: Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır. CuZn-SOD aktivitesi U/g protein olarak tanımlanır (17).

Yöntem kısaca, doku homojenatı 10mM fosfat tamponu (pH 7.00) ile dilüe edildi. 25 µl dilüsyonlu homojenat, 50 mmol/L CAPS (3-(sikloheksilaminol)-1-propansülfonik asit) ve 0.094 mmol/L EDTA (pH 10.2) içeren bir tampon solüsyonunda 0.05 mmol/L ksantin sodyum ve 0.025 mmol/L 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (INT) içeren 850 µl substrat solüsyonu ile karıştırıldı. 125µl ksantin oksidaz (80 U/ml) karışıma eklenerek absorbands artışı 505 nm'de 3 dakika izlendi.

Glutasyon peroksidaz (GPX) enzim aktivitesinin ölçülmesi: SeGSH-Px aktivite tayin yönteminin esası, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) SeGSH-Px tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) kullanılması ve kullanılan bu NADPH miktarındaki, dolayısıyla absorbandsdaki azalmanın 340 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanmaktadır. GPx aktivitesi U/g protein olarak tanımlanır (18).

Kısaca; 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L Na₂EDTA, 2 mmol/L indirgenmiş glutatyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutatyon redüktaz içeren bir karışımın 980 µl ile 20 µl doku homojenatı karıştırıldı ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon, 8.8 mmol/L hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatıldı ve 3 dakika için 340 nm'de okunan absorbanların azalışı kaydedildi.

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçülmesi: Aebi tarafından (1984) belirtilen metot (19) ile 25°C'de doku homojenatlarında ölçülerek burada substrat H₂O₂'nin dekompozisyon oranı, 30 saniye için 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesidir. Aktivite MU/l olarak ifade edilir.

Protein miktar tayininin yapılması: Dokuların protein içeriği, standart olarak sığır serum albumin kullanılarak Lowry ve arkadaşlarının (1951) metoduna göre ölçüldü (20).

Nitrit/nitrat ölçümü: Plazma NO₂⁻/NO₃⁻ konsantrasyonu, Tracey ve arkadaşlarına göre (21) Griess reaksiyonu kullanılarak ölçüldür. Reaksiyon karışımı, indirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve nitrat reduktazdan oluşmaktadır. Reaksiyon karışımı plazma örneklerinin bir saat inkübasyonundan sonra Griess reaktifi, (%5'lik fosforik asit içinde %1'lik sülfanilamid ve % 0,1'lik N-(1-naftil)-etilendiamin 1:1 oranında hazırlanır) bu örneklerle ilave edildi. Yine 10 dakika inkübasyondan sonra spektrofotometrik olarak absorbanlar 540 nm'de ölçüldü. Nitrit/nitrat konsantrasyonları standart eğriden hesaplandı.

Epidimal spermatozoa yoğunluğu: Epidimal spermatozoa yoğunluğu Yokoi ve ark. (2003) metoduna göre sayıldı (22). Bunun için epididimis anatomik makasla 5 ml fizyolojik tuzlu su içeren petri kutusunda parçalandı ve 10 dk kadar bekletildi. Ardından oda ısısında 2 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında supernatan 5-g sodyum bikarbonat, 1 mL formalin (%35), ve 25 mg eosin/ 100 mL distile su da hazırlanan solusyon ile 1:100 oranında dilue edildi. Toplam spermatozoa sayısı hemositometrik yöntemle belirlendi. Thoma lamininin her bir kamarasına yaklaşık 10 µL sulandırılmış sperma süspansiyonu transfer edildi ve 5 dk kadar beklendikten sonra ışık mikroskobunda x200 büyütmede sayıldı.

Spermatozoa motilitesi: Spermatozoa motilitesi Sönmez ve ark. (2005) metoduna göre ısıtma tablalı ışık mikroskobunda yapıldı (23). Bu amaçla, lam üzerine birkaç damla Tris

buffer solüsyonu (3.63 g tris (hidroksimetil) aminometan, 0.50 g glukoz, 1.99 g sitrik asit, ve 100 mL distile su) damlatılıp üzerine sol cauda epididimisten oldukça küçük bir damla damlatılıp karıştırılıp lamel kapatılarak ışık mikroskopta x400 büyütmede değerlendirildi. Motilite değerlendirilmesi örnekteki 3 değişik alanın ortalaması alınarak yapıldı ve nihai motilite oranını gösterdi.

Morfolojik değerlendirme: Morfolojik anormalliklerin değerlendirilmesinde eosin-nigrosin (1.67% eosin, 10% nigrosin ve 0.1 M sodyum sitrat) boya ile sperm örnekleri hazırlandı. Hazırlanan her bir lamda ışık mikroskop altında x400 büyütmede 200 sperm hücresinde sperm baş, kuyruk ve toplam anormallikleri sayılarak belirlendi (24).

Dokularda DNA hasarının araştırılması

Comet yöntemiyle karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında DNA hasarının belirlenmesi: Dokuda DNA hasarı nötral şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Hücre süspansiyonunun hazırlanması için, dokulardan yaklaşık 0.2 gr gelecek şekilde parçalar alındı, temiz bir bisturi yardımıyla parçalandı, parçalanmış dokulara 1 mL soğuk PBS (Ca^{2+} ve Mg^{2+} free) eklenerek yaklaşık 10 dk. 500 rpm manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Cam tüpler içinde hazırlanan hücre süspansiyonu yaklaşık 20 dk. sedimentasyona bırakıldı, sedimentasyondan sonra süpernatant kısmındaki hücrelerden 100 µl bir mikropipet yardımıyla ependorf tüp içine alındı ve üzerine 1000 µl agaroz ($37^{\circ}C$ 'da %0.8'lik düşük erime noktalı) eklenerek pipetaj yapıldı (25). Her bir mikroskop lamı distile suda hazırlanmış %0.5'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne elde edilen agaroz-hücre süspansiyon karışımı bu lamlar üzerine yayıldı, üzerleri lamelle kapatıldı ve $4^{\circ}C$ 'de buz aküsünün üzerinde 30 dk. donmaya bırakıldı. Donma işleminden sonra üzerlerindeki lameller kaldırılarak taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisi (TBE, 25 g SDS) ile $4^{\circ}C$ 'de 7 dakika lize edildi. Lamalar bu çözeltiden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (TBE: 54 g Tris, 27.5 g borik asit, 20 mL EDTA, pH 8.4) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 64 V-250 mA'de 2 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için 5 dakika dH_2O ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µL ethidium bromide (1 µg/mL) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı (26, 27).

Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, Japan) kullanılarak x200 büyütmeyle çekildi. Her bir lamdan rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP 1.2.2,

Windows 2010)'le analiz edildi. Baş uzunluğu (length head), kuyruk uzunluğu (length tail), comet uzunluğu (length comet), başta % DNA (head DNA), kuyrukta % DNA (tail DNA), kuyruk momenti (tail moment) ve olive tail moment (OTM) parametreleri CASP kullanılarak analiz edildi. Hasar hücre başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü (28).

Comet yöntemiyle spermde DNA hasarının belirlenmesi: Dilüe edilmiş semen örnekleri 4 °C de 10 dakika 300 g de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan sperm örnekleri PBS (Ca²⁺ ve Mg²⁺ free) ile yıkandı (29). Spermde DNA hasarı yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) kullanılarak araştırıldı. Kısaca, her bir mikroskop lamı PBS de hazırlanmış % 1 lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne 37 °C 'de % 0,7 lik düşük erime noktalı agarozun 100 µl ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamalar 4°C 'de buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lysis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mM dithiothreitol, pH:10) 1 saat 4 °C ' de lize edildi. Daha sonra lysis çözeltisine 100 µg/ml proteinase K (Sigma) eklenerek, lamalar 37°C' de bir gece inkübe edildi. Lamalar lysis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. 8°C'da 12 V-250 mA' de 20 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar alkali iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0.4 M Tris, pH 7.5) ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µl ethidium bromide (1 µg/ml) le boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı (27,28).

Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, BX51, Japan) kullanılarak 400x büyütmeyle çekildi. Rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) la analiz edildi [30]. Hasar sperm başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü (31).

