

ARSENİK İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURAN
RATLARDA KARVAKROLÜN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Büşra BODUROĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

Tez No: 2022-024

Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESİN/GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Arsenik ve Oksidatif Stres Oluşturan Ratlarda Karvakrolün
Etkisinin Araştırılması**

Hazırlayan

Büşra BODUROĞLU

Danışman

Doç. Dr. Ulaş ACARÖZ

Tez No: 2022-024

Afyonkarahisar

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje no:
“20.SAĞ.BİL.11”**

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.././...

İmza

Büşra Boduroğlu

ÖZET

ARSENİK İLE OKSİDATİF STRES OLUŞTURAN RATLARDA KARVAKROLÜN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Arsenik, ametal ile metal arası bir özelliğe sahip olan doğada az bulunmasına karşın yer kabuğunun yapısında yaygın olarak bulunan metalloid yapıları ve metal elementlerinden biridir. Bilinen bir kanserojendir. Son yıllarda yapılan araştırmalarla karvakrolün etkili bir antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiş ve oksidatif stresi azalttığı, böylece istenmeyen durumların önüne geçilmesine katkı sağlayabileceği ifade edilmektedir. Bugüne kadar oksidatif stres kaynağı olarak arseniğin kullanımına karşı bazı maddelerin antioksidan etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmada da arsenik ile oksidatif stres oluşturan ratlarda karvakrolün potansiyel etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, toplam 42 tane Wistar albino türü erkek rat rastgele 6 eşit gruba ayrıldı. Yapılan çalışmada arsenik (100 mg/L) ile karvakrol sırasıyla 12,5; 25; 50 mg/kg dozlarda 28 gün boyunca gastrik gavaj yolu ile verildi. 28 gün sonunda kan, beyin, karaciğer, böbrek, akciğer, testis, kalp dokularından elde edilen bulgularda, redükte glutasyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve malondialdehit (MDA) değerleri incelendi. Aynı zamanda alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), serumda alanin aminotransferaz (ALT) düzey değerleri incelendi. Son olarak da ratlardan alınan karaciğer ve böbrek doku örneklerinden doku hasarı ile ilişkili olan histopatolojik incelemeler ve TNF- α , IFN- γ ve NFkB yangısal genlerinin moleküler analizi gerçekleştirilmiştir.

Arsenik, hayvanlarda belirtilen dokuların lipid peroksidasyonunda, MDA düzeyinin kontrole göre anlamlı düzeyde yükseldiği gözlemlendi. Arsenik verilen gruplarda kontrole göre GSH SOD, CAT değerlerindeki azalma istatistiksel olarak önem arz etti. Kontrol grubuna göre arsenik grubunun AST, ALT, ALP düzeylerinde artış saptandı. Arsenik ile oksidatif stres oluşturulup karvakrol verilen gruplarda ise AST, ALT, ALP düzeyleri kontrol grubundaki değerlere yakındı. Arsenik uygulaması IFN-

γ , TNF- α ve NFkB genlerinin ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna göre arttırdı. Histopatolojik inceleme sonucunda arsenik grubunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler karvakrol uygulaması ile kontrol grubuna yaklaştı.

Yapılan araştırma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi yapılarak, gruplar arası farklılıkların önemi ile parametreler arası ilişkiler saptanmış ve karvakrolün, arsenik ile oksidatif strese karşı olası koruyucu etkinliği belirlenmiştir. Sonuç olarak arsenik ile indüklenen oksidatif stres hasarına karşı karvakrolün etki pozitif yönde etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arsenik, Karvakrol, Rat, Oksidatif Stres, Lipid peroksidasyonu

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CARVACROL AGAINST ARSENIC INDUCED OXIDATIVE STRESS IN RATS

Arsenic is one of the metalloids and metal elements, which has a feature between nonmetal and metal, and is widely found in the structure of the earth's crust, although it is rare in nature. It is a known carcinogen. In recent years, it has been determined that carvacrol has an effective antibacterial activity and it is stated that it reduces oxidative stress, thus contributing to the prevention of undesirable situations. To date, the antioxidant effect of some substances against the use of arsenic as a source of oxidative stress has been investigated. In this study, it was aimed to investigate the potential effect of carvacrol in rats that caused oxidative stress with arsenic.

In the study, a total of 42 Wistar albino male rats were randomly divided into 6 equal groups. In the study, arsenic (100 mg/L) and carvacrol were found to be 12.5, respectively; 25; It was given by gastric gavage at 50 mg/kg doses for 28 days. At the end of 28 days, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) values were examined in the findings obtained from blood, brain, liver, kidney, lung, testis and heart tissues. At the same time, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and serum alanine aminotransferase (ALT) levels were analyzed. Finally, histopathological examinations related to tissue damage and molecular analysis of TNF- α , IFN- γ and NFkB inflammatory genes were performed from liver and kidney tissue samples taken from rats.

Arsenic was observed in the lipid peroxidation of tissues in animals, and the MDA level was significantly increased compared to the control. The decrease in GSH SOD and CAT values was statistically significant in the arsenic given groups compared to the control. Compared to the control group, AST, ALT, ALP levels of the arsenic group were increased. In the groups induced oxidative stress with arsenic and given carvacrol, AST, ALT, ALP levels were close to the values in the control group. Arsenic administration increased the expression levels of IFN- γ , TNF- α and NFkB genes compared to the control group. As a result of the histopathological examination, the histopathological changes in the arsenic group approached

the control group with the application of carvacrol.

The statistical evaluation of the data obtained as a result of the research, the importance of the differences between the groups and the relationships between the parameters were determined and the possible protective effectiveness of carvacrol against oxidative damage with tartrazine was determined. As a result, it was determined that carvacrol had a positive effect against arsenic-induced oxidative stress damage.

Keywords: Arsenic, carvacrol, rat, oxidative stress, lipid peroxidation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ÖNSÖZ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER	IX
RESİMLER	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller	1
1.2. Arsenik	2
1.2.1. İçme Suyundaki Arseniğin Toksik Etkileri	5
1.2.2. Arseniğin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
1.2.3. Arsenik Kaynakları	8
1.2.3.1. Doğal Kaynakları	8
1.2.3.2. Antropojenik Kaynaklar	8
1.3. Arseniğin Kronik Etkileri	11
1.4. Canlılar Üzerinde Etkisi	11
1.5. Arseniğin Gıdayla İlişkisi	12
1.6. Arsenik ve Karvakrolün Antioksidanlar ile İlişkisi.	13
1.7. Karvakrol	14
1.7.1. Karvakrol Tarihçesi ve Genel Özellikleri	14
1.7.2. Karvakrolün Halk Sağlığına Etkileri	15
1.8. Oksidatif Stres	17
2. MATERYAL ve METOT	20
2.1. Deney Hayvanları ve Etik Kurul Onayı	20
2.2. Çalışma Yöntemi	20
2.3. Deneysel Aşama	22
2.3.1. Anestezi Uygulaması ve sakrifikasyon	22

2.3.2.Histoplojik Değerlendirme	22
3.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler.....	23
3.3.1. Doku Homojenizasyonu.....	23
3.3.2. Katalaz Aktivite Tayini.....	23
3.3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini.....	24
3.3.4. Malondialdehit (MDA) Aktivite Tayini.....	24
3.3.5. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	24
4. Moleküler analizler	25
5. İstatistiksel Analiz.....	27
3.BULGULAR	28
3.1. Biyokimyasal Bulgular	28
3.1.1. CAT Aktivite Düzeyleri.....	28
3.1.2. SOD Aktivite Düzeyleri.....	28
3.1.3.GSH Düzeyleri.....	28
3.1.4. MDA Düzeyleri	28
3.1.5. Plazmada Karaciğer Enzim Düzeyleri	29
3.2. Histopolojik Bulgular.....	32
4.TARTIŞMA.....	41
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	45
6. KAYNAKLAR.....	47
7. EKLER.	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AS:** Arsenik
- ALP:** Alkalen Fosfataz
- ALT:** Alanin Aminotransferaz
- AST:** Aspartat Aminotransferaz
- ATP:** Adenozin Trifosfat
- CAT:** Katalaz
- DNA:** Deoksiribo Nükleik Asit
- GLA:** Gama Linoleik Asit
- GSH-Px:** Glutasyon Peroksidaz
- GSH:** Redükte Glutasyon
- GSSG:** Yükseltgenmiş Glutasyon
- KAR:** Karvakrol
- LPA:** Lipid Peroksidasyonu
- MDO:** Malondialdehit
- SOD:** Süperoksit Dismutaz
- TBA:** Tiyobarbütirik Asit
- TGK:** Türk Gıda Kodeksi
- ROS:** Reaktif Oksijen Türler
- ROO :** Peroksil radikali
- RNS:** Reaktif Nitrojen Türleri
- WHO:** Dünya Sağlık Örgütü
- %:** Yüzde

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1. Arsenik Genel özellikler	7
Çizelge1.2. Arsenik Fiziksel Özellikleri	7
Çizelge 6.1. Çalışmada kullanılan primer dizileri	27
Çizelge 6.2. Gruplara ve dokulara göre MDA düzeyleri	30
Çizelge 6.3. Gruplara ve dokulara göre GSH düzeyleri	30
Çizelge 6.4. Gruplara ve dokulara göre SOD enzim aktivite düzeyleri	31
Çizelge 6.5. Gruplara ve dokulara göre CAT enzim aktivite düzeyleri	31
Çizelge 6.6. Plazma AST, ALP ve ALT enzim aktivite düzeyleri (IU/L)	32

RESİMLER

SAYFA

- Resim 1. Beyin Dokusu Histopatolojik incelemesi-a** A3 (Beyin, Arsenik grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları 33
- Resim 2. Beyin Dokusu Histopatolojik incelemesi-b** A4 (Beyin, Arsenik+C25 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları kler. A5 (Beyin, Arsenik +C50 grubu); (İnce ok) Damarlarda hiperemi. A6 (Beyin, Arsenik+C100 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon 33
- Resim 3. Akciğer Dokusu Histopatolojik İnceleme-a** B3 (Akciğer, Arsenik grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi 33
- Resim 4. Akciğer Dokusu Histopatolojik İnceleme-b** B4 (Akciğer, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi. B5 (Akciğer, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma. B6 (Akciğer, Arsenik +C100 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma 34
- Resim 5. Kalp Dokusu Histopatolojik inceleme-a** C3 (Kalp, Arsenik grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları 34
- Resim 6. Kalp Dokusu Histopatolojik inceleme-b** C4 (Kalp, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerindehyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları. C5 (Kalp, Arsenik +C50 grubu);(Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları 34
- Resim 7. Karaciğer Dokusu Histopatolojik inceleme-a** D3 (Karaciğer, Arsenik grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuolerdejenerasyon alanları, (İnce ok) Vena sentralislerde hiperemi, (Okbaşı) Çiftçekirdekli hepatosit oluşumları 35
- Resim 8. Karaciğer Dokusu Histopatolojik inceleme-b** D4 (Karaciğer, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları.D5 (Karaciğer, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D6 (Karaciğer, Arsenik +C100 grubu); (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatositoluşumları 35
- Resim 9. Böbrek Dokusu Histopatolojik inceleme-a** E3 (Böbrek, Arsenik grubu); (Kalın ok) Damarlarda hiperemi, (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğundagenişlemeler 35
- Resim 10. Böbrek Dokusu Histopatolojik inceleme-b** E4 (Böbrek, Arsenik +C25 grubu);(İnce ok) Glomerulus kapillar 36

yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler. E5 (Böbrek, Arsenik +C50 grubu); (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler	
Resim 11. Testis Dokusu Histopalojik inceleme-a F3 (Testis, Arsenik grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları	36
Resim 12. Testis Dokusu Histopalojik inceleme-b F4 (Testis, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları. F5 (Testis, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları. F6 (Testis, Arsenik +C100 grubu); (Okbaşı) TSK lumeninde vakuolizasyon oluşumları	36
Resim 13. Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	37
Resim 14. Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	37
Resim 15. Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	38
Resim 16. Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	39
Resim 17. Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	39
Resim 18. Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi	40

1. GİRİŞ

1.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, fiziksel özelliklere bağlı olarak yoğunluğu 5 g / cm³'ten fazla olan metaller olarak tanımlanabilir. Ağır metaller arasında arsenik, krom, kobalt, kurşun, demir, kadmiyum, bakır, civa, nikel ve çinko gibi 60'tan fazla metal bulunur (Tufan, 2008). Yüzyıllardır insanlar etkilerini bilmeden silah, tabak, tencere, takı, su borusu ve benzer amaçlarla ağır metaller kullanılmıştır. Bu metal cevherlerin, insan faaliyetleri nedeniyle doğal çevrimler dışında pedosfere, atmosfere ve hidrosfere antik çağlardan itibaren yayılmaya başlamıştır (Tufan, 2008).

Tüm cansız ve canlı maddeler günlük hayatımızın bir parçası olan kimyasallardan oluşmaktadır. Üretilen her türlü ürün farklı kimyasal maddelerin bileşiminden oluşmaktadır. Kimyasal maddelerin birçoğu kullanımı doğru olduğunda hayatımızı ve sağlığımızı iyileştirebilir, ancak birçoğu özellikle yanlış kullanıldığında sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaktadır (Aybar vd., 2015).

Ağır metaller önemli çevre kirleticileridir. Toksisiteleri, ekolojileri, evrimleri, beslenmeleri ve çevresel sebeplerle giderek önemi artan bir konu haline gelmiştir (Jaishankar vd., 2013; Nagajyoti vd., 2010). Atık sudaki en yaygın ağır metaller, insan sağlığı ve çevre için risk oluşturan arsenik, çinko, kurşun, bakır, nikel, krom ve kadmiyumdur (Lambert vd., 2000). Ağır metaller çevreye insan faaliyetleri ve doğal yollarla girer. Farklı ağır metal kaynakları arasında madencilik, endüstriyel atıklar, toprak erozyonu, kentsel yüzey akışı yer kabuğunun doğal ayrışması hastalık kontrol ajanları veya ekinlere uygulanan böcek, kanalizasyon deşarjı toksik maddelerin küresel tüketimi ve üretimi sayılabilir (Morais vd., 2012).

Bu metaller hayvanlarda ve bitkilerde çok önemli biyolojik işlemlere sahip olsalar da, kimyasal koordinasyonları ve redoks özellikleri bazen onlara ek faydalar sağlar. Bu nedenle, bölümlendirme, taşıma, temel hücresel bileşenlere bağlanma ve homeostaz gibi kontrol mekanizmalarından kaçabilirler. Ağır metaller, doğal

olmayan protein bölgelerine bağlanır ve orijinal metalleri doğal bağlanma bölgelerinden değiştirerek nihayetinde toksisiteye ve hücrelerin arızalanmasına neden olarak bağlanır. Önce yapılan çalışmalarda, biyolojik makromoleküllerin oksidatif bozunmasının esas olarak ağır metallerin nükleer proteinlere ve DNA bağlanmasından kaynaklandığını bulmuştur (Flora vd., 2008).