Tunel test yönteminin yapılması: DNA fragmanlı apoptotik hücreler Tunel metodu ile belirlendi (32). Özetle 5 µ kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon aşamalarından geçirildi ve oda sıcaklığında PBS'de 5 dk inkübe edildi. Proteinaz K ile 15 dk

inkübe edildikten sonra kesitler distile su ile yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini bastırmak için %30'luk H₂O₂ ile muamele edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitlerde Apoptozis detection kit kullanılarak boyamaya devam edildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler oda sıcaklığında Fast red ile tepkimeye girmesi sağlandı. Bütün inkübasyon basamakları nemli ortamda ve karalık odada yerine getirildi. Son olarak boyanan kesitler gliserol ile kapatıldı. Tunel + hücreleri belirlemek üzere hazırlanan preparatlar normal ışık mikroskopunda incelendi.

Histolojik inceleme: Testis dokuları %10 formol içinde fiske edildi ve parafin içinde tutuldu. 5 µm'de bölümlenme yapıldı, hemotoksilin ve eozin ile boyandı. Seminiferous tubules (DST) ve germinal hücre tabaka inceliklerinin (GCLT) çaplarının ölçümü için ve testis dokusundaki hasarları değerlendirmek için ışık mikroskopu kullanıldı. Hasarların derecesi hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) şeklinde sınıflandırıldı (33).

İstatistiksel analiz: Çalışılacak parametrelerin gruplar arasındaki farkı değerlendirildi. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Çalışma kapsamında elde edilen ölçüm değerlerinin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile istatistiksel olarak incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Deney sonuçları ortalama±standart sapma (SD) ile birlikte gösterildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

MEYVENİN METAL İÇERİĞİ

Tablo 1. Taflan meyvesi ve tohumunun major esansiyel element ve toksik metal içeriği

	Meyve		Tohum	
	Ort ± S.E.	Min - Maks.	Ort ± S.E.	Min - Maks.
Makro elementler				
Ca	210 ± 33	148 - 271	442 ± 69.61	357 - 650
Mg	10454 ± 217	9913 - 10845	21471 ± 465	20527 - 22726
K	67431 ± 2685	62527 - 73467	54553 ± 1472	50768 - 57787
Na	24 ± 1.35	21.19 - 26.66	2.49 ± 0.58	1.32 - 3.5
Mikro elementler				
Cu	11.99 ± 0.54	11.08 - 13.41	13.76 ± 1.49	9.92 - 16.14
Zn	3.75 ± 0.19	3.34 - 4.1	22.81 ± 2.24	19.31 - 28.75
Fe	7.94 ± 0.37	6.84 - 8.56	29.24 ± 0.64	27.48 - 30.53
Mn	1093 ± 248	643 - 1528	2753 ± 493	1932 - 3940
Co	0.06 ± 0.01	0.05 - 0.08	0.1 ± 0.03	0.04 - 0.18
Cr	0.11 ± 0.01	0.09 - 0.13	1.25 ± 0.06	1.09 - 1.38
Mo	0.35 ± 0.0	0.34 - 0.36	0.24 ± 0.06	0.14 - 0.44
Ni	2.46 ± 0.41	1.73 - 3.35	2.49 ± 0.54	1.56 - 3.8
Toksik metaller				
Al	Nd		Nd	Nd
Pb	Nd		Nd	Nd
Ag	Nd		Nd	
As	Nd		Nd	
Cd	Nd		Nd	
Hg	Nd		Nd	

Ort ± S.E.: Ortalama ± standart hata; Min-Maks: minimum-maksimum

DENEY HAYVANINDA OLUŞTURULAN DENEYSEL MODEL:

Grup 1 (K): sadece serum fizyolojik verilen kontrol grup.

Grup 2 (TM): toksik madde (**dimetoat**) verilen grup.

Grup 3 (ME): meyve ekstresi verilen grup.

Grup 4 (ME + TM): toksik madde uygulamasından 30 dakika önce meyve ekstresi verilen grup.

Grup 5 (Vit C + TM): toksik madde uygulamasından 30 dakika önce Vitamin C verilen grup.

Grup 6 (TM + ME): ilk bir ay boyunca sadece toksik madde verilen ve ikinci ay boyunca toksik madde verildikten 30 dakika sonra meyve ekstresi verilen grup.

Tablo 2. Grupların vücut ağırlıklarına ilişkin veriler (ortalama±standart sapma)

Gruplar	İlk vücut ağırlığı (g)	Son vücut ağırlığı (g)	Toplam ağırlık değişimi (%)
K	235.8±25.79	257.5±33.96	9.00±4.47
TM	274.5±20.25	301.1±23.20	11.09±6.61
ME	281.4±15.39	310.3±19.57	10.32±4.88
ME+TM	260.7±23.36	285.9±19.21	9.81±5.81
Vit C+TM	262.4±13.94	281.0±31.21	6.80±7.20
TM+ME	287.0±19.52	303.0±33.16	5.37±6.26

KARACİĞER TOKSİSİTESİNE İLİŞKİN BULGULAR

Biyokimyasal parametreler: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca dimetoat uygulanan grupta (grup 2) plazma AST, ALT, direkt-bilirubin, GGT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi, total-bilirubin düzeylerinde de artış belirlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yalnızca dimetoat verilen grup ile karşılaştırıldığında, karayemiş meyve ekstresi uygulanan gruplarda (grup 4 ve 6) ve Vitamin C verilen grup 5'te bu parametrelerin anlamlı şekilde normal düzeylerde olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Gruplar arasında ALP değerlerinde ise anlamlı farklılıklar gözlemlenmedi.

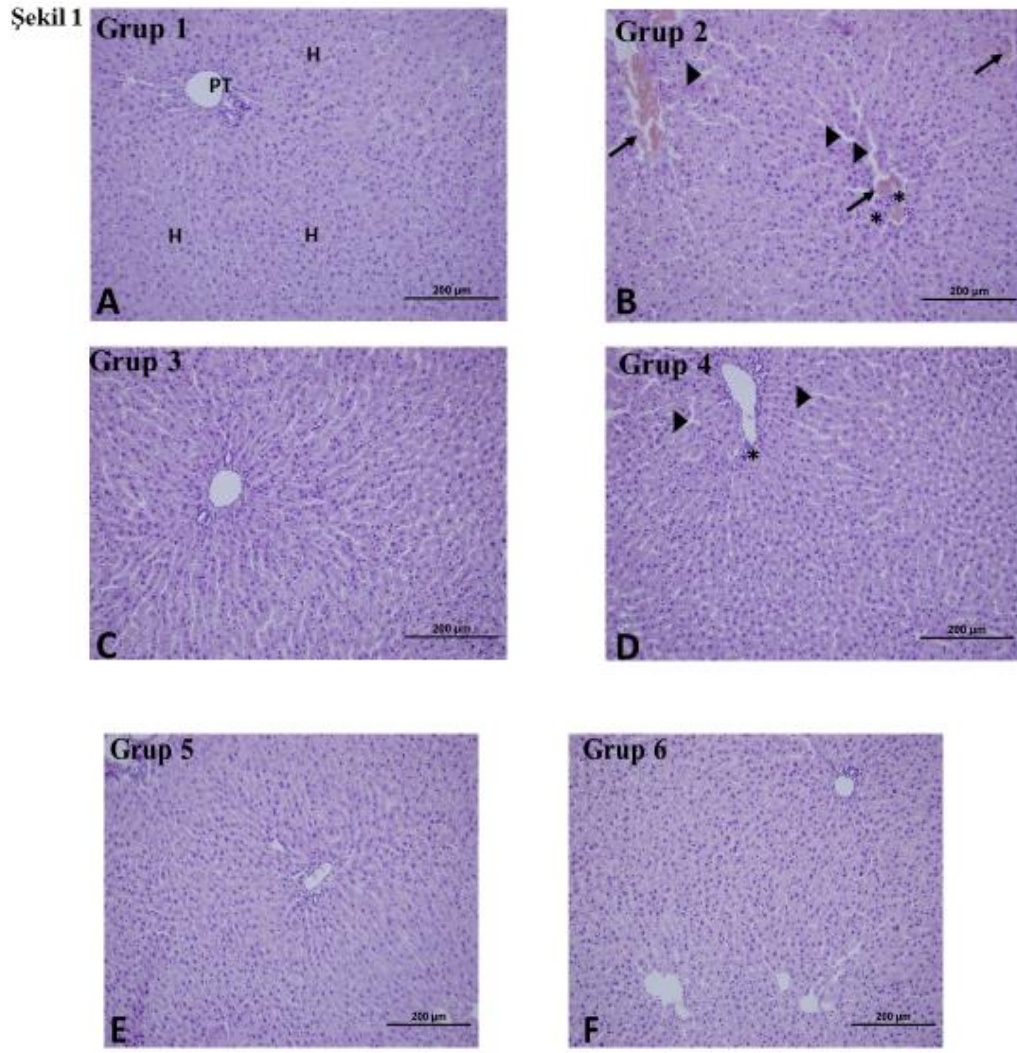
Oksidatif stres parametreleri: Yalnızca dimetoat uygulanan grupta hepatik TAC düzeyi azalırken TOS düzeyi artış gösterdi. Karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda ise TOS düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta hepatik MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalış gözlemlendi ($p<0.05$). Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda (grup 4 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme belirlendi ($p<0.05$). Gruplar arası karşılaştırmada NOx düzeylerinde belirgin anlamlılık tespit edilmedi ($p>0.05$).

DNA hasarının araştırılması: Comet testinden elde edilen verilere göre, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında rat hepatositlerinde DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi ($p<0.05$). Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında

dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında azalma belirlendi ($p<0.05$).

Histolojik bulgular: Şekil 1’de görüldüğü gibi, kontrol grubundaki sıçanlardan alınan karaciğer kesitleri normal karaciğer yapısı göstermiş, hepatik hücrelerin iyi korunmuş sitoplazma ve çekirdeğe sahip olduğu görülmüştür. Dimetoat uygulamasının ardından, karaciğer kesitlerinde kontrol gruplarına kıyasla birçok histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir. Hepatositler, sitoplazmik kofullaşma ile birlikte büyümüş görünümündeydi. Ayrıca genişlemiş konjesyonlu kan damarları, lenfosit infiltrasyonu ve hepatik yapının bozulması da gözlemlendi. İlave olarak fokal hepatosit nekrozu bulundu. Bununla beraber, dimetoatın karayemiş meyve ekstresi ile birlikte uygulanması, yalnız dimetoat grubuyla karşılaştırıldığında çok az patolojik değişiklikler gösterdi. Hayvanlara meyve ekstresi uygulanması herhangi bir patolojik değişikliğe neden olmamıştır ve karaciğer dokuları kontrol grubundakine benzer görünümündeydi.



Şekil 1. Sıçanların karaciğer kesit resimleri (A) Kontrol grubu sıçanı, normal histolojik yapılı hepatositler (H), portal triad (PT) ve kan sinüzoidi (B) (B) Dimetoat uygulanan grupta genişlemiş sinüzoidler (okun ucunda), konjesyona uğramış kan damarları (ok), lenfosit infiltrasyonu (yıldız). (C) Grup 3'teki karaciğerler normal yapıda. (D) Grup 4'te hepatositlerin çoğu normal histolojik morfolojide, ancak genişlemiş sinüzoidler (okun ucunda) ve lenfosit infiltrasyon alanı (yıldız) görülmekte. (E) (F) Grup 5 ve Grup 6'daki karaciğerlerin genel yapısı kontrol ve diğer bütün uygulama yapılan gruplarda normal görünümde (H&E, x200).

BÖBREK TOKSİSİTESİNE İLİŞKİN BULGULAR

Biyokimyasal parametreler: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca dimetoat uygulanan grupta (grup 2) plazma BUN ve kreatin değerlerinde istatistiksel olarak önemli artış gözlemlendi. Yalnızca dimetoat verilen grup ile karşılaştırıldığında, karayemiş meyve ekstresi uygulanan gruplarda (grup 4 ve 6) ve Vitamin C verilen grup 5'te bu parametrelerin anlamlı şekilde normal düzeylerde olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

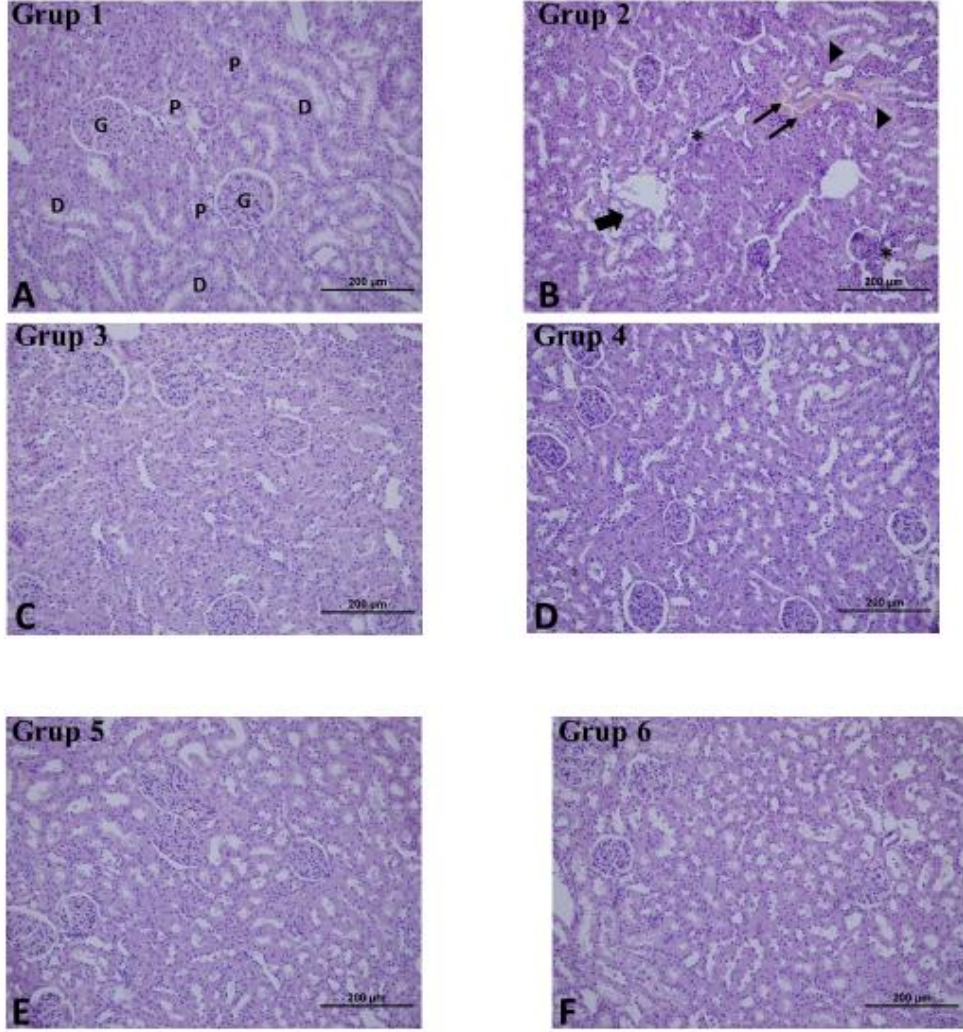
Oksidatif stres parametreleri: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta böbrek dokusunda MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalış gözlemlendi ($p<0.05$). Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda (grup 4 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme belirlendi ($p<0.05$).

DNA hasarının araştırılması: Comet testinden elde edilen verilere göre, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek dokusunda DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi ($p<0.05$). Ancak, yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında belirgin bir azalma gözlemlenmedi ($p>0.05$).

Histolojik bulgular:

Böbrek histopatoloji görüntüleri Şekil 2'de gösterilmektedir. Kontrol grubu sıçanlarının böbreklerinin histolojik incelemeleri normal böbrek morfolojisi göstermektedir. Işık mikroskopu incelemesinde, dimetoat grubunda kontrol grubuna kıyasla histopatolojik değişiklikler görülmüştür. Dimetoat uygulamasından sonra böbrek dokularında mononükleer hücre infiltrasyonu, glomerüler atrofi, konjesyon ve nekroz gözlemlenmiştir. Ayrıca karayemiş meyve ekstresi verilen gruplarda (grup 4 ve grup 6) grup 2'den daha az oranda glomerüler atrofi, konjesyon ve nekroz görülmüştür. Grup 3 ve grup 5'in böbreklerinin histolojik görünümü, kontrol grubuyla benzer görünümde-dir.

Şekil 2



Şekil 2. (A) Kontrol grubu sıçanlarının böbrek kesitinin fotomikrografı (P), distal tübülü (D) Bowman kapsülünün pariyetal katmanı ile glomerül (G). (B) Grup 2 sıçanlarının böbrek kesitinin fotomikrografında genişleme ve konjesyon (ok), nekroz (okun ucu), mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız) ve interstisyel alanda ödemsel değişiklikler (kalın ok). (C) Grup 3 sıçanlarında normal böbrek histolojisi görülmüştür. (D) Grup 4, (E) Grup 5 ve (F) Grup 6'da normal böbrek yapısı gözlenmiştir (H&E, x200).