“Ağır metal” terimi kimyada farklı tanımlara sahiptir, bu nedenle standartlaştırılmamıştır. Tıp, biyoloji ve tarımda kullanımı nispeten gevşektir. Örnek olarak tıp biliminde “ağır metal zehirlenmesi” gerçek ağır metallerin olduğu kadar; yukarıdaki bildirilen kimya tanımları göz önüne alınırsa ağır metal sınıfında olmayan berilyum, manganezin veya alüminyum aşırı miktarlarının yol açtığı sağlık problemlerini de içine almaktadır. Bununla birlikte, metalleri “toksik metaller” olarak etiketlemek başlı başına bir anlam ifade eder (Tufan, 2008).

Radyoaktif atıkların katı, sıvı ve toprak kirliliği, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini bozduğu bir sorundur. Son yıllarda hem dünyada hem de ülkemizde ciddi bir sorun olarak kabul edilmektedir. Yukarıda belirtilen bozulmaya neden olan en önemli faktör ağır metallerdir. Bu metaller, biyolojik gelişimde ve çevre kirliliğinde ekolojik dengenin bozulmasında önemli rol oynayan ana faktörlerden biridir. Demir (Fe), çinko (Zn), nikel (Ni), molibden (Mo), manganez (Mn), bakır (Cu), kobalt (Co), benzeri metaller bitki ve hayvanların gelişme, büyümelerinde aktif rol oynamakta olan mikro besin elementlerdir. Ek olarak arsenik (As), kadmiyum (Cd) civa (Hg) ve kurşun (Pb) gibi bazı ağır metaller canlıların gelişimi için yararlı olmayan elementlerdir. (Niess, 1999).

1.2. Arsenik

Arsenik, yer kabuğunda yaygın şekilde bulunan metalloid ve metal yapılı bileşikler yeraltındaki sular yoluyla çözünüp endüstriyel işlemler ya da çevreye yayılarak toksik etkilere sebep olmaktadır (Hughes vd., 2011). Arsenik de metalloid yapılı bileşiklerden biridir (Jomova vd., 2011; Hughes, 2002).

Yunan, Antik Çin ve Mısır uygarlıklarında kullanıldığı bilirse de 1250'li yıllarda Albertus Mangus tarafından ilk izole edilmiştir (Jomova vd., 2011; Hughes, 2002). İnsan vücudundaki en yaygın 12. element sırasındadır. Çoğu arsenik bileşiğinin tadı veya özel kokusu yoktur. Ortamdaki arsenik buharlaşmaz. Çoğu arsenik bileşik suda çözünmektedir. İçeren maddelerin yanmasıyla arsenik havaya salınır, havadan yere inip birikebilir ve parçalanmaz. Fakat arsenik bir türünden diğerine dönüşebilir. Solunum yolu ve sindirim sistemi tarafından vücuda alınmaktadır (Yılmaz ve Ekici, 2005). Sularda ve besinlerde bulunan yüksek düzeyde (60ppm) arsenik öldürücü olabilmektedir. Solunum yoluyla yüksek miktarlarda alınması solunum yollarında ve akciğerde yaralara neden olabilir (Tchounwou vd., 2003).

Elementler arasında yer kabuğundan en fazla bulunan arseniktir. Periyodik tablonun VA grubundaki arsenik, metal olmayan veya meteoroid olarak sınıflandırılır. Tarım, ilaç ve diğer endüstriyel sektörlerde hammadde olarak kullanılmasına rağmen insanlar dâhil farklı organizmalar üzerindeki toksik etkileri mevcuttur. Özellikle yeraltı suyu bazı bileşikleri ve mineralleri çözdükten sonra (örneğin arsenik toprak ve kayalardan geçtikten sonra), suda arsenik bulunur. (Başkan ve Pala,2009)

İnsanlarda ve hayvanlarda bulunan arsenik içeriğinin sabit olduğu, bitkilerde ve toprak tozunda eser miktarda arsenik bulunduğu uzun zamandır bilinmektedir. İnsan vücudunda toplam 20 mg olduğu tahmin edilmektedir. Tırnaklar ve saçlar dışında çeşitli organ ve dokulardaki dağılımının özelliği yoktur. İnsan saçı ve tırnaklarında büyük miktarda arsenik bulunur (Tufan, 2008).

Arsenik, doğada inorganik ve organik formlarda bulunabilen toksik metaldir olarak tanımlanır. Arsenik maruziyetinde endüstriyel ve çevresel nedenlerden dolayı olabildiği sayılır (Rahman ve Naidu, 2009). Parenteral yolla, gastrointestinal sistem ve solunum sistemiyle vücuda alınabilir. Arsenik maruziyeti kronik ve akut olabilir. Akut maruz kalındığında; paraliziler, kardiyak aritmiler, konvülyonlar, kusma, ateş meydana gelebilir. Kronik maruziyette hedef organlar esas olarak deri ve santral sinir sistemidir. Yorgunluk, baş ağrısı, halsizlik, uyku hali, irritabilite, ağrılı kas spazmları, ekstremitelerde pareteziler meydana gelebilir (Sinczuk-Walczak vd., 2010).

Arsenik, kronik aşamada kemik dokusunda birikir ve uzun yıllar burada kalabilir (Young ve Smith, 1942). Oksidatif fosforilasyon sürecinde arseniğin kemik dokusundaki fosforun yerini aldığı ve bu etkinin kemik dokusu üzerinde toksik etkisi olabileceği düşünülmektedir (Arena ve Drew, 1986).

Gıdalarda düşük miktarlarda bulunan ve doğada da çok yaygın bulunan bir element olan arsenik, kurşun ve civadan farklı olarak insanlar için inorganik arsenik formları, arsenik betain gibi organik formlara kıyasla daha tehlikeli olabilmektedir. Gıdalarda arseniğin bu iki formu (inorganik, organik) ortaya çıkmaktadır. İçme suyu, arseniğin en önemli kaynağıdır. Ortamda bulunan organik arseniğin balık ve deniz ürünlerinde yüksek miktarda birikimi tespit edilmiştir. Arsenik miktarı bitkilerde su kirliliği, gübre kullanımı, hava kirliliği ve toprağın içeriğine bağlı değişir. Epidemiyolojik çalışmalarda, inorganik arsenik bileşiklerinin alımının uzun süre akciğer kanserine neden olabileceği, diyetle alımın ise karaciğer, cilt, böbrek ve mesane kanserine neden olabileceği gösterilmiştir (Ayaz ve Yurttagül, 2008).

Arsenik, doğal dengeyi bozan kirleticilerden biridir. Doğal dünyadaki serbest özellikleri ve biyolojik yapılar üzerindeki farklı toksik etkileri nedeniyle hayvan ve insan sağlığı için hayati öneme sahiptir (WHO, 1990). Arsenikten kaynaklanan sağlık sorunlarının düzensiz ve kötü beslenmeyle arttığı, arsenik ve sigaranın akciğer kanseri oluşumunda sinerjik etkisi olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Yapılan bir çalışmada içme suları bakımından arsenik içeriği yüksek olan (ortalama 412 ppb) bir kasabada halk üzerinde yapılan kontroller sonucunda, proliferasyon yeteneğinde azalma ve lenfositlerdeki replikasyon indekslerinde anlamlı farklılıklar dikkat çekmiştir (Hopenhayn vd., 2003). Yüksek seviyelerde arseniğe maruz kalmanın çevreye, hayvan ve insan sağlığı üzerinde giderek artan olumsuz etkisi olduğundan endokrinleri yok eden maddelerde önemli bir rol oynamaktadır (Sajiki ve Yonekubo, 2003; Halden, 2010). Son zamanlarda yapılan araştırmalarla birçok alanda yaygın olarak kullanılan arseniğin çevresel konsantrasyonunun tehlikeli seviyelere ulaştığı tespit edilmiştir. Bu kimyasal maddenin çevre kirliliği, doğrudan veya dolaylı olarak endüstriyel ve evsel emisyonlar yoluyla meydana gelir. Hava kirliliği daha hızlı olmasına rağmen, su kirliliği daha tehlikeli ve kalıcıdır (Kang vd., 2007).

Arsenik, çevrede bulunan ve insan sağlığı üzerinde pek çok zararlı etkiye neden olabilen toksik bir ajandır. İnsanlar mesleki ve çevresel süreçler sırasında arsenik ve bileşenlerine maruz kalmaktadır (Ramanathan vd., 2003). Suda doğal olarak oluşmasına ek olarak, arsenik ayrıca endüstriyel atıklardan ve pestisitlerden su ortamına karışır (Friberg vd., 1979, Berman, 1980). Genotoksik olduğunu metillenmiş arsenik bileşikleri göstermiştir (Rızkı vd., 2006). Arsenik miktarı normalden fazla olan suların tüketilmesi haricinde arsenik düzeyi yüksek sularla sulanan tarım ürünlerinde besin zincirinde birikerek insana kadar ulaşmıştır. (Anderson ve Markham, 2006; Calvo vd., 2006).

Arsenik esas olarak gıda katkı maddeleri, böcek ilaçları ve herbisitlerin üretiminde, cam, kartuş ve bazı lazer ekipmanlarının üretiminde kullanılmaktadır. Arsenik bileşiklerinin %80'den fazlası yarı iletkenler, cam ve boya maddeleri gibi ürünlerin üretiminde ve metal alaşımların katkı maddesi olarak kullanılır. Arsenik ayrıca pestisitler, herbisitler ve mantar öldürücüler gibi tarımsal uygulamalarda da kullanılır. Ayrıca fare zehirleri, bazı antikanser ilaçlar, boyalar, duvar kağıtları, seramikler gibi çeşitli ürünlerin imalatında ve yün için ahşap koruyucu olarak kullanılır (Tchounwou vd., 2002).

1.2.1. İçme Suyundaki Arseniğin Toksik Etkileri

Doğal kaynaklar arasında canlılar için en önemli olan su, yeni doğmuş bir bebeğin vücudunda %75'i, , yetişkin erkek vücudunun %60'ını yetişkin kadın vücudunun %50-55'ini oluşturmaktadır. Tüm ihtiyaçlarla günlük ortalama kişi başı 200 litreye ulaşan su tüketimi ve günlük su ihtiyacı bir insanın 1,5-2 litre civarındadır. Suyun temel ihtiyaçların başında gelmesi ve tüketilmesi su kaynağıyla enfekte olan bazı hastalıkların yayılmasında ve ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Kıvanç vd., 1996).

Arsenik, çamaşır yıkama, el yıkama gibi temizlik amacıyla kullanımı zararlı olmazken; içme amacıyla kullanılması ve yemeklerde kullanımının zararlı olabileği gözlenmiştir. Sadece insanlar için değil, tüm canlılarda arseniğin toksik etkisi vardır. Arsenik maruziyeti süresine, formuna ve maruziyet dozuna bağlı olarak değişmektedir. İnsektisit olan arsenik triklorüreyle maruziyet durumunda temas

yerinde yanma ve bronkopnömoni gelişimi olduğu bildirilirken; hafif sarımsak kokulu ve renksiz arsin'in (yarı iletken sanayinde kullanılır) hemolize sebep olacak şekilde şiddetli sarılık ve anemi yaptığı bildirilmektedir (Wolz vd., 2009).

Bitkiler için arsenik miktarı çevresel etmenler, topraktaki arsenik miktarı, bitkinin bulunduğu coğrafi konuma göre farklılık göstermektedir. Denizde bulunan bitkilerde arsenik miktarı daha yüksek olmaktadır (Yağmur ve Hancı, 2002). Dünyada yapılan araştırmalardan, Bangladeş'te yapılan bir araştırmada 29 aile katılımıyla arsenikli su ile yetiştirilmiş pirinç kullanılmış ve pişirilmiş pirinçlerdeki yüksek seviyede arsenik bildirilmiştir (Ohno vd., 2009). Uzun süre ve kısa süreli maruziyette arsenik kalıntılı bitkisel ve hayvansal besinlerin tüketiminin insan sağlığı sorunlarına neden olmaktadır. Arsenik kontaminasyonlu su tüketen küçükbaş ve büyükbaş hayvanların ve bu hayvansal gıdaları tüketen insanların önemli izlenme ve rezidü çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Mezbahalar için sığırların kesim sonrası analizi, sağlıklı hayvanların karaciğerinde 8 ppm oranında arsenik ortaya çıkardı. (Serpen, 2008). Sonuç olarak vücuda girmiş arsenik, serum proteininin sülfidril (SH) grubuna bağlandığı için hücre metabolizmasını engellemiştir. Buna bağlı olarak, dolaşım bozuklukları, kapiller permeabilite bozulmakta, diğer doku ve sistem hasarları görüldüğü bildirilmektedir (Baş ve Demet, 1992; Chiou vd., 1995).

1.2.2. Arseniğin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Arsenik, yer kabuğunun geniş bir alanına dağılmış, yoğunluğu 5.78 g / cm³ ve yer kabuğunda ortalama 2 ppm konsantrasyona sahip bir metaloiddir (Volkan vd., 2006). Arsenik, doğada doğal olarak oluşan bir elementtir ve geniş çapta dağılmıştır. (www.atsdr.cdc.gov)

Çizelge 1.1. Arsenik Genel özellikler (Oliver, 2013)

İsim, Sembol, Atom Numarası	Arsenik, As, 33
Periyot, Grup, Blok	4. periyod, 5A grubu, p Bloğu
Atom Ağırlığı	74,92160 g/mol
Elektron Konfigürasyonu	[Ar]4s ² 3d ¹⁰ 4p ³

Çizelge 1.2. Arsenik Fiziksel Özellikleri (Oliver, 2013)

Oda koşullarında fiziksel hali	Katı
Yoğunluk (Oda koşullarında)	5,727 g/cm ³
Yoğunluk (Sıvı, Erime noktasında)	5,22 g/cm ³
Erime noktası	614°C (887 K, 1137°F)
Kaynama noktası	817°C (1090 K, 1503°F)

Kimyasal olarak hem metalik hem de metalik olmayan özelliklere sahip olduğu için metaloid olarak sınıflandırılır. Metalik arsenik olarak da adlandırılan arsenik elementi gri sert bir metaldir. Arsenik, doğada farklı bileşiklerde bulunabilir. Oksijen, kükürt ve klor ile birleştirilmiş arsenik formuna inorganik denir ve karbon ve hidrojen ile birleştirilmiş arseniğin formu organik arsenik bileşiği olarak adlandırılır(www.atsdr.cdc.gov). Dünya çapında oral yoldan alınan arsenik en toksik etki gösterirken, mesleki arsenik maruziyeti inhalasyonla akciğer solumasıdır. Çoğu organik ve inorganik arsenik bileşiği, buharlaşmayan toz, renksiz veya beyaz haldedir. Katıdır. Çoğunun belirli bir kokusu ve tadının olmaması maruz kalmayı kolaylaştırır (Hughes ve ark. 2011).

Arsenik hem kasıtsız hem de kasıtlı toksisitedir. Çevrede doğal varlığı, endüstride ve ticari ürünlerde kullanılması, halkın farkında olmadan arseniğe maruz kalmasına sebep olmaktadır (Hughes ve ark. 2011).