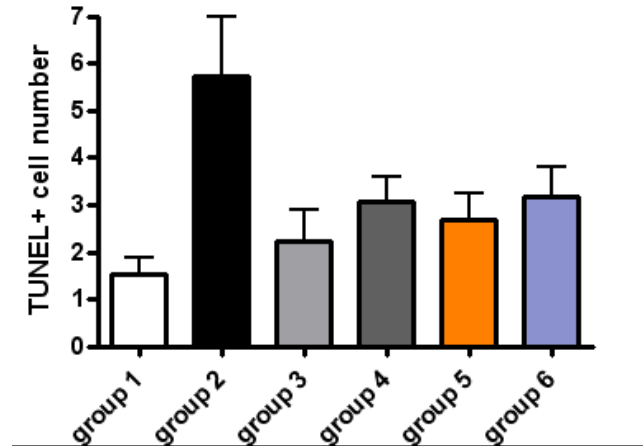
BEYİN TOKSİSİTESİNE İLİŞKİN BULGULAR

Oksidatif stres parametreleri: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta beyin dokusunda MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin azalış gözlemlendi ($p<0.05$). Yalnız dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin ve vitamin C'nin uygulandığı gruplarda (grup 4, 5 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme gözlemlendi ($p<0.05$).

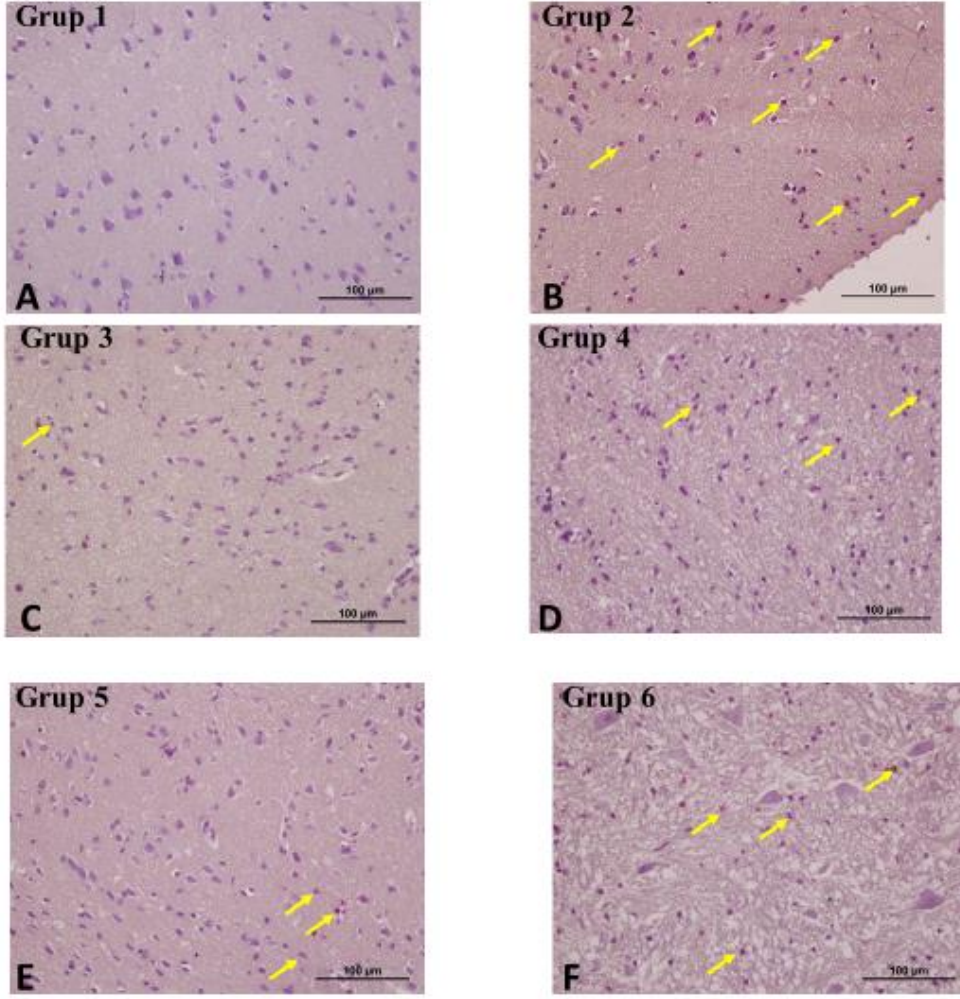
DNA hasarının araştırılması: Comet testinden elde edilen sonuçlar gösterdi ki, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin dokusunda DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi ($p<0.05$). Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında azalma belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 3. Karayemiş meyve ekstre ve dimetoat toksik madde uygulamasının beyin dokusuna etkileri

Gruplar	TUNEL+apoptotik germ hücre sayısı (ortalama±standart sapma)
Grup I (kontrol)	1.53±0.35
Grup II (toksik madde)	5.73±1.26
Grup III (meyve ekstre)	2.22±0.66
Grup IV (meyve+toksik madde)	3.08±0.50
Grup V (vitamin C+toksik madde)	2.68±0.56
Grup VI (toksik madde+meyve)	3.18±0.61



Şekil 3 TUNEL



Şekil 3 (TUNEL). Deneysel gruplarda apoptotik hücreler terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı digoksjenin-dNTP nick sonu etiketleme (TUNEL) ile etiketlendi.

(A) Kontrol grubunda (grup 1) sadece birkaç TUNEL pozitif hücre bulunmaktadır.

(B) Dimetoat uygulanan grupta (grup 2) çok sayıda TUNEL+ hücreleri.

(C) Karayemiş meyvesi uygulanan grup (grup 3).

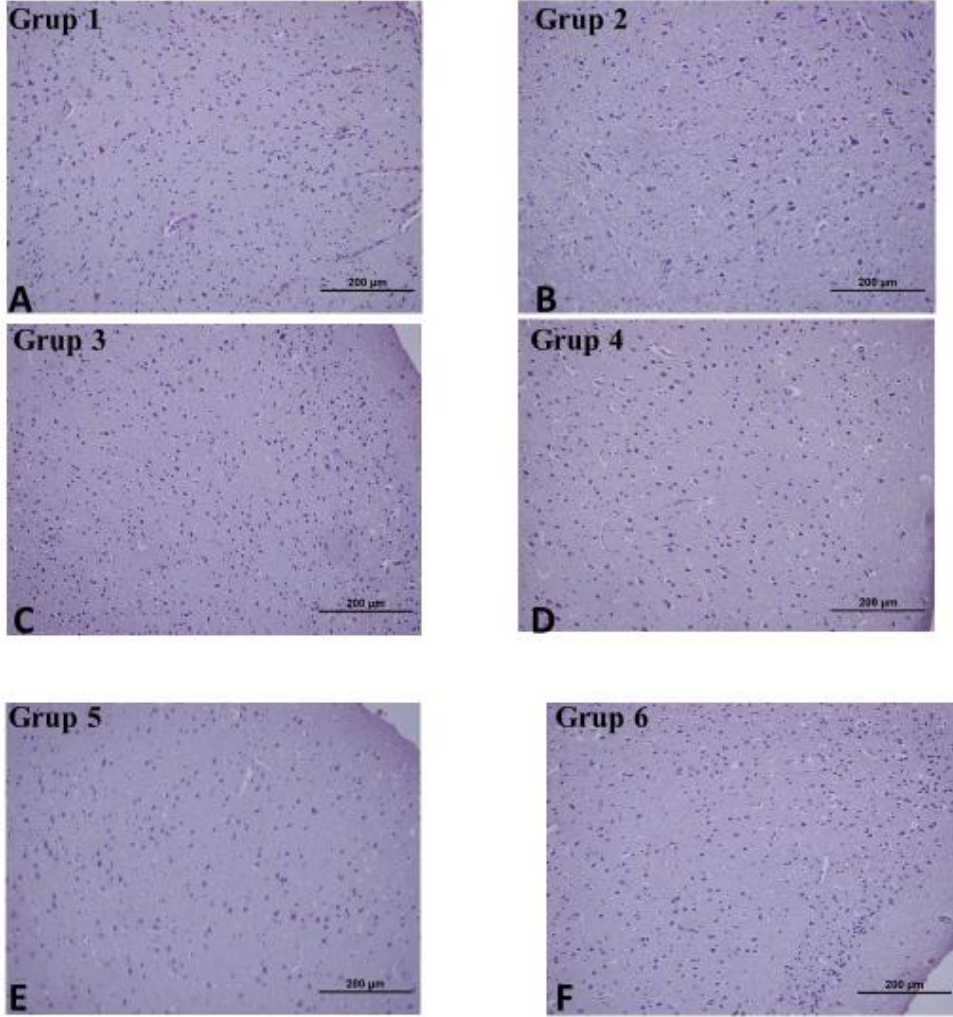
(D) Grup 4’de ve (E) grup 5’te TUNEL+apoptotik hücrelerde belirgin azalma.

(F) Grup 6’da TUNEL+ hücreler üzerinde karayemiş meyvesinin antioksidan etkileri.

Dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında bu grubun bölüm profillerinde (x400) TUNEL+apoptotik hücrelerde belirgin azalma.

Histolojik bulgular: Grup 2’de beyin dokusu, beyinin nöronlarında nükleer pykinosis dışında herhangi önemli bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubunda ve karayemiş meyvesi uygulanan gruplarda (grup 3, 4, 5 ve 6) sinirlerin hücre gövdeleri ile birlikte beyin serebrumu normal histolojik yapı göstermiştir.

Şekil 4



Şekil 4. Beyin dokusunun histopatolojik inceleme bölümü. (A) Kontrol grup, (B) Dimetoat grup. Ok; nükleer pykinosis hücre (C) Grup 3, (D) Grup 4, (E) Grup 5 ve (F) Grup 6 (H&E, x200).

TESTİS TOKSİSİTESİNE İLİŞKİN BULGULAR

Tablo 4. Mutlak üreme organ ağırlıkları üzerine farklı tedavilerin etkileri.

Gruplar	Mutlak üreme organ ağırlıkları (g)				
	Testis (Sağ+sol/2)	Tam epididimis (Right+left/2)	Sağ cauda epididimis	Seminal veziküller	Ventral prostat
Grup 1	1.339±0.003 ^a	0.516±0.035 ^a	0.202±0.001 ^a	1.137±0.039 ^a	0.544±0.019 ^a
Grup 2	0.878±0.012 ^d	0.260±0.010 ^d	0.111±0.007 ^d	0.761±0.007 ^d	0.298±0.003 ^d
Grup 3	1.394±0.021 ^a	0.521±0.002 ^a	0.210±0.001 ^a	1.245±0.002 ^b	0.562±0.025 ^a
Grup 4	1.151±0.027 ^b	0.416±0.008 ^b	0.157±0.001 ^b	1.090±0.025 ^a	0.402±0.002 ^{bc}
Grup 5	1.209±0.003 ^b	0.437±0.008 ^b	0.168±0.002 ^b	1.142±0.009 ^a	0.442±0.007 ^b
Grup 6	1.012±0.030 ^c	0.344±0.005 ^c	0.139±0.001 ^c	0.913±0.010 ^c	0.374±0.002 ^c

Veriler mean±S.E.M. olarak tanımlandı. Aynı sütunda farklı üst simge harfler (a, b, c, d) gruplar arası önemli farklılıkları göstermektedir (p <0.001).

Tablo 5. Bağlı üreme organ ağırlıkları üzerine farklı tedavilerin etkileri.

Gruplar	Bağlı üreme organ ağırlıkları [Mutlak organ ağırlığı (g) / son vücut ağırlığı (g) x 100]				
	Testis (Sağ+sol/2)	Tam epididimis (Sağ+sol/2)	Sağ cauda epididimis	Seminal veziküller	Ventral prostat
Grup 1	0.433±0.009 ^{bc}	0.167±0.005 ^{ab}	0.065±0.001 ^{ab}	0.369±0.017 ^b	0.176±0.007 ^a
Grup 2	0.379±0.014 ^d	0.113±0.007 ^c	0.047±0.003 ^c	0.328±0.012 ^c	0.129±0.005 ^b
Grup 3	0.456±0.013 ^{abc}	0.171±0.006 ^a	0.069±0.002 ^a	0.408±0.014 ^{ab}	0.184±0.010 ^a
Grup 4	0.474±0.041 ^{ab}	0.171±0.005 ^a	0.064±0.001 ^{ab}	0.448±0.014 ^a	0.166±0.003 ^a
Grup 5	0.477±0.016 ^a	0.172±0.004 ^a	0.066±0.001 ^{ab}	0.451±0.007 ^a	0.175±0.003 ^a
Grup 6	0.430±0.014 ^c	0.146±0.002 ^b	0.060±0.001 ^b	0.388±0.004 ^b	0.166±0.003 ^a

Veriler mean±S.E.M. olarak tanımlandı. Aynı sütunda farklı üst simge harfler (a, b, c, d) gruplar arası önemli farklılıkları göstermektedir (p <0.001).

Oksidatif stres parametreleri: Dimetoat toksik maddesi uygulanan grubun testis dokusunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı artarken, karayemiş meyvesi uygulanan gruplarda MDA düzeylerinin dimetoat verilen gruba göre önemli derecede azalış belirlendi (p<0.05). Yine aynı şekilde pozitif kontrol olarak uyguladığımız Vitamin C grubunda da MDA düzeyleri azalış göstermiştir. Toksik madde grubunun SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre azalış gösterirken, bu parametreler meyve ekstresi uygulanan gruplarda artış göstermiştir. Vitamin C verilen grupta da meyve ekstresi uygulanan grup ile aynı şekilde artış gözlenmiştir (p<0.05).

Sperm parametrelerinin değerlendirilmesi:

Tablo 6. Sperm parametreleri üzerin farklı tedavilerin etkileri.

Gruplar	Sperm parametreleri				
	Motilite (%)	Konsantrasyon (milyon/sağ cauda epididimis)	Anormal sperm oranı (%)		
			Baş	Kuyruk	Total
Grup 1	74.34±1.09 ^b	110.40±2.04 ^b	3.60±0.40 ^d	6.10±0.43 ^c	9.70±0.52 ^d
Grup 2	31.25±2.52 ^e	46.25±1.59 ^e	22.63±0.42 ^a	20.13±0.72 ^a	42.76±0.96 ^a
Grup 3	83.17±1.28 ^a	121.40±1.08 ^a	3.30±0.30 ^d	5.20±0.39 ^c	8.50±0.37 ^d
Grup 4	54.44±1.39 ^{cd}	91.78±1.35 ^c	7.67±0.44 ^c	8.78±0.40 ^b	16.45±0.56 ^c
Grup 5	56.67±1.31 ^c	94.11±1.95 ^c	8.33±0.58 ^c	9.22±0.52 ^b	17.55±0.90 ^{bc}
Grup 6	50.19±1.07 ^d	77.11±1.14 ^d	11.33±0.54 ^b	8.89±0.43 ^b	20.22±0.63 ^b

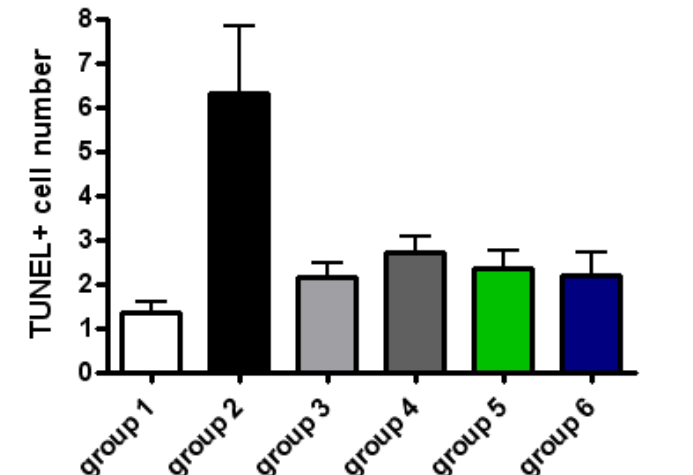
Veriler mean±S.E.M. olarak tanımlandı. Aynı sütunda farklı üst simge harfler (a, b, c, d) gruplar arası önemli farklılıkları göstermektedir (p <0.001).