Arseniğin 200'den fazla mineral türü bulunmaktadır. Buna bağlı olarak doğada jeolojik olarak geniş alanlarda pentavalent ve trivalent formlarında yeraltı sularında ve yiyecekler mevcuttur. En çok bilinen mineral arsenopirittir (FeAsS) (Volka vd., 2006).

1.2.3. Arsenik Kaynakları

1.2.3.1. Doğal Kaynakları

Arsenik, toprakta özellikle bakır ve kurşun içeren minerallerde, bazı kaya türlerinde ve cevherlerde doğal haldedir. Yüzeysel akış ve yeraltında sızma nedeniyle rüzgârla taşınan toz suya ve havaya geçebilir (Chou ve Rosa, 2003).

Yerkabuğundaki toplam arsenik miktarı $4,01 \cdot 10^6$ kg, kilogram başına ortalama 6 mg olduğu tahmin edilmektedir. Deniz suyunda belirtilen arsenik konsantrasyonu 0.09-24 mg/L arasında değişir. Yüzeysel sularında arsenik, 0.15 – 0.45 mg/L arasındadır (Bissen ve Frimmel, 2003). Arseniğin bulunduğu doğal kaynaklar, volkanik kayalar, başkalaşım kayaları, deniz suyu, çöküntü kayaları (organik/inorganik killer), ılıcalar, mineral ve kaplıcalar arasında bulunur (EPA, 2003) Ayrıca doğal kaynaklar arasında kaya erozyonu, volkanik hareketler ve orman yangınları da bulunuyor (EPA, 2003).

1.2.3.2. Antropojenik Kaynaklar

Arsenik, doğal kaynaklarda yaygın bulunduğu kadar antropojenik(yapay) kaynakları da oldukça çeşitliliği mevcuttur. Arsenik içereği yüksek endüstriyel ürünler arasında kozmetikler, kâğıt ve kâğıt endüstride üretimi, , cam üretimi, ahşap, dericilik, kereste koruma işlemleri, çimento işletmeleri, boya işletmeleri, ilaç sanayi, yarı iletken madde üretimi, herbisit sanayi ve tıbbi kullanımlarında bulunmaktadır. Ayrıca zirai uygulamalar, fosil yakıtlar kullanımı, nikel, bakır, altın madenciliği, cevher, düzenli depolama sahası sızıntı suları ve tasfiye etme işlemleri de arseniğin antropojenik kaynakları arasında sayılır (EPA, 2002).

Arsenik, dünya üzerinde yaygın olarak dağılmış doğal bir elementtir. Serbest halde bulunan arsenik doğada iz miktarda bulunsa da arsenat ve arsenit filizleri şeklinde olan mineraller daha yaygın bulunur (Bissen ve Frimmel, 2003; Thirunavukkarasu vd., 2005). Doğal yollarla arsenik bağlı olduğu minerallere, maden filizlerinden ve kayalardan çözünebilir ve su ortamlarına geçmesi mümkün olduğu bildirilmiştir. Ayrıca antropojenik olarak lastik üretimi, petrol rafinasyonu, organik ve inorganik kimya endüstrileri, boya sanayi (tekstil boyaları, matbaa mürekkebi), cam ve seramik endüstrisi gibi arsenik kontamine olmuş atıkların çıktığı ve yeterince kontrol edilemeyen sektörler arsenik kirliliğine neden olabildiği bildirilmektedir (Banerjee vd., 1999; Viraraghavan vd., 1999; Bissen ve Frimmel, 2003). Bazı deterjanlar için yapısında arsenik bulaşığı sulara karışmasına sebep olabilmektedir (Banerjee vd., 1999; Viraraghavan vd., 1999). Ek olarak, birden fazla arsenik bileşiği (örneğin, herbisitler, pestisit gibi) içerebilen tarımsal böcek ilaçlarının kullanımı, sudaki diğer arsenik kaynaklarıdır. Özellikle tarımsal faaliyetlerde arsenik yüzey ve yeraltı sularına karışabilir (IRC, 2006) .

1.3. Arseniğin Kronik Etkileri

Genellikle içme suyundan kaynaklanan arsenik zehirlenmesi bu gruptadır ve kronik maruziyet altında küçük dozlarda (5-20 yıl, ortalama 10 yıl) ortaya çıkar. Arsenik saçta, tırnaklarda (beyaz çizgiler), ciltte ve iç organlarda birikir ve sistein proteinleri açısından zengindir. Tırnaklar günde yaklaşık 0.12 mm uzadığından, 100 gün boyunca tek doz arsenik alındıktan sonra bile tırnaklarda hala arsenik bulunabilir (Das ve Sengupta, 2008; Yağmur ve Hancı, 2002). Kamboçya'da yüksek arsenik içerikli su tüketen 97 kişinin saç ve tırnak muayenelerinde tırnak örneklerindeki arsenik içeriği 1.06-69,48 mg / kg, saç örneklerindeki arsenik içeriği 0.92-25,6 mg / kg olarak tespit edilmiştir. Organik arsenik, beynin lipit yapısında daha fazla birikme eğilimindedir (Mazumder vd., 2009).

İçme suyundaki arsenik konsantrasyonuna, alım süresinin uzunluğuna ve insanların beslenme durumuna göre toksisitenin keşfi, uzun süre 10 ppb'nin üzerinde içme suyu kullanan bireylere bağlıdır. Uzun süreli arseniğe maruz kalmanın ilk semptomları ciltte renk değişiklikleri ve cilt keratin dokusunda kalınlaşma ile

gözlenir. İştahsızlık, yorgunluk, mide bulantısı, kusma, kabızlık ve sindirim hastalıkları gibi bulgulara rastlanır. Uzun süreli arseniğe maruz kalma durumunda, kuluçka döneminden sonra kapillar permeabilite (kılcal geçirgenlik) bozular ve dolaşım hastalıkları gözlenir (Huang vd., 2009).

Arsenik hamile kadınlarda plasentadan kolaylıkla geçerek fetüste birikir ve emziren kadınların sütü ile bebeği etkilemekte olduğu, Bangladeş'in Matlab bölgesinde yapılan bir çalışmada, yüksek arsenik içerikli su tüketen 140 gebenin bebekleri üzerinde, timus gelişiminin ve interleukin-7 üretimi olumsuz etkilendiği ile birlikte bu durumda immün baskılamaya neden olabileceği bulundu (Ragib vd., 2009). Aynı bölgede yapılan bir başka çalışma, rahimde arseniğe maruz kalan 18 aylık 2400 çocuk üzerinde gerçekleştirildi; çalışma, idrar arsenik düzeylerinin diğer bölgelerdeki aynı yaştaki çocuklara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ortaya koydu. Bu çocukların idrar arsenik seviyelerinin de süttten kesildikten sonra önemli ölçüde düştüğü tespit edildi (Fangström vd., 2009).

Baltimore'daki Johns Hopkins Üniversitesi'nden doktorlarından Dr. Ana Navas-Acien ve arkadaşları tarafından Amerikalı yetişkinler üzerinde yapılan 2005 araştırmasında, idrardaki arsenik seviyesi ile tip 2 diyabetin başlaması arasında yakın bir ilişki olduğunu buldular. Tip 2 diyabetik hastalarda idrar arsenik seviyeleri, hasta olmayanlara göre %26 daha yüksektir. Araştırmacılar hücrelerde arsenik biriktiriyor; insülinin, glikozun hücreye emilmesine izin veren sinyal iletimini bloke ederek kan şekerinin enerjiye dönüşümünü engellediği söyleniyor (Navas-Acien vd., 2008).

1.4. Canlılar Üzerinde Etkisi

Dünya Sağlık Örgütü, içme suyundaki arsenik içeriğinin 10 µg / L olduğunu belirlemiştir. Raporlara göre, dünya çapında ortalama 41 milyon insan bu seviyenin üzerinde arsenikle kirlenmiş yeraltı sularından arseniğe maruz kalıyor (Nordstrom, 2002; WHO 2003).

70-180 mg arsenik almanın organizmalar üzerinde öldürücü etkisi vardır. Arsenik zehirlenmesinde, yutkunma güçlüğü, kas krampları, karın ağrısı, ishal, koma, susuzluk ve ölüm meydana gelebilir. Arsenik özellikle saç ve tırnaklarda birikerek cilt, akciğer ve mesane kanserine neden olabilir. Nefeste sarımsak kokusu,

ağır terleme, kas gszlğ, ciltte renk değişikliği, ellerde ve ayaklarda his kaybı ve ayakta dururken kangren belirtileri ortaya çıkar (ağlarırnak vd., 2010).

1.5. Arseniğin Gıdayla İlişkisi

Doğada genellikle belirli bir miktar arsenik bulunur ancak tarım ilacı kullanımı ve endüstriyel atıkların çevreye atılması nedeniyle toprak, su ve tahıllardaki arsenik içeriği artmıştır. Toprağı kirleten arsenik bitkiler aracılığıyla insanlara ve hayvanlara taşınabilmektedir. Topraktaki arsenik içeriği genellikle 6 $\mu\text{g/g}$ olmasına rağmen, topraktaki arsenik içeriği arsenik bazlı pestisitlerin kullanılması nedeniyle 500 $\mu\text{g/g}$ kadar yüksek olabilir. Yüksek miktarlarda arsenik hayvanlara ve insanlara taşınarak toprağı, suyu ve bitkilerin ve tahılların diğer çevresel kaynaklarını kirleterek zehirlenmeye neden olabilir (Yağmur vd., 2002; Navarro, 1993) Arsenik zehirlenmeleri şiddetli karın ağrıları, ateş, kusma, bulantı, boğazda sıkışma, ağız ve boğazda yanma, kolera benzeri ishal, ağızda metalik tat, iştahsızlık, yüzde solukluk, bacaklarda kasılma, reflekslerde yavaşlama, kansızlık, elektrokardiyogram bozukluğu, tırnaklarda çizgiler, soğuk ve ıslak deri, gözlerde çökme, karaciğer büyümesi, gırtlak ve karın ağrıları, periferik sinir sistemi zedelenmesi, deride siyah lekeler, zayıf ve düzensiz nabız, fel, dolaşım ve kalp yetmezliği, koma ve ölümle sonuçlanmaktadır . Arsenik, akciğer, kolon, karaciğer, böbrek, mesane ve kemik kanserlerine ve damar sertliğine neden olabilir (Vural, 1993). Arsenik bileşikleri özellikle cildi, gözleri ve solunum yollarını tahriş edicidir. İnsanlar su ürünlerinde (zellikle balıklarda), içme suyunda, şarapta ve diğer yiyeceklerde her zaman büyük miktarlarda arsenikle karşılaşırlar. EPA, içme suyundaki maksimum arsenik ieriğininin 10 ppb olduğunu belirlemiştir (Omaye, 2004).

Arsenikli cam imalatı, kurşun sertleştirme, anti bakteriyel madde üretimi, pestisit üretimi, hayvan yemi katkı maddeleri, pas nleme üretimi, tabaklama maddeleri, insan ve veteriner ilaçları, av tüfeği, kartuşlar, belirli alaşımların yüksek sıcaklık dayanımını iyileştirme, radyolojik teşhis yöntemleri, ilaç, tütün, pamuk ve pamuktaki izotoplar tarımsal pestisit üretiminde, odun korumasında ve diğer alanlarda kullanılmaktadır. Arsenikle kirlenmiş toprak, su ve hava arseniği kirletecektir. Sudaki ağır metal arsenik içeriği farklı oranlarda bulunur (Tchounwou vd. 2002).

1.6.Arsenik ve Karvakrolün Antioksidanlar ile İlişkisi

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak incelenirler: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) birinci derece enzimatlere ve glukoz 6- fosfat dehidrojenaz (G6PD) ikinci derece enzimatlere örnek gösterilmektedir (Pellegrini vd., 2009; Bhardwaj vd., 2006) Enzimatik olmayanlar ise; Vitamin (A, C, K ve E), mineral (Se, Zn), organosülfür bileşikleri (allium, allil sülfid, indoller), karotenoidler (β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin), düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH-Px, ürik asit), polifenoller ve antioksidan ko-faktörler (ko-enzim Q10) şeklinde incelenmektedir (Pellegrini vd., 2009; Cemeli vd., 2009). Ayrıca antioksidanlar; eksojen (karoten, C, A ve E vitamini), vitamin (C vitamini), protein (melatonin), endojen (melatonin, SOD, GSH-Px, CAT), iz element (Mg, Se) kompleks bileşik (kateşinler, epigallaktokateşin), hidrofilik (askorbik asit, ürat, flavonoidler), hidrofobik (β -karoten, α -tokoferol), direkt etkili (SOD, CAT), indirekt etkili (vitamin E) olanlar şeklinde gruplandırılabilir gibi, membran (vitamin A ve E, β karoten), sistem (Se, Zn) antioksidanları, sitosol (ko-enzim Q10) ve dolaşım (vitamin C, aminoasitler ve polifenoller) şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Cornelli, 2009).

Arseniğin ürettiği serbest radikallerin karşı antioksidan etkileri incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda, antioksidan özelliklere sahip olan vitamin C ve vitamin E'nin arseniğin meydana getirdiği oksidatif stresi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellediği, böylece plazma ve doku enzim düzeyleri normal biyokimyasal değerlere geldiği bildirilmiştir. Bu durum, uygulanan antioksidanların, arseniğin meydana getirdiği oksidatif stresi ve hücrel hasarı azaltmış olabileceğine yorumlanmıştır (Halliwell, 1996; Rinne ve ark., 2000; Duarte ve Lunec, 2005; Gupta ve ark., 2005; Al-Attar, 2011).

Bitkisel kaynaklı antioksidanların, enzimatik antioksidanlar kadar olmasa da oksidatif hasara karşı koruyucu etkili olduğu bilinmektedir (Wu and Ng, 2008). Günümüzde yapılan birçok çalışma, kalp, karaciğer, beyin, barsak ve böbreklerde İ/R hasarının bazı antioksidanlar ile belli ölçülerde önlenildiğini göstermektedir

(Kahraman, et al., 2003; Singh, et al., 2004). Hipoksiye bağlı böbrek hasarlarının patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (zer vd., 2005). Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun neden olduğu zararları hücresel bazda engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır. Araştırmamızda kulladığımız, kekik ana maddesi olan karvakrol serbest oksijen radikalleri ile etkileşim oluşturarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Ruberto vd., 1998) İnsan sağlığı bakımından antioksidan fonksiyonları ile ön plana çıkan maddeler E ve C vitaminleri, karotenoidler ve fenolik maddelerdir. Fenolik maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tosun ve Karadeniz, 2005). Doğal antioksidanların en önemli grubu olan fenolik maddelerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir (Aybek vd, 2005). Kekik yağının ve kekik suyunun ana bileşeni olan karvakrol (Car)'n çeşitli sentetik antioksidanlardan çok daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Uçucu bir monoterpen olan bu bileşik; antimikrobiyal, antifungal, doğal gıda koruyucu ve memelilerde yaşlanmayı geciktirici özelliklere sahiptir. Ayrıca karvakrolün güçlü bir antimutajenik ve antitümör etkilerinin olduğu ileri srlmştir (İpek vd., 2005).

1.7. Karvakrol

1.7.1. Karvakrol Tarihçesi ve Genel zellikleri

Karvakrol, kekik ve aromatik bitkilerin birçok uçucu yağ fraksiyonunun doğal bir bileşenidir. Karvakrol, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıdalarda kullanılmak üzere onaylanmıştır ve Avrupa Konseyi, Karvakrol B Sınıfı kimyasal tatlandırıcı olarak listelemiştir. Kavakrol; 2-p-izopropilfenol, 2-hidroksi-p-izopropil, izopropil-o-kresol, izotimol, 5-izopropil-2-Metil fenol adını da vermiştir. Moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dur (Vincenzi ve ark. 2004). Doğal bir anti bakteriyel bileşik olan Karvakrol; suda neredeyse çözünmez ancak eter ve alkolde znr. Donma noktası $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ve kaynama noktası yaklaşık $240 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Özgül ağırlık 0.980-0.983'tür (The Turkish Oregano Company).

Karvakrol, Thymus ve Origanum türündeki fenolik bir bileşik olan Karvakrolün

ana bileşenidir. Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkili olduğu için güçlü bir anti bakteriyel, antiparazitik, antitoksin, antimikrobiyal ve antifungal ajandır. Hidrofobik bir bileşik olduğu için esas olarak bakteri zarındaki proton enerjisini zayıflatır ve zardaki pH ve elektron akışını yok eder (Veldhuizen ve ark, 2006). Karvakrol, çeşitli aktivitelere sahip olması ve birçok antioksidan özelliğe sahip olması ve kimyasal yapısında hidroksil (-OH) bulunması nedeniyle bir antioksidan olarak düşünülebilir (Sökmen vd., 2004).

Karvakrol, doğada özellikle Lamiaceae'ye ait Satureja, Thymbra, Origanum, Coridothymus ve Thymus gibi çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında bulunur (Baytop, 1991; Vincenzi vd., 2004). Karvakrol ve timol, uçucu yağlarının%60'ından fazlasını oluşturur. Labiate ailesindeki tüm cins bitkilerin (kekik türleri dahil) ortak özelliği, çok sayıda uçucu yağların ana bileşeninin ve uçucu yağ içermeleri kekiğe benzersiz bir aroma veren Karvakrol olmasıdır (Baser, 2001; Baydar vd., 2004). Ayrıca Karvakrol, Carum, Anabsis, Mentha, Cinnamomum, Zea, Ocimum, ve diğer bitkilerden izole edilir (Golob vd., 1999). Raporlara göre Karvakrol, analjezik etkiye sahip bitkilerin ana bileşenidir ve bitkisel ilaçtaki Karvakrol içeriği arttıkça analjezik etkisi de artmaktadır. Bu nedenle Karvakrol, kekik esansiyel yağının analjezik etkisidir (Aydın ve Beis, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, KAR'ın insan sağlığını genotoksik maddelerden koruyabildiği ve in vitro DNA sentezini inhibe edebileceği bildirilmiştir (İpek vd., 2005).

1.7.2. Karvakrolün Halk Sağlığına Etkileri

Kekiği en temel ve etkili bileşeni karvakrol ve timol'dür (Zeybek vd., 2010). Fitoterapi alanında geniş tedavi yöntemi olarak kullanılmakta ve yaygın olarak Türkiye'de yetiştirilmektedir. Tıbbi amaçla kullanılacak kekikte en az %20 oranında karvakrolün olması beklenir. Ancak Türkiye'de bu oran %85'lere çıkmaktadır (Meriçli, 2010).

Kekik yağı birçok alanda kullanılmaktadır. Sadece tedavi edici bir madde olarak değil, aynı zamanda gıdanın bozulmasını önlemek için bir böcek ilacı ve herbisit

olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kekik yağının damıtılmasıyla elde edilen esansiyel kekik yağı ve kekik yağında biriken %0,1 oranında kekik yağı içeren kekik suyu hiperkolesterolemi, şeker hastalığı, mide bağırsak hastalıkları, üst ve alt solunum yolu hastalıklarında kullanılabilir (Baytop, 1999; Baydar, 2007; Başer vd., 1991; Tümen vd., 1994). Kullanımı bunlarla sınırlı olmayıp iştah açıcı, kalp damar hastalıkları, bağırsak parazitleri ve safra yolları hastalıklarında da kullanılır (Başer vd., 1991; Tümen vd., 1994; Işık vd., Rasooli vd.,2006; Kabouche vd., 2005; Hedhili vd., 2002).

Mercanköşk ve şerbetçiotu mercanköşkünde (Dittany of Crete) karvakrol miktarı sırasıyla %50 ve %70'dir (León-Rodríguez, 2008). Bazı in vivo ve in vitro çalışma, antibakteriyel, antiseptik, antioksidan, antispazmodik, büyüme dahil olmak üzere karvakrol besin maddesinin farklı biyoaktivitesini tanımlamıştır (Luna vd., 2010; Soltanab vd., 2011; Hashemipour vd., 2013; Bravo vd., 2014). Promotör, balgam söktürücü, antifungal, antiviral, anti-inflamatuar, immünomodülatör ve antitussif, kemopreventif, ayrıca rumen mikrobiyal fermantasyonunun değiştiricisi ve metan emisyonunun azaltılması. Karvakrol, üzerinde önemli biyoaktivitelere sahip bir moleküldür. Kanatlı ve hayvan fizyolojisi ve metabolizması, bu bileşik diyetle eklendiğinde kanatlı eti üzerinde antioksidan etkiye sahip olabilir. Karvakrol, hücresel membranların için oksidatif yıkımına yol açan lipid peroksidasyonu azaltılmasında oluşan doğal antioksidan maddeler kritik bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu bileşiklerin zararlı etkisinin toksik metabolitlerin (serbest radikaller) üretiminde artışa sebep olduğu ve ayrıca apoptoza yol açabildiği bildirilmiştir (Rhee vd., 1996; Yanishlieva vd., 1999). Bavadekar (2012) ise karvakrolün prostat kanseri hücrelerinde hücre ölümünü desteklediğini bildirmiştir. Bazı fitojenik katkı maddelerinin veya soğuk preslenmiş yağ, uçucu yağ veya ekstraktlar gibi ürünlerinin hayvan ve kanatlı diyetlerine canlı vücut ağırlığını, vücut ağırlığı artışını, yem dönüşüm oranını, bağışıklık tepkisini, antioksidan durumu, karkasları iyileştirdiği bildirilmiştir. Özellikler, kalite ve düşük morbidite ve mortalite oranları. Mevcut inceleme, hayvan ve kanatlı üretimi ve sağlığında karvakrolün etki mekanizmaları, metabolizması ve atılımı, biyolojik aktiviteleri ve faydalı uygulamaları dahil olmak üzere birçok önemli yönü kapsamaktadır (Ashour vd., 2014; Farag vd., 2014; Alagawany vd., 2015a, 2015b; Dhama vd., 2015).

Son yıllarda akciğer kanserinde görülme sıklığı artan adenokarsinomda KAR'ın kanser hücrelerinin sayısını azalttığı, hücrelerin morfolojisini bozduğu ve toplam protein oranını düşürdüğü gösterilmiştir (Koparal ve Zeytinoğlu, 2003). 2009 yılında yapılan bir araştırma, KAR suyu içen sıçanların karaciğer DNA'sı ve testis hücrelerinin, kontrol grubuna kıyasla hidrojen peroksit (H₂O₂) oksidasyonuna daha dirençli olduğunu göstermiştir (Slamenova vd., 2007). Raporlara göre Akdeniz bölgesinden toplanan kekikten damıtılan timol ve KAR uçucu yağları biyolojik toksisiteye sahiptir (Panizzi vd., 1993). Başka bir çalışmada, kekiğin 25 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir (Dorman ve Deans, 1993). KAR'ın gr (-) ve gr (+) bakteri türlerine karşı etkinliğini gösteren bir çalışmada, KAR'ın antibakteriyel etkilere sahip olduğu bildirildi (Marino vd., 1993). Yapılan diğer çalışmalarda ise karvakrolün *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* üzerine bakterisidal etkileri ispatlanmıştır (O'Gara vd., 2000; Burt ve Reinders, 2003).

Çalışmalar, sadece antibakteriyel etkilere sahip olmadığını, aynı zamanda antiparazitik ve antifungal etkilere de sahip olduğunu göstermiştir. Karvakrol ve timolün, mantar mikroorganizması *Aspergillus niger*'in organellerini, hücre zarlarını ve hücre duvarlarını yok ederek inhibe edici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Raoli vd., 2006). Bu uçucu yağlar baharatlarda bulur ve doğal antioksidandır. Kekikteki karvakrol, serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girer ve antioksidan aktivite gösterir. Karvakrolün antioksidan aktivitesinin sentetik antioksidanlardan daha yüksek olduğu görülmüştür (Schwarz vd., 1996). Çalışmalar, karvakrolün iyi bilinen askorbik asit ve vit-E kadar güçlü olduğunu göstermiştir (Aeschbach vd., 1994; Marwah vd., 2007).

1.8. Oksidatif Stres

Oksidatif stres: SOR, vücudun üç ana mekanizması olan enerji, reaksiyon ve metabolizma ile oluşur. Metabolik reaksiyon, SOR'un en önemli kaynağıdır. Yüksek reaktivitesi nedeniyle ortaya çıkan SOR, hücreler üzerinde zararlı etkilere sahiptir 4. Organların / dokuların, içsel oksidasyon ve antioksidanlar arasındaki dengeyi her bir hücrenin fizyolojik sınırları içinde tutması önemlidir (Pellegrini vd., 2009; Cemeli vd., 2009; Hassimoto vd., 2008). Oksidatif stres, oksidanlarla antioksidanlar

arasındaki dengenin bozulması (oksidan sistem için yararlıdır), lipid peroksidasyonu ve organizmada hücre hasarına neden olan serbest radikallerin / aktif oksijen ürünlerinin salınmasından kaynaklanır. Vücudun savunma mekanizması (antioksidan mekanizma) oksidatif strese direnmek için yeterli değilse hücrede oksidatif hasar meydana gelir ve fonksiyonu büyük ölçüde bozulur. Birçok hastalığın patogeneğinde yaşamsal önemi nedeniyle hastalığın şiddeti artmıştır. Bu mekanizma yaşlanma süreci ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, sepsis, nörodejeneratif hastalıklar, böbrek yetmezliği, kısırlık, kas ve karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalığın sebebinden sorumludur (Karataş ve Kamışlı, 2007; Ruiz vd., 2005).

Oksidatif stres, oksidan oluşumu ile birlikte antioksidan savunma dengesi oksidan yönünde bozulduğu zaman görülür. Oksidatif stres, başta yaşlanma, diyabet kanser, kalp hastalığı, ve diyabetik komplikasyonlar olmak üzere birçok patolojik durumun patogeneziyle yakından ilgilidir. Birçok deneysel kanıt, artan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretiminin ve zayıflamış antioksidan savunma yeteneklerinin bu karmaşık mekanizmaların temeli olduğunu göstermektedir (Atalay ve Laaksonen ,2002). Serbest radikaller, aerobik metabolizma sırasında hayvanlarda ve bitkilerde üretilir ve memelilerde ve bitkilerde lipid peroksidasyonuna, protein ve DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olur (Çaylak, 2011).

Diyette bulunan antioksidanlar, serbest radikalleri önlemede faydalıdır ve insanlarda birçok hastalık ve kanserin önlenmesinde önemli rol oynar. Serbest radikal üreten aşamalara (zincirde gerçekleştirilen lipid peroksidasyonu gibi) göre hareket ederler ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonunu doğrudan azaltarak serbest radikallerin ürettiği ilk serbest radikalleri nötralize ederler. Bu antioksidatif stres etkilerini gösteriyor. Geçiş metalleri ile şelatlayarak. Hayvanlarda ve bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan oksidatif savunma sistemlerinin mekanizmaları hakkında bilgi, gelecekteki araştırmalar için yararlı ilkeler oluşturacaktır (Çaylak, 2011). İnsan metabolizmasında oksijeni kullanan insan vücudunun normal sürecinde, reaktif oksijen türlerini oluşturmak için, peroksinitrit (ONOO-), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve singlet oksijen (1O₂) oluşan belirli faktörler tarafından teşvik edilir. ağır metaller, herbisitler, pestisitler ve çevreyi kirleten maddeleri tedavi etmek için kullanılan diğer birçok ilaç, örneğin insan vücudu ile etkileşime girerek aktif oksijen oluşumuna neden olur. Bu dış etkenlere ek olarak,

antibakteriyel savunma sistemi gibi birçok başka durum vücutta iltihaplanma Cinsel hastalıklar, kanser oluşumu ve yorgunluğa neden olan şiddetli egzersizler de aktif oksijen oluşumunu teşvik eder. Antioksidanlar aktif oksijen birikimini engelleyemezse insan ve hayvan metabolizmasında oksidatif stres varlığına neden olur (Anonim, 1994; Sies ve Stahl, 1995; Sies vd., 1998).

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik olduğundan, organizmalar onları etkisiz hale getirmek için savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bunlara "antioksidanlar" denir. Hücredeki ana antioksidan enzimlerin en önemlisi SOD'dir. Bakır ve çinko süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD), süperoksit radikallerini sitoplazmada hidrojen peroksit'e dönüştürür ve mitokondriyadaki manganez SOD'yi (Mn-SOD) hidrojen peroksit'e dönüştürür. Bir başka önemli antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). Enzim, oluşan H₂O₂'yi suya dönüştürür (Özgöçmen, 2007; Eriş, 2008). Oksidatif stres, DNA üzerindeki karbonhidratların, proteinlerin, lipidlerin ve reaktif oksijen türlerinin yok edilmesi olan peroksitler ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak da tanımlanmaktadır. Bunun nedeni, reaktif oksijen türlerinin (hidroksil radikalleri, süperoksit serbest radikalleri, hidrojen peroksit) üretiminin artması veya bu reaktif ürünlere karşı savunmanın azalması olabilir (McCord, 2000). Antioksidan içeriği azaldığında oksidatif stres oluşur. Bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivitesi hücre savunmasında çok önemlidir (Ince vd., 2010).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Deney Hayvanları ve Etik Kurul Onayı

Çalışma öncesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan (AKUHAYDEK) çalışma için Etik Kurul onayı alındıktan sonra çalışmada 200-300 g ağırlığında 42 Wistar albino türü erkek rat kullanılmıştır. Temin edilen ratlar gruplara ayrılarak deney sürecine alınmadan önce 7 gün süreyle ortama alışması sağlanmıştır. Ratlar deney hayvanları ünitesindeki kafeslerinde; 24±1 °C derece sıcaklıkta, 12 saat ışık/karanlık ve düzenli havalandırılan ortamda bulundurulmuştur. Ratlara karvakrol içeriği düşük yem ve ad libitum su verilmiştir. Günlük kontrolleri yapıp içme suyu her gün taze olarak verilmiştir.