DNA hasarının araştırılması:

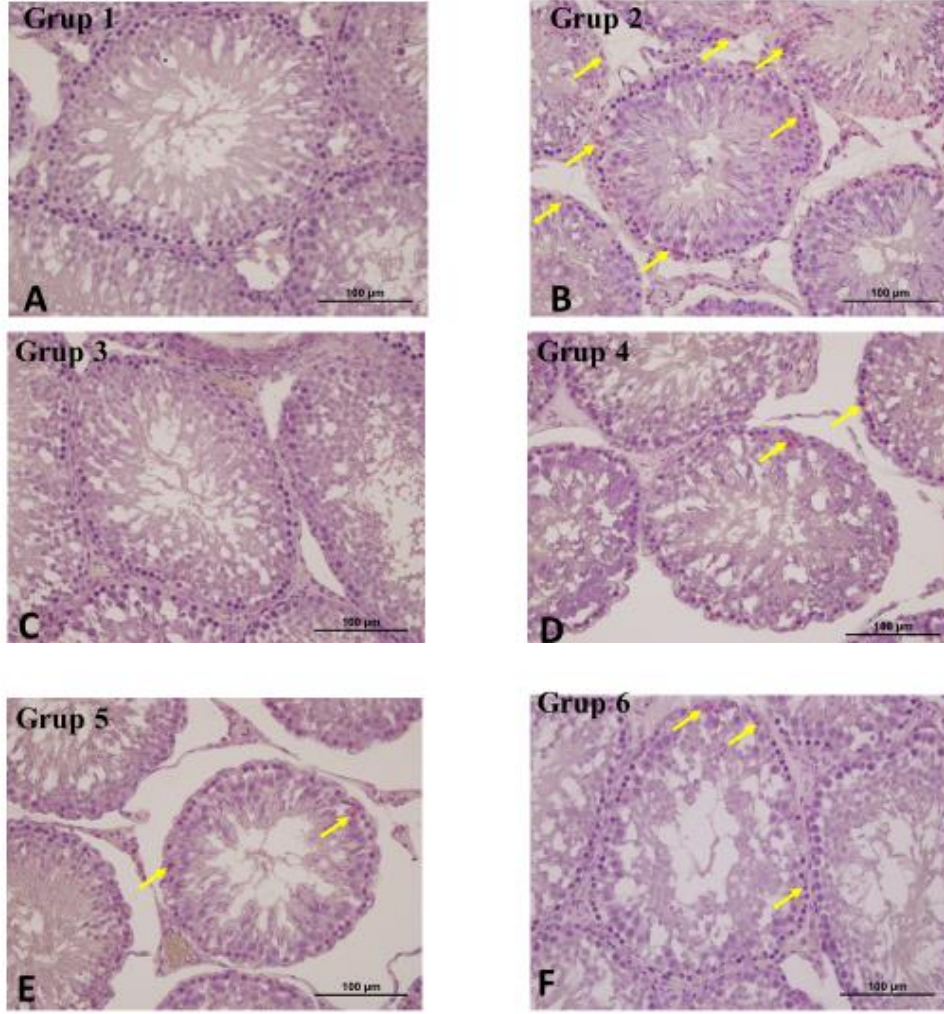
Tablo 7. Son vücut ağırlığı, TUNEL+apoptotik germ hücre sayısı ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine farklı tedavilerin etkileri.

Gruplar	Parametreler		
	Son vücut ağırlığı (g)	TUNEL+ apoptotik germ hücre sayısı	Sperm DNA fragmentasyonu (%)
Grup 1	310.30±6.19 ^a	1.57±0.28 ^b	1.04±0.02 ^d
Grup 2	233.75±7.64 ^b	6.07±0.42 ^a	11.95±0.16 ^a
Grup 3	308.00±9.22 ^a	1.86±0.30 ^{bc}	1.17±0.16 ^d
Grup 4	243.67±4.79 ^b	2.70±0.36 ^c	10.93±0.14 ^c
Grup 5	253.70±2.51 ^b	2.33±0.40 ^{bc}	11.36±0.18 ^{bc}
Grup 6	235.44±2.27 ^b	2.17±0.53 ^b	11.58±0.14 ^{ab}

Veriler mean±S.E.M. olarak tanımlandı. Aynı sütunda farklı üst simge harfler (a, b, c, d) gruplar arası önemli farklılıkları göstermektedir (p <0.001).



Şekil 5 TUNEL



Şekil 5 TUNEL. Deneysel gruplarda apoptotik hücreler terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı digoksinenin-dNTP nick sonu etiketleme (TUNEL) ile etiketlendi.

(A) Kontrol grubunda (grup 1) sadece birkaç TUNEL pozitif hücre bulunmaktadır.

(B) Dimetoat uygulanan grupta (grup 2) çok sayıda TUNEL+ hücreleri.

(C) Karayemiş meyvesi uygulanan grup (grup 3).

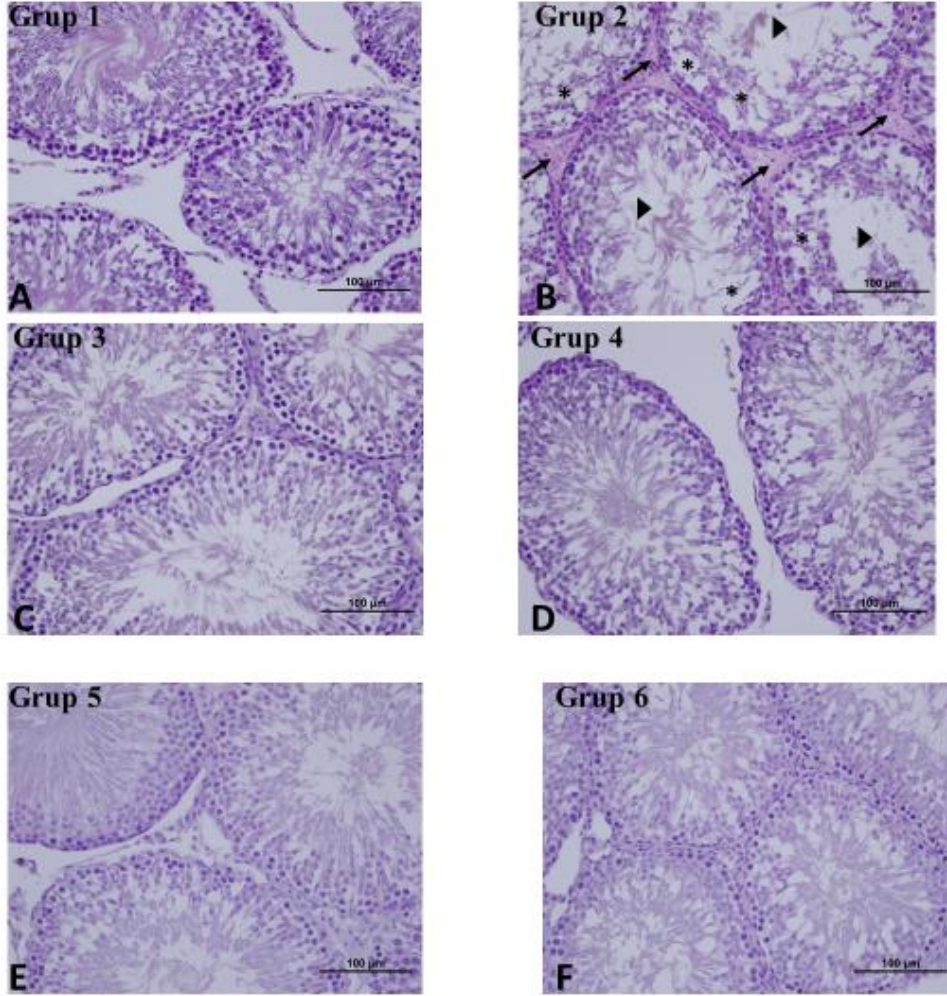
(D) Grup 4’de ve (E) grup 5’te TUNEL+apoptotik hücrelerde belirgin azalma.

(F) Grup 6’da TUNEL+ hücreler üzerinde karayemiş meyvesinin antioksidan etkileri.

Dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında bu grubun bölüm profillerinde (x400) TUNEL+apoptotik hücrelerde belirgin azalma.