2.2. Çalışma Yöntemi

Hayvanlar her grupta 7'şerli olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Toplamda 42 Wistar albino türü erkek rat kullanıldı. Deneysel aşamada, çalışmada kullanılacak olan Karvakrol (Nafees vd., 2013; El- Sayed vd., 2015) ve Arsenik (İnce vd., 2019) için seçilen dozlar daha önceden yapılmış çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Grup I- (Kontrol grubu) (düşük karvakrol içeren yem ve deiyonize su)

Grup II- (Mısır Yağı grubu) (1 ml)

Grup III- (Sodyum Arsenit + İçme Suyu 100 mg/L)

Grup IV- (Sodyum Arsenit 100 mg/L+ Karvakrol gastrik 12,5 mg/kg grubu- Sodyum Arsenit 1 ml mısır yağında çözdürülerek Karvakrol gastrik ise 1 ml suda çözdürülerek)

Grup V- (Sodyum Arsenit 100 mg/L+ Karvakrol gastrik 25 mg/kg grubu- Sodyum Arsenit 1 ml mısır yağında çözdürülerek Karvakrol gastrik ise 1 ml suda çözdürülerek)

Grup VI- (Sodyum Arsenit 100 mg/L+ Karvakrol gastrik 50 mg/kg grubu- Sodyum Arsenit 1 ml mısır yağında çözdürülerek Karvakrol gastrik ise 1 ml suda

çözdürülerek)

2.3.DENEYSEL AŞAMA

2.3.1. Anestezi Uygulaması ve sakrifikasyon

Deney aşamasında ratlara 28 gün sürenin tamamlanması ardından sakrifiye edilmeden önce 13 mg/kg i.m. Ksilazin uygulamasıyla preanesteziye alınacak ve sonra 87 mg/kg miktarında i.m Ketamin verilerek tam aneztazi uygulandı.

Anestezi sonrasında göğüs kafesi açılacak ve EDTA enjektörü ile intrakardiyal olarak 3-5 cc kan alındı. Bunun hemen sonrasında servikal dislokasyon yapılarak sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Kan örneklerinin plazmaları 3000 de 10 dakika santrifüj edilerek ayrılacak, plazmalar 1.5'lik ependorf tüplere alınarak analizleri yapılmaya kadar -80 °C de saklandı.

Ratlar sakrifiye edildikten sonra, daha önce açılmış göğüs kafesinin yanı sıra batın bölgesinden de cerrahi yöntemlerle karaciğerleri alındı. Her dokunun birer kısmı biyokimyasal ve moleküler incelemeler için -80 °C'de saklanırken, diğer kısımlar histopatolojik olarak takip edildi.

2.3.2.Histopatolojik Değerlendirme

Karaciğer, beyin, testis, akciğer, böbrek ve kalp dokularından histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri % 10'luk tamponlu formalin solüsyon kullanıldı. Formalinle sabitlenmiş numuneler 2-3 mm kalınlığa indirildi ve uygun boyuta getirildi ve doku takip kasetlerine yerleştirildi. Gece boyunca çeşme suyunda yıkandıktan sonra, 50, 70, 80, 96 ve mutlak etanol, ksilen, ksilenli parafin ve 56-58 °C'de parafin içinde 2 saat eritin, ardından parafinde bloke edin. Her parafin bloğundan (Leica, RM 2245) 5 mikron kalınlığında numuneleri kesmek için bir mikrotom kullanın ve bir su banyosundan (Leica, HI 1210) geçirin. On dakika (Thermo, Heratemp) etüvde kurularak histopatolojik incelemeye hazır hale getirildi. Tüm kesitler susuz, 96, 80, 70 ve 50 alkol serileri ve ksilen serilerinden geçirilerek yonteme göre hematoksil-eozin (HE) ile boyandı (Luna, 1968). Lekeli preparasyonlar binoküler ışık mikroskobu altında

incelendi. Gerekli görülen preparatlardan mikroskopik resimler çekildi. (Nikon DS Fİ3, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan).

3.3. Lipid peroksidasyon ve antioksiadan parametreler;

Doku ve kan örneklerinden; katalaz (CAT) glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve süperoksid dismutaz (SOD).

3.3.1. Doku Homojenizasyonu

Eritrositlerin hazırlanması için Winterbourn ve ark. (1975) örnek alındı. Öncelikle eritrositler, kan numuneleri (3500 rpm, 15 dakika, 4 °C) santrifüj edildi. Ardından 3 kez izotonik tuzlu su tampon çözeltisi (pH 7.4) ile yıkandı. Daha sonra eritrositler eşit hacimde izotonik salin tampon solüsyonu ile Eppendorf tüplerine alınarak, -20 °C'de flakonlarda saklandı. Analizden önce, eritrosit süspansiyonunun yok edilmesine soğuk deiyonize su kullanılmıştır. Ölçüm 3 gün sürede gerçekleşmiş ve bu süre boyunca 4 °C'de saklandı.

Doku örneklerinin hazırlanması İnce ve arkadaşlarına (2014a) göre yapıldı. Ratlar kurban edilmiş ve böbrekleri, karaciğer, kalp, beyin, akciğer ve testis dokuları, buz gibi soğuk bir izotonik tuzlu su tamponu kullanılarak doğrudan yıkandı. Doku örnekleri yabancı dokudan temizlendi ve soğutulmuş Tris-HCl tamponu (0.15 M, pH 7.4) içinde durulandı ve sonra kuru lekeli. Örneklerin homojenatları (%10, w/v) bir Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlandı. Daha sonra homojenize edilen dokular 4 °C'de 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi ve ölçüme kadar -20 °C'de saklandı. MDA, GSH, SOD ve CAT dahil olmak üzere lipid peroksidasyon parametrelerinin ölçümü için eritrositler ve doku homojenatları kullanıldı.

3.3.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Hidrojen peroksit ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorpsiyon görüldü. Uygun bir tampon içinde bulunan H₂O₂'nin örnekte bulunan CAT etkisi ile yıkımlanması sonucu bu maddenin 240 nm de neden olduğu absorbansta düşüş meydana geldi. Absorbansta meydana gelen düşüş hızı CAT aktivitesi ile orantılıdır (Luck, 1955; Aebi 1974).

3.3.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

SOD ve CAT, hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında rol oynar (Guerin vd., 2001). Doku homojenatı ve eritrosit lizatındaki SOD aktivitesi, Sun ve ark., (1988) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemin prensibi, bir süperoksit akışı oluşturan ve süperoksitin bir göstergesi olarak nitroblue tetrazolyumu (NBT) mavi formazon'a indirgeyen ksantin oksidaz ve ksantin arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçüldü ve SOD aktivitesi, eritrositte U/mgHb ve dokuda protein için U/ μ g ifade edildi.

3.3.4. Malondialdehit (MDA) Aktivitesi Tayini

MDA (Malondialdehit) seviyesi, lipit peroksidasyonunun (LPO) son ürünü olarak kullanıldı. Draper ve Hardley (1990) ve Ohkawa ve ark.(1979) 'nun kan örnekleri ve doku homojenatları sırasıyla MDA metoduna göre belirlendi. Bu tayin tiyobarbitürik asit ve MDA reaksiyonunun elde edilen rengini spektrofotometrik olarak ölçüldü. MDA konsantrasyonu, tiyobarbitürik asit-MDA kompleksinin (kanda nmol/ml ve ıslak dokuda nmol/g) absorpsiyon katsayısı olarak ifade edildi. Bu rengin absorpsiyonu spektrofotometre (Shimadzu, 1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak 532 nm'de ölçüldü.

3.3.5. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

GSH, reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan bir savunma sisteminin ana bileşenidir. Tüketimi oksidatif stres tarafından indüklenebilir (Guerin vd, 2001). Kan ve doku örneklerindeki GSH konsantrasyonu, Beutler ve arkadaşları, (1993) metoduna göre belirlendi.

Numune (0,2 ml) ve damıtılmış su (1,8 ml) birlikte karıştırılır, ardından numuneye 3 ml çöktürme solüsyonu (1,67 g HPO₃, 30 g NaCl, 0,2 g EDTA, 100 ml distile suda) eklenir. Bu solüsyon, yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra filtre edildi (Whatman No. 42). Daha sonra süzöntü (2 ml) başka bir tüpte 0.3 M Na₂HPO₄ (8 ml) ve 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (1 ml) ile karıştırıldı. Optik yoğunluğun spektrofotometrik olarak

belirlenmesi 412 nm'de (Shimadzu 1601 UV–VIS spektrofotometre, Tokyo, Japonya) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar nmol/ml kan ve nmol/g olarak ifade edildi.

4. Moleküler analizler

Alınan böbrek ve karaciğer örneklerinde doku hasarı ile ilişkili olan yangısal genlerin(TNF- α ve NF κ B) ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

RNA İzolasyonu, RNA'ların Kalite Kontrolü, DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi

Uygulamanın sonrasında ratlardan alınan doku örneklerinde karaciğer RNA later Solusyonuna (Thermo Fisher Scientific, USA) alındı, daha sonra -80°C'de uygulama yapılana dek saklanmıştır.

RNA izolasyonundaki aşamada -80°C'den çıkartılan dokular kullanıldı. GeneJet RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılıp RNA izolasyonu yapıldı. Ratların böbrek ve karaciğer dokuları izole edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi MultiskanTM FC Mikroplate Fotometre (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülüp, dokulara ve gruplara göre izole edilmiş RNA miktarları cDNA eldesinde toplam 1 μ g RNA olacak düzende hesaplanıp kullanıldı.

Elde edilen RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla 1 μ g kalıp RNA, 1 μ l 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 μ l RNaz içermemiş DNaz I (Thermo Fisher Scientific, USA) eklenerek, DEPC (dietyl pirokarbonat) ile toplam hacimin 10 μ l'ye tamamlayıp 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C'de inkübasyonda bırakıldı. DNaz I uygulanan RNA'dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) yardımıyla cDNA elde edilmiştir.

Primer Tasarımı

Deneyde kullanılmak için tasarladığımız primerler NCBI web sitesinden Rattus norvegicus'a özgü β -aktin, NF κ B, TNF- α , ve IFN- γ genlerine ait mRNA dizileri

kullanarak ve FastPCR 6.0 (Kalendar vd., 2009) bilgisayar paket programından yararlanılmış, kontrol edilmiştir. Gen bankası ve Primer dizileri numaraları Tablo 1’de verilmiştir.

Real-time PCR

Deney grupları arasındaki gen ekspresyon seviyelerinde oluşan farklılıkları belirlemek için gene özgü ve real- time PCR primerlerden yararlanılmıştır. Seçtiğimiz genlerin ve housekeeping gen (β -Aktin) ekspresyonu, ratların karaciğer dokularından alınan örnekler Bio RAD real-time PCR cihazın üzerinde incelenmiştir. Sonra Real-time PCR sonuçları analizinde Bio RAD CFX Manager 3.1 yazılımı kullanılıp gerçekleştirildi.

PCR karışımı, 1 μ l revers primer (10 pmol), 1 μ l forward primer (10 pmol), 10 μ l SybrGreen karışımı (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu, (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 μ l cDNA ve 7 μ l su eklenerek, toplam hacim 20 μ l’ye olacak şekilde ayarlandı.

Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü yararlanıldı. Hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak β -aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait β -aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, gruplar arasındaki farklılık ve ortalamalar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Duncan testi ile SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı.

Çizelge 6. 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri.			
Gen	Oligonükleotit Dizisi		Gen Bankası No
β-Aktin	F	GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	NC_005111.4
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	
NFκB			NM_199267.2
	F	TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC	
TNF-α	R	GGCCCCAAGTCTTCATCAGC	NM_012675.3
IFN-γ	F	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	NM_138880.3
	R	TTCACCTCGAACTTGCGA	

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

3.1.1. CAT Aktivite Düzeyleri

Arsenik uygulaması ile böbrek, kalp, karaciğer ve beyin dokularındaki CAT enzim aktivitelerinde belirgin düşüğe neden olup karvakrol eklenmesiyle enzim aktivitesinde olumlu yönde artış göstermekte, kontrol grubundaki değerlere yaklaştığı tespit edilmiştir.

3.1.2. SOD Aktivite Düzeyleri

Arsenik uygulaması ile dokularında böbrek, kalp, karaciğer ve beyin SOD enzim aktivitelerinde kontrol grupları ve karvakrole göre anlamlı azalmaya görülürken, karvakrol eklemesinden sonra SOD aktivitelerinde anlamlı artış tespit edilmiştir.

3.1.3. GSH Düzeyleri

Dokulardan testisler böbrek, kalp, karaciğer ve beyinde karvakrol grubu GSH değerleri kontrol grubunun değerlerine göre olumlu derecelerde yükseldiğini gözlerken, arsenik grubunda GSH seviyeleri kontrol ve karvakrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğü gözlemlenmiştir. Arsenik ve karvakrol grupları arsenik grubuyla karşılaştırdığımız da düşüş seviye gösteren GSH düzeylerinde olumlu artış olduğu ve hatta karvakrol grubu değerlerine yakınlaştığı belirlenmiştir.

3.1.4. MDA Düzeyleri

Arsenik verilerek doku ve kanda MDA düzeylerinde yükselme, karvakrol gruplarına göre anlamlı derecede artışa sebep olduğu gözlemlendi. Karvakrol ile farklı oranlarda tedavi edildiğinde ise MDA seviyelerinin arsenik grubuna nazaran anlamlı derecede kontrole yaklaştırıldığı belirlenmiştir.

3.1.5. Plazmada Karaciğer Enzim Düzeyleri

Arsenik verildikten sonra plazmadaki ALT enzim değerlerinde ve dokularda hasara bağlı olarak kontrol ve karvakrol gruplarına nazaran ciddi artışlara sebep olurken, karvakrol uygulamasından sonra ALT seviyelerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Plazmada AST enzim değerleri arsenik uygulaması ile kontrol ve karvakrol gruplarında anlamlı yükselmeler görülürken, karvakrol eklemesinden sonra plazma AST değerleri istatistiksel anlamda anlamlı ölçüde azaldığı ve karvakrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edilmiştir. Son aşamada plazma ALP enzim değerlerine gözleendiğinde arsenik uygulaması ile kontrol ve karvakrol gruplarına göre anlamlı artışlara sebep olurken, karvakrol tedavisinde istatistiksel olarak plazma ALP değerleri azaltarak kontrol grubundaki değerlerine yaklaştırmıştır.

Çizelge 6.2. Gruplara ve dokulara göre MDA düzeyleri

MDA	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	8,38±1,96 ^c	5,34±0,59 ^c	2,47±0,96 ^c	2,24±0,9 ^d	1,8±0,73 ^c	1,4±0,56 ^c	0,94±0,3 ^c
Yağ	8,65±1,73 ^c	5,88±1,98 ^c	2,58±0,93 ^c	2,27±0,65 ^d	1,89±0,66 ^c	1,48±0,62 ^c	1,03±0,32 ^c
Arsenik	20,46±6,41 ^a	10,2±1,76 ^a	7,99±1,83 ^a	5,82±2,1 ^a	5,04±0,76 ^a	3,9±1,66 ^a	2,32±0,82 ^a
Arsenik + Karvakrol 12,5 mg/kg	18,84±6,35 ^{ab}	9,39±3,68 ^{ab}	7,43±2,49 ^a	4,84±1,04 ^{ab}	3,78±1,23 ^b	3,26±1,32 ^{ab}	1,85±0,75 ^{ab}
Arsenik+ Karvakrol 25 mg/kg	16,09±6,91 ^{ab}	8,71±1,83 ^{ab}	6,86±2,71 ^{ab}	3,74±1,08 ^{bc}	2,89±1,23 ^{bc}	2,79±0,95 ^{ab}	1,73±0,51 ^{ab}
Arsenik+ Karvakrol 50 mg/kg	13,25±4,08 ^{bc}	7,63±1,99 ^{bc}	4,83±1,96 ^b	2,92±1,23 ^{cd}	2,73±0,98 ^{bc}	2,13±0,86 ^{bc}	1,43±0,49 ^{bc}

Çizelge 6.3. Gruplara ve dokulara göre GSH düzeyleri

GSH	Kan (nmol/ml)	Böbrek (nmol/g doku)	Karaciğer (nmol/g doku)	Kalp (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Akciğer (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	64,01±4,02 ^a	44,04±13,14 ^a	35,96±10,32 ^a	34,83±10,66 ^a	28,37±6,72 ^a	38,71±12,78 ^a	33,13±10,19 ^a
Yağ	63,98±7,57 ^a	40,15±16,78 ^a	35,77±12,78 ^a	34,15±4,55 ^a	27,62±6,68 ^a	38,2±7,75 ^a	32,67±6,82 ^a
Arsenik	49,93±4,96 ^c	17,45±3,27 ^c	20,31±8,5 ^b	15,71±4,16 ^c	15,75±3,82 ^c	23,54±7,68 ^b	18,34±3,51 ^c
Arsenik + Karvakrol 12,5 mg/kg	53,88±3 ^{bc}	19,75±5,19 ^{bc}	21,69±8,76 ^b	19,66±4,9 ^c	16,15±3,95 ^c	24,55±7,03 ^b	22,75±3,97 ^{bc}
Arsenik+ Karvakrol 25 mg/kg	55,81±7,79 ^{bc}	32,48±13,62 ^{ab}	26,62±10,45 ^{ab}	21,96±8,21 ^{bc}	19,42±4,81 ^{bc}	34,04±12,25 ^{ab}	26,22±7,47 ^{ab}
Arsenik+ Karvakrol 50 mg/kg	59,42±5,78 ^{ab}	36,83±14,09 ^a	33,25±7,91 ^a	30,42±12,17 ^{ab}	23,68±8,96 ^{ab}	36,59±11,59 ^a	28,08±4,76 ^{ab}

Çizelge 6.4. Gruplara ve dokulara göre SOD düzeyleri

SOD	Kan (U/gHb)	Böbrek (U/µg protein)	Karaciğer (U/µg protein)	Kalp (U/µg protein)	Beyin (U/µg protein)	Akciğer (U/µg protein)	Testis (U/µg protein)
Kontrol	118,58±25,55 ^a	21,35±4,02 ^a	17,55±5,91 ^a	17,82±6,5 ^a	12,71±4,62 ^a	26,7±7,67 ^a	6,77±1,79 ^a
Yağ	115,68±37,47 ^a	20,66±5,51 ^a	17,37±4,34 ^a	17,27±5,91 ^a	12,09±3,4 ^a	25,94±6,73 ^a	6,4±2,17 ^a
Arsenik	52,93±7,63 ^c	7,81±2,6 ^c	6,23±2,06 ^d	6,84±2,46 ^c	4,67±2 ^c	10,68±3,06 ^d	1,53±0,52 ^c
Arsenik + Karvakrol 12,5 mg/kg	62,77±21,38 ^c	8,48±3,08 ^c	8,87±2,58 ^{cd}	9,82±3,74 ^{bc}	6,54±2,8 ^{bc}	13,67±3,84 ^{cd}	2,84±1,14 ^{bc}
Arsenik+ Karvakrol 25 mg/kg	79,95±38,88 ^{bc}	11,49±4,51 ^{bc}	11,36±3,9 ^{bc}	10,77±3,72 ^{bc}	7,66±2,36 ^{bc}	17,81±6,28 ^{bc}	3,8±1,61 ^b
Arsenik+ Karvakrol 50 mg/kg	95,89±26,05 ^{ab}	16,12±6,63 ^{ab}	14,57±4,8 ^{ab}	13,56±5,59 ^{ab}	9,22±2,81 ^{ab}	21,02±4,62 ^{ab}	4,47±1,46 ^b

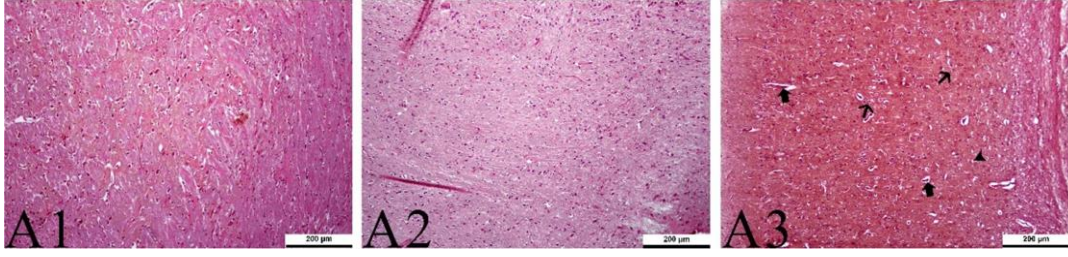
Çizelge 6.5. Gruplara ve dokulara göre CAT düzeyleri

Katalaz	Eritrosit(k/gHb)	Böbrek (k/µg protein)	Karaciğer (k/µg protein)	Kalp (k/µg protein)	Beyin (k/µg protein)	Akciğer (k/µg protein)	Testis (k/µg protein)
Yağ	31,34±11,75 ^a	17,44±5,17 ^a	12,61±4,67 ^a	13,07±5,18 ^a	15,82±4,69 ^a	13,29±3,78 ^a	9,4±3,47 ^a
Arsenik	30,17±6,7 ^a	17,11±6,38 ^a	12,34±3,38 ^a	12,38±4,87 ^a	15,18±3,86 ^a	13,19±5,47 ^a	9,15±3,56 ^a
Arsenik + Karvakrol 12,5 mg/kg	15,41±5,2 ^c	7,61±2,95 ^c	4,38±1,53 ^c	3,48±1,45 ^c	5,62±2,4 ^c	4,74±1,6 ^c	2,89±0,93 ^c
Arsenik+ Karvakrol 25 mg/kg	17,89±7,57 ^{bc}	8,93±3,07 ^{bc}	5,25±2,16 ^c	5,72±2,38 ^c	8,04±2,28 ^{bc}	6,06±1,78 ^c	4,18±1,65 ^c
Arsenik+ Karvakrol 50 mg/kg	20,34±8,26 ^{bc}	11,53±2,72 ^{bc}	7,22±2,41 ^{bc}	7,15±2,06 ^{bc}	10,1±3,89 ^b	8,89±3,71 ^{bc}	5,65±1,8 ^{bc}

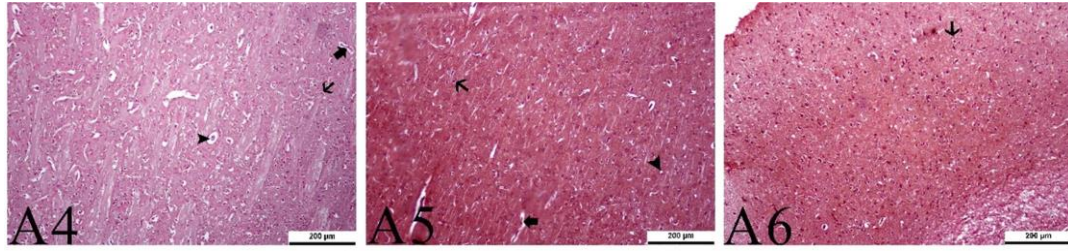
Çizelge 6.6. Plazma AST, ALP ve ALT enzim aktivite düzeyleri (IU/L)			
	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	ALT (IU/L)
Kontrol	90,56±24,16 ^c	82,11±22,45 ^b	32,4±6,88 ^c
Yağ	91,19±19,09 ^c	84,86±31,64 ^b	33,36±11,53 ^c
Arsenik	134,53±27,92 ^a	127,3±31,16 ^a	56,73±19,83 ^a
Arsenik + Karvakrol 12,5 mg/kg	124,54±22,18 ^{ab}	120,05±29,63 ^a	51,63±17,45 ^{ab}
Arsenik+ Karvakrol 25 mg/kg	118,19±21,6 ^{ab}	106,6±36,35 ^{ab}	40,1±14,18 ^{bc}
Arsenik+ Karvakrol 50 mg/kg	98,65±21,76 ^{bc}	95,65±21,76 ^{ab}	36,91±13,19 ^{bc}

3.2. Histopolojik Bulgular

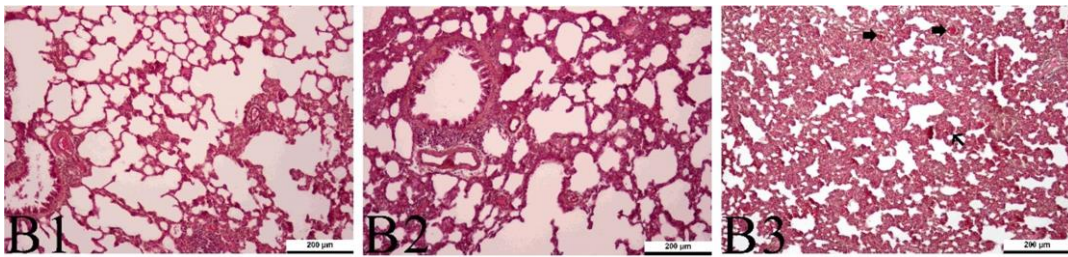
Karvakrol ve kontrol gruplarına ait hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerdeki beyin parankiminde damarlarda hiperemi, fokal glia hücre infiltrasyonu ve nöronlarda vakuolizasyon alanları izlendi. İntersitisyel alanda kalınlaşma, damarlarda hiperemi akciğer lobüllerinde, alveollerde ve ödem birikimi izlendi. Kalp dokusunda myokard hücrelerinde nekroz alanları ve hyalin dejenerasyonu çoklu yapıda değerlendirildi. Karaciğer hepatositlerinde vena sentralislerde hiperemi, vakuoler dejenerasyon alanları ve çift çekirdekli hepatosit oluşumları izlenildi. Damarlarda hiperemi, intersitisyel bölgede hemoraji alanı bowman boşluğunda genişlemeler ve böbrek glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon değerlendirildi. Testis hücreleri TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, düzensiz bazal membrana sahip TSK lümeninde ve TSK oluşumları vakuolizasyon oluşumları gözlendikçe yoğun düzeyde belirlendi.



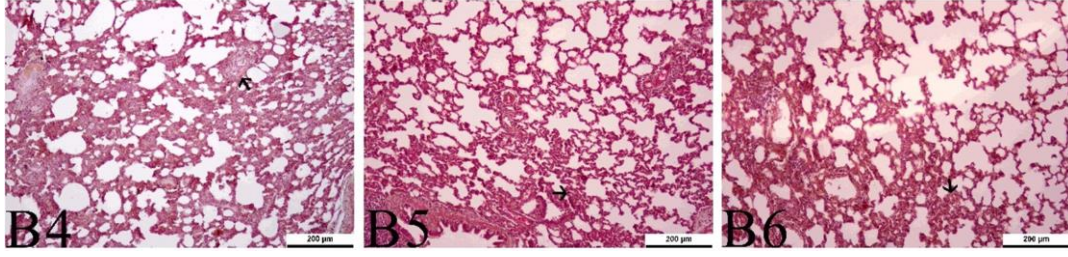
Resim 1. Beyin dokusu histopatolojik incelemesi-a A3 (Beyin, Arsenik grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları



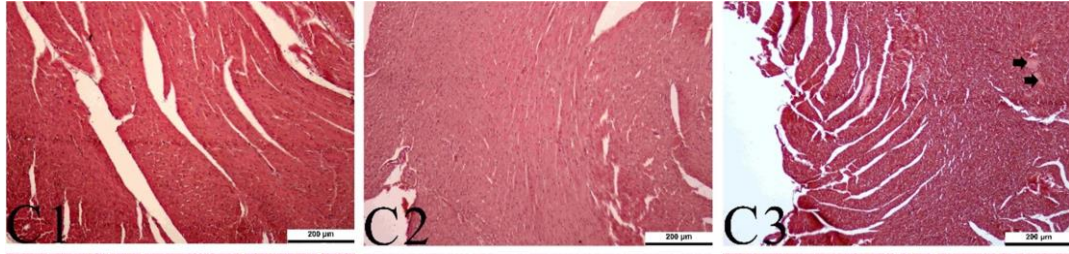
Resim 2. Beyin dokusu histopatolojik incelemesi-b A4 (Beyin, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Fokal glia hücre infiltrasyonu alanları kler. A5 (Beyin, Arsenik +C50 grubu); (İnce ok) Damarlarda hiperemi. A6 (Beyin, Arsenik +C100 grubu); (Kalın ok) Nöronlarda vakuolizasyon



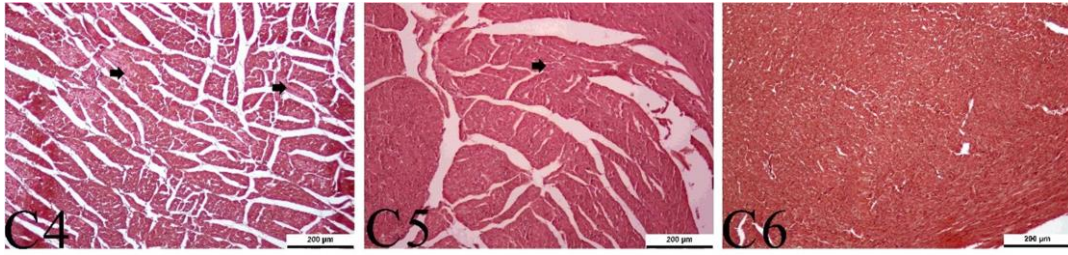
Resim 3. Akciğer dokusu histopatolojik incelemesi-a B3 (Akciğer, Arsenik grubu); (Kalın ok) İntersitysel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi



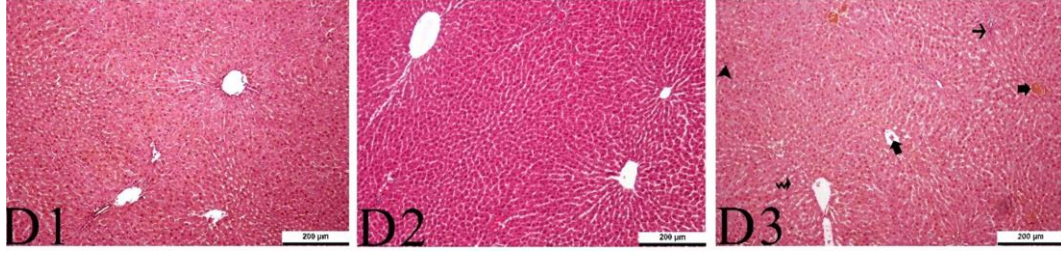
Resim 4. Akciğer Dokusu histopatolojik incelemesi-b B4 (Akciğer, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma, (İnce ok) Damarlarda hiperemi, (Okbaşı) Alveollerde ödem birikimi. B5 (Akciğer, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma. B6 (Akciğer, Arsenik +C100 grubu); (Kalın ok) İntersitisyel alanda kalınlaşma



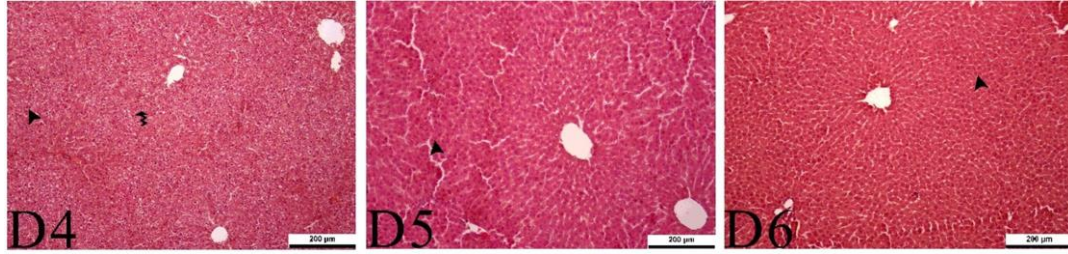
Resim 5. Kalp Dokusu Histopatolojik incelemesi-a C3 (Kalp, Arsenik grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalindejenerasyonu ve nekroz alanları



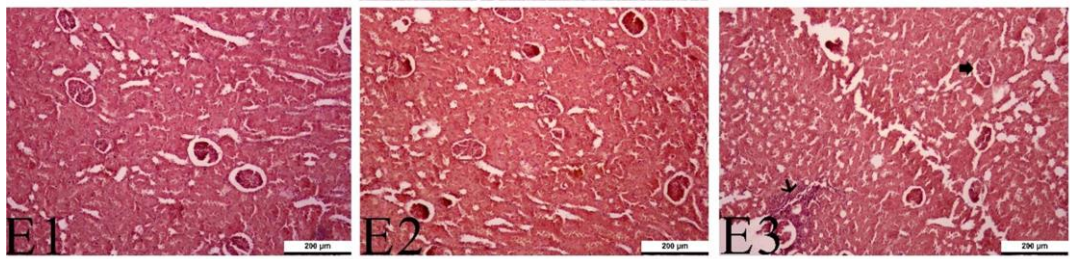
Resim 6. Kalp Dokusu Histopatolojik incelemesi-b C4 (Kalp, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları. C5 (Kalp, Arsenik+C50 grubu); (Kalın ok) Myokard hücrelerinde hyalin dejenerasyonu ve nekroz alanları.



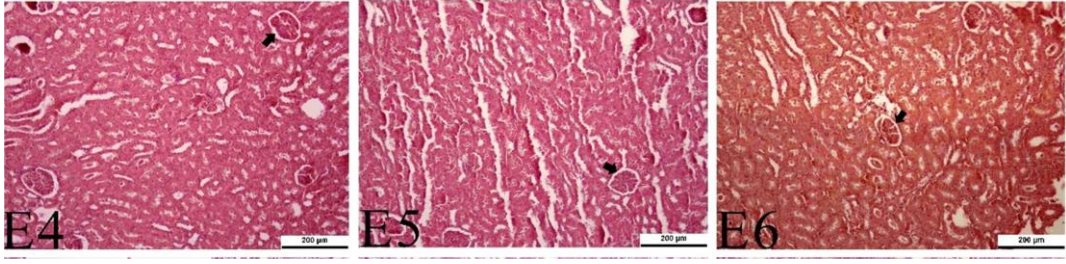
Resim 7. Karaciğer Dokusu Histopatolojik incelemesi-a D3 (Karaciğer, Arsenik grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (İnce ok) Vena sentralislerde hiperemi, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları



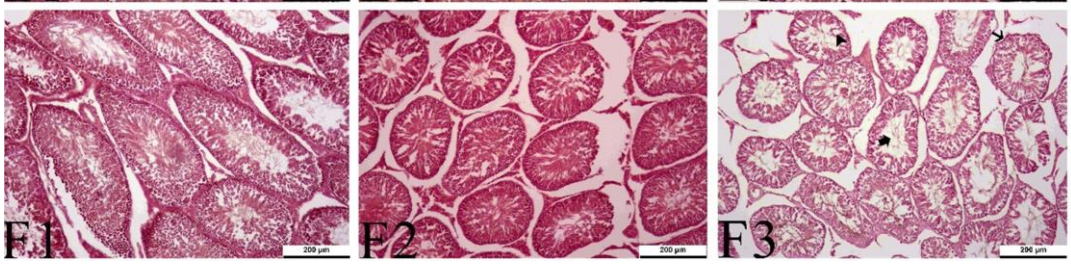
Resim 8. Karaciğer Dokusu Histopatolojik incelemesi-b D4 (Karaciğer, Arsenik +C25 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D5 (Karaciğer, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon alanları, (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları. D6 (Karaciğer, Arsenik +C100 grubu); (Okbaşı) Çift çekirdekli hepatosit oluşumları



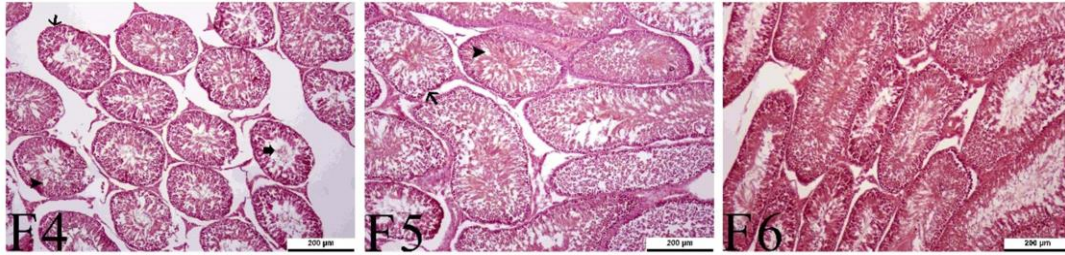
Resim 9. Böbrek Dokusu Histopatolojik incelemesi-a E3 (Böbrek, Arsenik grubu); (Kalın ok) Damarlarda hiperemi, (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.



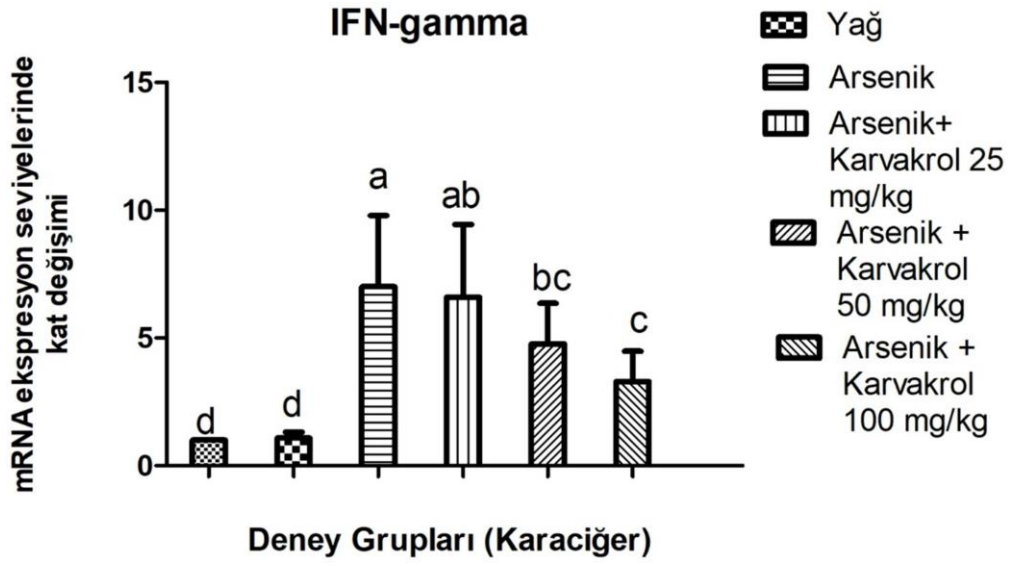
Resim 10. Böbrek Dokusu Histopatolojik incelemesi-b E4 (Böbrek, Arsenik +C25 grubu); (İnce ok) Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon, (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler. E5 (Böbrek, Arsenik +C50 grubu); (Kıvrımlı ok) İntersitisyel bölgede hemoraji alanı, (Okbaşı) Bowman boşluğunda genişlemeler.



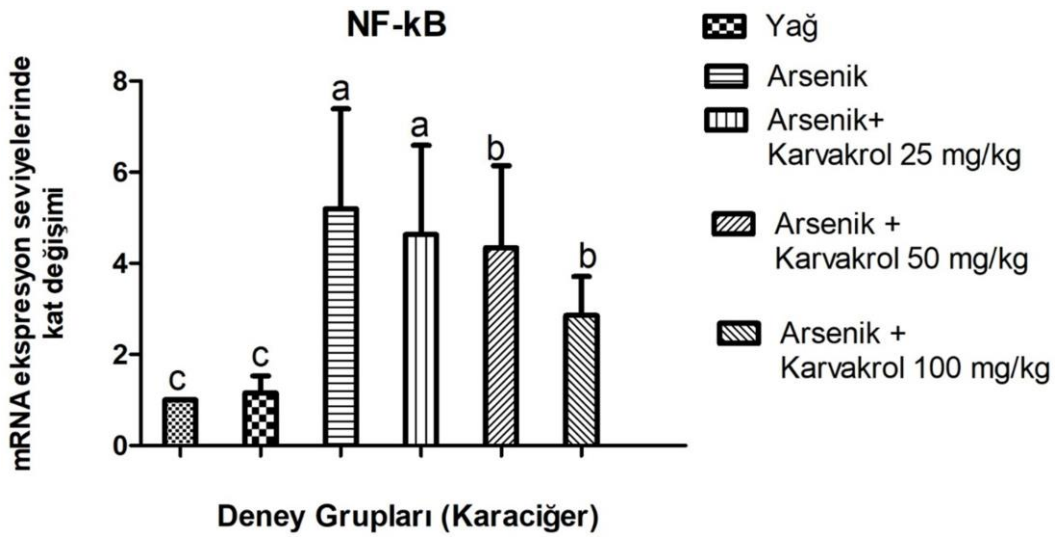
Resim 11. Testis Dokusu Histopatolojik incelemesi-a F3 (Testis, Arsenik grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı)TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları.



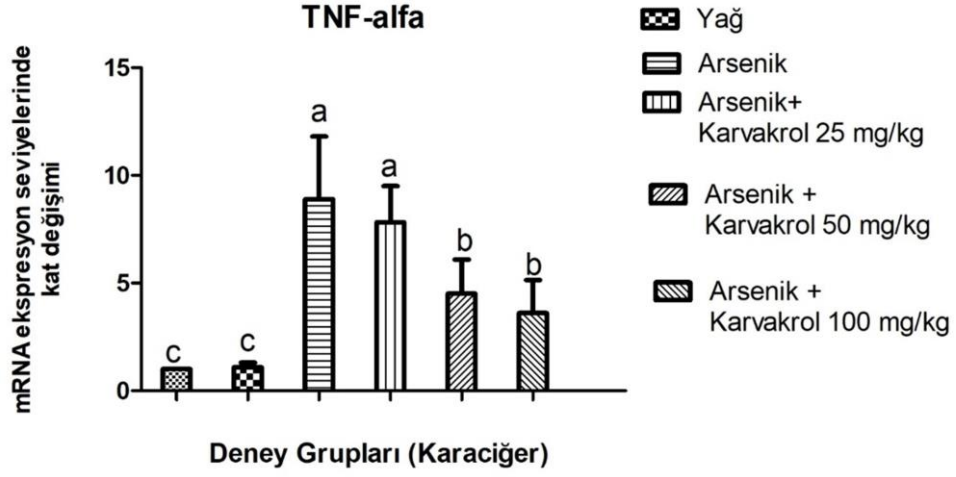
Resim 12. Testis Dokusu Histopatolojik incelemesi-b F4 (Testis, Arsenik+C25 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları. F5 (Testis, Arsenik +C50 grubu); (Kalın ok) TSK lümeninde spermatozoit yoğunluğunda azalma, (İnce ok) Düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları, (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları. F6 (Testis, Arsenik+C100 grubu); (Okbaşı) TSK lümeninde vakuolizasyon oluşumları



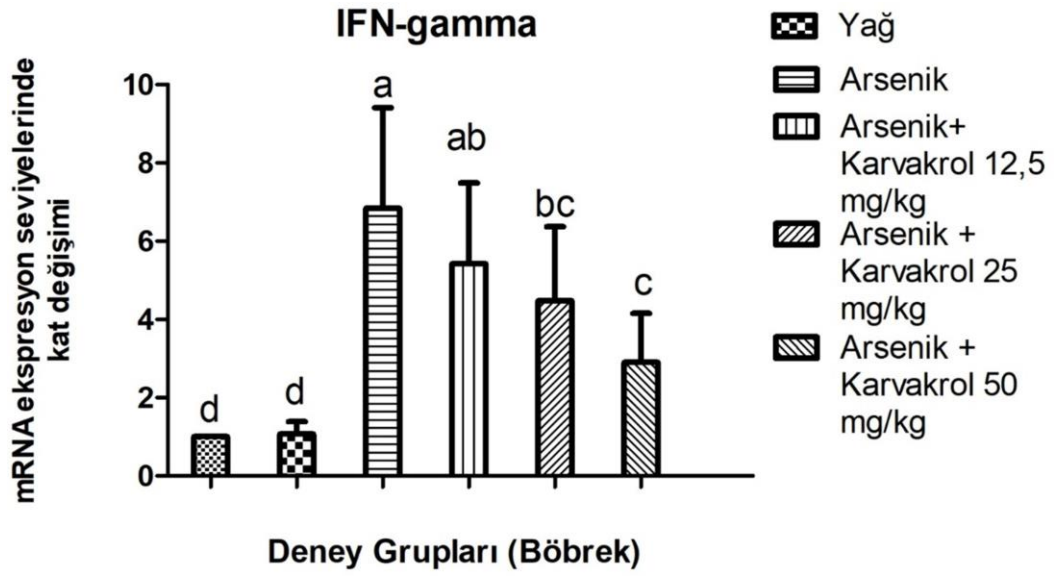
Resim 13. Karaciğer dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).