Histolojik bulgular: Histolojik değerlendirme için testis kesitleri H&E ile boyandı ve her grubun testis dokusunun histolojik sonuçları Şekil 6'da gösterilmiŐtir. Kontrol grubuna ait doku kesitlerinde, çeşitli düzeylerdeki farklılaŐmada germ hücreleri içeren düzenli seminifer tübüler Őeklindeki morfolojiye sahip normal testis yapı gözlendi. Seminifer tübüllerde normal germ hücre polarite de iyileşme vardı. Germ hücreleri arasındaki sertoli hücrelerinin normal olduğu gözlendi. İnterstisyel dokuda Leydig hücreleri vardı. Hücre organizasyonu normal polaritede idi. Grup 2'de dimetoatla muamele edilen ratlarda, testiküler yapı hasar görmüŐtür. Bildirilen hasarlar arasında testiste; tahrip olmuŐ duvarlarıyla birlikte dejeneratif seminifer tübüller, kılcal tıkanıklık (kapiler konjesyon) ve kanama vardı. Grup 3'teki doku örneklerinde seminifer tübül morfolojisi ve interstisyum normal testiküler yapı gösterdi ve germinal epitel de bozulmamıŐtı. Grup 2 ile karşılaştırıldığında, karayemiş meyve ekstresi uygulanan gruplarda (grup 4, 5 ve 6) tübüler epitelde daha az atropik ve dejeneratif değişiklikler gösterirken, germinal epitel iyi organize olmuŐtu ve normal yapının interstisyel dokusu bu gruplarda kan damarları içeriyordu.

Şekil 6



Şekil 6. Deney gruplarında testis dokusunun ışık mikroskopisi. **(A)** Kontrol testisi normal seminifer tübül morfolojisi gösterdi. **(B)** Dimetoatla muamele edilen ratlarda testiküler yapı hasar gördü. Ok ucu: kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında daha az sperm içeren seminifer tübül lümeni; ok: kanama; yıldız: germinal hücrelerde deskuamasyon. **(C)** Testisin genel yapısı grup 3'te normaldi. **(D)** meyve ekstresi verilen grup 4'te dimetoat kaynaklı histopatolojik hasarda belirgin azalış vardı. **(E)** Grup 5 genel olarak normal seminifer tübül morfolojisi gösterdi **(F)** Seyrek dejenere tübüller ve histopatolojik değişiklikler grup 6'da büyük ölçüde azaldı (H&E, x200).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, dimetoatın indüklediği çeşitli doku hasarlarına karşı antioksidan etkili Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roem. syn: *Prunus laurocerasus* L.) meyve ekstresinin koruyucu/iyileştirici etkileri *in vivo* olarak araştırılmıştır. Bu nedenle 60 deney hayvanı 6 gruba ayrılarak dimetoat ve meyve ekstre uygulamaları 60 gün boyunca oral gavaj ile yapılmıştır. Pozitif kontrol amacı ile bir gruba da dimetoat ile birlikte vitamin C verilmiştir. Ayrıca, kurutulmuş karayemiş meyvesi ve tohumunda toksik metal ve esansiyel element içeriği indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) ile ölçüldü. Bu analiz sonucu karayemiş meyvesi ve çekirdeğinin çok sayıda esansiyel element içerdiği, toksik metalleri ise içermediği belirlendi.

Karaciğer toksisitesine ait sonuçlar:

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca dimetoat uygulanan grupta (grup 2) plazma AST, ALT, direkt-bilirubin, GGT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi, yalnızca dimetoat verilen grup ile karşılaştırıldığında, karayemiş meyve ekstresi uygulanan gruplarda (grup 4 ve 6) ve Vitamin C verilen grup 5'te bu parametrelerin anlamlı şekilde normal düzeylerde olduğu tespit edildi. Yalnızca dimetoat uygulanan grupta hepatik TAC düzeyi azalırken TOS düzeyi artış gösterdi. Karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda ise TOS düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta hepatik MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalış gözlemlendi. Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda (grup 4 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme belirlendi. Kontrol grubundaki sıçanlardan alınan karaciğer kesitleri normal karaciğer yapısı göstermiş, ancak dimetoat verilen grupta birçok histopatolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Hepatositler, sitoplazmik kofullaşma ile birlikte büyümüş görünümündeydi. Bununla birlikte, dimetoatın karayemiş meyve ekstresi ile birlikte uygulanması, yalnızca dimetoat grubuyla karşılaştırıldığında çok az patolojik değişiklikler gösterdi. Bizim çalışma ile uyumlu bir çalışmada, Saafi ve ark., (2011) dimetoat uygulamasının CAT aktivitesinde azalışa yol açarken MDA, AST, ALT, GGT, SOD ve GPx aktivitelerinde artışa yol açtığını belirlemişlerdir. Hurma meyve ekstresinin toksik madde uygulamasından önce ratlara verdiklerinde dimetoatın sebep olduğu karaciğer toksisitesini restore ettiğini tespit etmişlerdir. Özellikle lipit peroksidasyonu önlediği, histolojik değişimleri düzelttiği ve SOD, CAT ve GPX enzimlerinin aktivitelerinde iyileştirmeyi

sağladığını belirlemişler ve elde ettikleri sonuca göre *in vivo* hurma meyve ekstre uygulamasının oksidatif stres kaynaklı hepatotoksitesiyi önlemede kullanılabileceğini önermişlerdir (10). Çeşitli meyve ekstrelerinin antioksidan etkilerinden dolayı karaciğer toksisitesine karşı koruyucu/iyileştirici etkileri olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (13, 34-36).

Böbrek toksisitesine ait sonuçlar:

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yalnızca dimetoat uygulanan grupta (grup 2) plazma BUN ve kreatin değerlerinde istatistiksel olarak önemli artış gözlemlendi. Yalnızca dimetoat verilen grup ile karşılaştırıldığında, karayemiş meyve ekstresi uygulanan gruplarda (grup 4 ve 6) ve Vitamin C verilen grup 5'te bu parametrelerin anlamlı şekilde normal düzeylerde olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta böbrek dokusunda MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde azalış gözlemlendi ($p < 0.05$). Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda (grup 4 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme belirlendi. Böbrek histopatoloji görüntüleri Şekil 2'de gösterilmektedir. Kontrol grubu sıçanlarının böbreklerinin histolojik incelemeleri normal böbrek morfolojisi göstermektedir. Işık mikroskopu incelemesinde, dimetoat grubunda kontrol grubuna kıyasla histopatolojik değişiklikler görülmüştür. Dimetoat uygulamasından sonra böbrek dokularında mononükleer hücre infiltrasyonu, glomerüler atrofi, konjesyon ve nekroz gözlemlenmiştir. Ayrıca karayemiş meyve ekstresi verilen gruplarda (grup 4 ve grup 6) grup 2'den daha az oranda glomerüler atrofi, konjesyon ve nekroz görülmüştür. Grup 3 ve grup 5'in böbreklerinin histolojik görünümü, kontrol grubuyla benzer görünümde dir.

Beyin toksisitesine ait sonuçlar:

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dimetoat uygulanan grupta beyin dokusunda MDA düzeyi artış gösterirken, SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin azalış gözlemlendi. Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin ve vitamin C'nin uygulandığı gruplarda (grup 4, 5 ve 6) oksidatif stres durumunda anlamlı iyileşme gözlemlendi. Sharma ve ark. (2005) ve Sharma ve ark. (2005a), akut ve subkronik dimetoat maruziyetinin beyinde lipid peroksidasyona ve histolojik değişimlere yol açtığını bildirmişlerdir (11, 37). Grup 2'de beyin dokusu, beyinin nöronlarında nükleer pykinosis dışında herhangi önemli bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol

grubunda ve karayemiş meyvesi uygulanan gruplarda (grup 3. 4, 5 ve 6) sinirlerin hücre gövdeleri ile birlikte beyin serebrumu normal histolojik yapı göstermiştir.

Testis toksisitesine ait sonuçlar:

Dimetoat toksik maddesi uygulanan grubun testis dokusunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı artarken, karayemiş meyvesi uygulanan gruplarda MDA düzeylerinin dimetoat verilen gruba göre önemli derecede azalış belirlendi. Yine aynı şekilde pozitif kontrol olarak uyguladığımız Vitamin C grubunda da MDA düzeyleri azalış göstermiştir. Toksik madde grubunun SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre azalış gösterirken, bu parametreler meyve ekstresi uygulanan gruplarda artış göstermiştir. Vitamin C verilen grupta da meyve ekstresi uygulanan grup ile aynı şekilde artış gözlenmiştir. Farag ve ark. (2007) erkek farelerde dimotatin reproduktif toksisiteye yol açtığını, control grubu ile karşılaştırıldığında sperm üretiminde ve sperm motilite oranında azalışa yol açtığını bildirmişlerdir (38).

DNA hasarının belirlenmesinde kullandığımız Comet testinden elde ettiğimiz verilere göre, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında rat hepatositlerinde DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi. Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında azalma belirlendi. Comet testinden elde edilen verilere göre, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında böbrek dokusunda DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi. Ancak, yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında belirgin bir azalma gözlenmedi. Comet testinden elde edilen sonuçlar gösterdi ki, dimetoat uygulanan grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında beyin dokusunda DNA hasarında anlamlı artış tespit edildi. Yalnızca dimetoat uygulanan grup ile karşılaştırıldığında dimetoat ile birlikte karayemiş meyve ekstresinin uygulandığı gruplarda DNA hasarında azalma belirlendi. Hosseinzadeh ve Sadeghnia (2007), metil metansülfonatin yol açtığı DNA hasarına karşı *Crocus sativus* bileşeni olan safranın pre-uygulama ile fare karaciğerinde %21.58 ve böbrekte %25.88 oranında DNA hasarını azalttığını belirlemişlerdir (39). Tokaç ve ark. 2013 doğal bir bileşen olan kurkuminin DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini sıçan karaciğer ve böbrek dokularında gözlemlemişlerdir (40).

Çalışmamızda her bir deneysel grupta apoptotik hücre sayısında karayemiş meyve ekstresinin etkisi araştırıldı. Dimetoatın apoptozis indüklediğini belirlemek için TUNEL yöntemi kullanıldı. Beyin ve testis dokularında, kontrol grubunda TUNEL+hücre sayısında herhangi bir artış belirlemedik ancak dimetoat uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında artış belirledik. Bulgularımıza göre, dimetoat uygulanan grupların dokularında apoptotik hücre sayısında artış tespit edildi. Fakat, bu apoptotik hücre sayısında karayemiş meyve ekstre uygulanan gruplarda (grup 4, 5 ve 6) azalma belirlendi.

Sonuç olarak, tarım ve endüstride yaygın şekilde insektisit olarak kullanılan dimetoat, yaptığımız çalışmada karaciğer, böbrek, beyin ve testis gibi organ toksisitesine yol açtığını ve bu toksisitenin de oksidatif stres kaynaklı olduğu gözlenmiştir. Karayemiş meyvesinin antioksidan özelliği sayesinde çeşitli radikallere karşı radikal temizleme aktivitesinin olmasından dolayı çalışmamızda, çeşitli doku hasarlarına karşı meyvenin koruyucu/iyileştirici etkileri de belirlenmiştir. Yurt içi ve yurt dışı literatürleri incelediğimizde, gerek dimetoat toksisitesi gerekse karayemiş meyvesinin doku hararlarına karşı koruyucu/önleyici veya iyileştirici etkileri konusundaki çalışmalar sınırlı sayıdadır. Dolayısı ile bu çalışma literatürlerde yer alacak kapsamlı bir çalışma olmuştur. Elde edeceğimiz sonuçlar açısından literatüre katkı sağlayıcı özelliğinden dolayı, ileriki dönemde yapılabilecek projelerin üretilmesine zemin oluşturabilecek özelliktedir.

KAYNAKLAR

1. Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, (ilaveli ikinci baskı.), sayfa no. 350, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999.
2. İslam, A.: “Kiraz” cherry laurel (*Prunus laurocerasus*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 30;301-302, 2002.
3. Halilova, H., Ercisli, S.: Several physico-chemical characteristic of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits. Biotechnol and Biotechnol Eq., 24(3);1970-1973, 2010.
4. Ayaz, F.A., Kadioğlu, A., Hayırlıoğlu-Ayaz, S.: Determination of some low molecular weight carbohydrates in the fruits of wild cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) using gas chromatography. Tr.J.Of Botany, 22;65-68, 1998.

5. Kasım, R., Sülüšoğlu, M., Kasım, M.U.: Relationship between total anthocyanin level and colour of natural cherry laurel (*Prunus laurocerasus L.*) fruits. African Journal of Plant Science, 5(5); 323-328, 2011.
6. Kolaylı, S., Küçük, M., Duran, C., Candan, F., Dinçer, B.: Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) fruit grown in the Black Sea Region. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57;7489-7494, 2003.
7. Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F., Alasalvar, C. : Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. Food Chemistry, 99;121-128, 2006.
8. Yaylacı-Karahalil, F., Şahin, H.: Phenolic composition and antioxidant capacity of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) sampled from Trabzon region, Turkey. African Journal of Biotechnology, 10(72);16293-16299, 2011.
9. Özmen, G., Elcüman, E.A.: Endosülfan, dimetoat ve karbarilin erkek sıçanların kalp kası ve serum kalsiyum seviyeleri üzerine birlikte etkileri. Tr.J. of Biology, 22, 317-322, 1998.
10. Saafi, E.B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M.F., Hammami, M., Achour, L.: Protective effect of date palm fruit extract (*Phoenix dactylifera L.*) on dimethoate induced-oxidative stres in rat liver. Exp. Tox. Pathol., 63, 433-441, 2011.
11. Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Datta Gupta, S., Dogra, T.D.: Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. Toxicology 206, 49-57, 2005.
12. Ben Abdallah, F., Ben Slima, A., Dammak, I., Keskes-Ammar, L., Mallek, Z.: Comparative effects of dimethoate and deltamethrin on reproductive system in mal emice. Andrologia, 42, 182-186, 2010.
13. Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yeşilada, E., Çevik, C.: Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. Journal of Ethnopharmacology, 73, 121-129, 2000.
14. Wu, S-J., Tsai, J.Y., Chang, S.P., Lin, D-L., Wang, S-S., Huang, S-N., Ng, L-T.: Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. J Ethnopharmacol., 108,407-413, 2006.
15. Choi, E-M., Hwang, J-K.: Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. Phytother. Res., 19, 382-386, 2005.
16. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K.: Assay for Lipid Peroxides in Animals and Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, Anal Biochem.95:351-358, 1979

17. Fitzgerald, SP., Campbell, JJ., Lamont, JV.: The establishment of reference ranges for selenium. The selenoenzyme glutathione peroxidase and the metalloenzyme superoxide dismutase in blood fractions. The fifth international symposium on selenium biology and medicine. Tennessee, USA, pp20-23, 1992.
18. Pleban, PA., Munyani, A., Beachum, J.: Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem.*, 28:311-316, 1982.
19. Aebi, H.: Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121-6, 1984.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin's phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193, 265-275.
21. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:1011-5.
22. Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2003; 93:141-153.
23. Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male wistar rats. *Theriogenology* 2005;63:2063-72.
24. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008;89:1474-81.
25. Cerda H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 1998; 31: 89-92.
26. Türk Standardı, Gıda Maddeleri-İşinlanılmış Gıda Maddelerinin Belirlenmesi için DNA Komet Deneyi- Eleme Yöntemi, TS EN 13784 Aralık 2004, 1-3.
27. Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol* 1998; 444: 789-791.
28. Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* 1998; 13: 75-79.
29. M. Arabi, Bull spermatozoa under mercury stress, *Reprod. Dom. Anim.* 40 (2005) 454-459.

30. S. Sariozkan, F. Canturk, A. Yay, A. Akcay, The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored new zealand rabbit spermatozoa, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 18 (2012) 475–480.
31. F.F. Verit, A. Verit, A. Kocyigit, H. Ciftci, H. Celik, M. Koksall, No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility, *Arch. Gynecol. Obstet.* 274 (2006) 339–344.
32. Human Sperm DNA Fragmentation: Correlation of TUNEL Results As Assessed by Flow Cytometry and Optical Microscopy. David Domínguez-Fandos, María Isabel Camejo, José Luis Balleca, Rafael Oliva. *Cytometry Part A*, 71:1011-1018, 2007.
33. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practise of histological techniques*. London: Churchill Livingstone; 1990.
34. Bao, Li., Yao, X-S., Yau, C-C., Tsí, D., Chia, C-S., Nagal, H., Kurihara, H. Protective effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. *Agr Food Chem.*, 56:7803-7807, 2008.
35. Wu, Y., Li, L., Wen, T., Li, Y-Q. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 232:50-56, 2007.
36. Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chem. Tox.*47:702-708, 2009.
37. Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Nag, T.C., Dogra, T.D. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 215:173-181, 2005a.
38. Farag, A.T., El-Aswad, A.F., Shaaban, N.A. Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reproductive Toxicology*, 23:232-238, 2007.
39. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R. Effect of safranin, a constituent of crocus sativus (Saffron), on methyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in Mouse organs: an alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *DNA and Cell Biol.* 26:841-846, 2007.
40. Tokaç, M., Taner, G., Aydın, S., Ozkardeş, AB., DüNDAR, HZ., Taşlıpınar, MY., Arıkök, AT., Kılıç, M., Başaran, AA., Basaran, N. Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. *Food Chem Tox* 61:28-35, 2013.