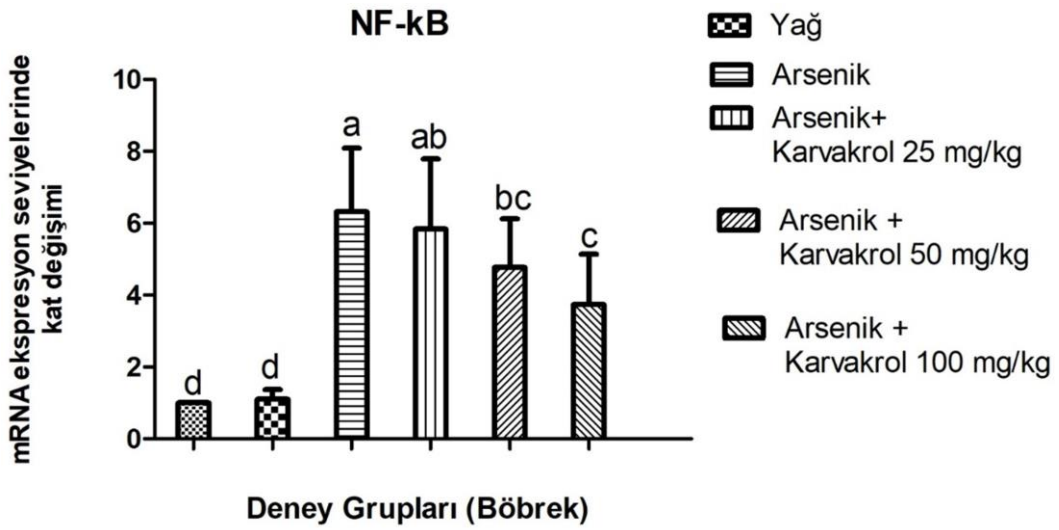
Resim 14. Karaciğer dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).



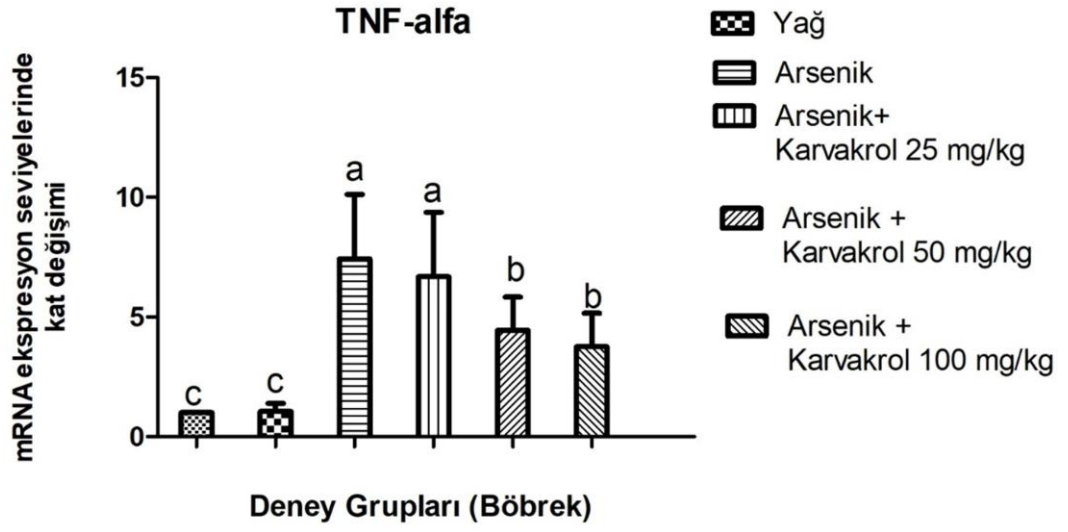
Resim 15. Karaciğer dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).



Resim 16. Böbrek dokusu IFN-gamma düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).



Resim 17. Böbrek dokusu NF-kB düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).



Resim 18. Böbrek dokusu TNF-alfa düzeylerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi. (a, b, c, d, e, f) Farklı harflere sahip değerlerin, aynı sütunda istatistiksel bazda önemli farklılıklar gösterir. ($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Karvakrolün antioksidan etkisi son zamanlarda yayınlanmış çalışmalarda değerlendirilebileceği yer almaktadır (Kulisic vd., 2004; Sökmen vd., 2004). Bu çalışmada endüstriyel atıklar ve yüzey suları ile kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, kan, beyinde arsenik ile indüklenen ratlarda organ toksiditesi iyi bilinen ve anti bakteriyel, antiparazitik, antitoksin, antimikrobiyal olan karvakrolün antioksidan özellikleri incelendi.

Nandi ve ark'nın ratlarda gerçekleştirdikleri ve 10 ppm dozunda 12 hafta süreyle arsenik verdikleri çalışmalarında dönemle ilişkili olarak, MDA düzeyinde eritrosit ve dokularda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış; SOD ve CAT aktivitelerinde ise azalma gözlemlenmiştir (Nandi vd., 2006). Rios ve ark (2009) tarafında, 3 ppm dozunda dört hafta boyunca içme suyu ile verilen arsenikten NO ve lipid peroksit düzeyinde önemli oranda değişimler tespit etmişlerdir. Bashir ve ark'nın ratlara 60 gün boyunca 0,5 ppm, 2,5 ppm ve 5 ppm dozunda verdikleri arsenik doz ile ilişkili olarak karaciğer MDA düzeyinde artışa; SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde göreceli bir düşüşe sebep olmuştur (Bashir vd., 2006). Allen ve Rana, 4 mg/100 g dozunda arsenik trioksiti 30 gün boyunca hayvanlara tuzlu su içinde ağızdan uygulamış ve karaciğer ile böbrek dokusu MDA düzeyinde önemli oranda bir artış tespit etmiştir (Allen ve Rana, 2003). Mishra ve Flora ratlara 50 ppm dozunda 10 ay boyunca verdikleri arseniğin beyin ve kanda lipid peroksit düzeyini önemli oranda arttırdığı kanısına varmışlardır (Mishra ve Flora, 2008). Zarazu'a ve ark, 3-4 mg/kg/gün dozunda ratlara 10 gün süreyle verdikleri arseniğin beyinde NO ve lipid peroksit düzeyini önemli oranda arttırdığını vurgulamışlardır. Elde edilen sonuçlardan, farklı dozlarda ve farklı dönemlerde uygulanan arseniğin ratlarda oksidatif stres belirteçlerinde olumsuz etkilere sebep olduğu anlaşılmıştır (Zarazu vd., 2006).

Rana ve ark ratlara 20 ppm 12 hafta süreyle uyguladıkları arseniğin eritrosit NO ve MDA düzeyinde artışa, SOD ve GSH-Px aktivitesinde ise düşüşe sebep olduğunu; koruyucu olarak verilen askorbik asitin ise analizleri gerçekleştirilen parametreleri kontrol değerlerine yaklaştırdığını ortaya koymuşlardır. Benzer bir başka çalışmada, 100 ppm dozunda 2 ay boyunca verilen sodyum arsenitin beyinin çeşitli bölümlerindeki MDA düzeyini artırırken eş zamanlı olarak SOD, CAT ve GSH-Px

aktivitesini düşürmüştür. Diğer taraftan aynı çalışmada uygulanan 70 mg/kg dozunda alfa-lipoik asit değerleri kontrol grubu değerlerine doğru yaklaşmıştır (Shila vd., 2005).

Kaya'nın yaptığı araştırmada, ratlara 30 gün süreyle 100ppm dozunda Na-arsenit vererek oksidatif stres oluşturmuşlardır. Çuha çiçeği yağı ile arseniğin birlikte verildiği grupta, yalnızca arsenik verilen gruba göre, MDA düzeyinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, testis, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş bulunduğu, SOD aktivitesinde karaciğer, böbrek, testis ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda CAT aktivitesinde karaciğer, akciğer ve testis dokusunda önemli bir artış; böbrek, beyin, kalp ve dalak dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş; GSH-Px aktivitesinde karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve kalp dokusu ile eritrositte önemli bir düşüş; NO düzeyinde karaciğer, böbrek, dalak, beyin ve kalp dokusunda önemli bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaların genelinde, antioksidant özelliği incelenen bileşiklerde değerlerin kontrol grubu değerlerine doğru yaklaştığı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada da bu yönüyle belirtilen doz ve sürede incelenen materyallerdeki oksidatif stres parametreleri ile daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında benzerlik olduğu anlaşılmıştır (Kaya, 2010).

Antioksidan enzim dengesinin bozulması, antioksidan enzim aktivitelerinde deplezyon görülmektedir. radikal süpürücü etkisiyle GSH ve ROS, kendini okside formu olan glutatyon disülfite (GSSG) dönüştürür. Böylelikle dokuda GSH seviyelerinde azalması, lipid peroksidasyonunu ve doku hasarını gösteren önemli bir faktör olmaktadır (Langcake ve Pryce, 1976). 2006 yılında yapılmış başka çalışmada, sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, arsenik toksisitesinin testis dokusu GSH seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Pal ve Chattjee, 2006). Chang ve ark. (2007) farelerde yaptıkları bir çalışmada arseniğin GSH seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir. Çalışmamızın bulguları diğer çalışmaları desteklemektedir. Çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arsenik grubu GSH değerleri anlamlı ölçüde düşüş gözlemlendi.

Özgüner ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, arseniğe maruz kalan grupların MDA düzeyinin %82 arttığı belirlenmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki, oral olarak belirli dozlarda alınan arsenik hayvansal hücrelerde oksidatif hasarı artırıcı etkiye

sahiptir. Arseniğe maruz bırakılan hayvanlarda, SOD aktivitesinin %55, CAT aktivitesinin de %53 azaldığı gözlemlendiğini bildirmiştir. Modi ve ark. arsenik ile oksidatif stres oluşturan ratlarda 2 mg/kg oral yolla 21 gün süreyle verilerek karaciğerde ki hasarı tespit etmişlerdir. GSH seviyesinde düşüş Lipid peroksidaz (LPO) seviyesinde artış gözlenmiştir (Modi vd., 2006).

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda ALT, AST serum seviyeleri noktasında benzerlikler görülmüştür. 2009 yılında yapılan bir çalışmada Srıvastava ve arkadaşlarının erkek ratlarda tek başına arseniğe maruz kalma, serum AST ve ALT'yi önemli ölçüde artırırken, selenyum, kalsiyum veya magnezyum ile birlikte uygulama bu artışı engellediği gösterilmiştir.

Mershiba ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı mevcut araştırma sonuçları arsenik ile ratlarda karaciğer toksisitesinde ALT, ALP gibi karaciğer enzimlerinin seviyelerini yükselttiğini göstermiş, AST ve karaciğer fonksiyonlarını düzenleştirmiş. Bununla birlikte, karaciğer hasarının şiddeti ve hepatik toksisite Cur ile uygulama ve tedavi ile rahatladığı aynı zamanda, bu Cur uygulaması, seviyelerinde önemli bir düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Mershiba vd., 2013) Nitekim, bir çalışmada da sodyum arsenit verilmeden önce kuarsetin uygulamasının arseniğin yol açtığı oksidatif stresi ve kalp kasında meydana gelen patolojik değişiklikleri önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Das vd., 2010; Demirel, 2012).

Bazı araştırmalar da Liu ve arkadaşları (2000) arsenik maruziyetinde, yangısal hücrelerin varlığını yangısal inflamatör sitokinlerin (interlöykin-1 β , interlöykin 6, TNF- α) artmış düzeyleri ile ilişkili olabileceğini ifade etmişler, aynı zamanda bu sitokinlerin karaciğerdeki yangısal hücreler tarafından uzaklaştırıldığını ve arseniğin yol açtığı hepatotoksistide bu sitokinlerin önemli bir rol oynayabileceğini bildirmişlerdir.

Karvakrolün bazı mikroorganizmalar üzerine antibiyotik etkisi olduğu bildirilmiştir (Svoboda and Hampson, 1999; Bagamboula, et al., 2004; Lanciotti, et al., 2004). Karvakrolün karaciğer cerrahisinde kullanılabilirliği açısından bu özellik önemli 60

olabilir. Çünkü, cerrahi operasyonlar sırasında ve sonrasında yara bölgesinin enfeksiyonlara karşı korunması önemlidir. Karaciğer cerrahisinden sonra iyileşmeyi sağlayıcı ilaçlar yanında antibiyotiklerin de uygulanması yerine sadece karvakrol kullanımı, bundan sonra yapılacak daha kapsamlı çalışmaların sonuçlarına göre olasılık taşımaktadır. Uyanoğlu'nun 72 saatlik periyot ile karvakrol ve silymarin enjeksiyon uyguladığı ratlarda %68 parsiyal hepatektomiden sonraki 72. Saat sonunda TNF- α , AST ve ALT enzimleri ve IL-6 sitokinlerinin serum seviyelerinin ortaya çıkarıldığı sonuca göre PCNA indeksi verilerinin birbirlerine paralel olması, silymarin ve karvakrolün karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri konusundaki beklentilerimize cevap vermiştir. Rejenerasyon oranlarının hem mitotik indeks hem de PCNA indeksi ile uyum göstermesi ise silymarin ve karvakrolün karaciğer rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri açısından önemlidir. Karaciğer kesitlerinde yapılan histolojik değerlendirme sonuçlarına göre herhangi bir patolojik bulguya rastlanmaması, karvakrolün bundan sonraki in vivo çalışmalarda da kullanılabilceğini, aynı zamanda karvakrolün karaciğer histolojik yapısında toksik bir etki oluşturmadığı bildirmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, 100 mg/kg-1 miktarda verdikleri Cisplatin ile oluşturulan üreme sistemi üzerindeki hasar Car'in hasarı düzelttiği ve aynı zamanda Cisplatin verilen gruba göre denejenerasyon ve apoptoz miktarını da azalttığı vurgulanmış, doku hasarını önemli ölçüde tedavi edebildiği gösterilmiştir (Aksu vd., 2016).

Sonuç olarak, kronik olarak arseniğe maruz kalma insanlar üzerinde olumsuz etkiler bırakmaktadır. Organizma tarafından emilen inorganik arsenik, organik arseniğe dönüştürülür ve vücuttan atılması sırasında oksidasyon basamağında oluşan serbest radikaller, lipid peroksidasyon ürünü MDA'yı artırır ve süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesini azaltır. Sizin için iyi olacağını biliyorum. Antioksidan bir enzimdir. Oksidatif stres, serbest radikallerin artması ve antioksidan sistemdeki enzimlerin inhibisyonundan kaynaklanır. (Kuru,2007)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ağır metal olan arsenik kalp, kan, beyin, testis karaciğer, böbrek ve akciğer dokusu üzerinde oluşturmuş oksidatif stres kaynaklı doku hasarını ayrıca karvakrolün koruyucu etkilerinin histolojik değişiklikler ve biyokimyasal testlerle tespit edildi.

Çalışmamız doğrultusunda, arsenik (100 mg/kg) ve karvakrol (12,5; 25; 50 mg/kg) miktarlarda 28 gün boyunca ratlara verilmiş olup, antioksidan sistemi baskılamıştır. Arsenik verilmesiyle SOD enzim aktivitesinde, azalma tespit edildi. SOD enzim aktivitesinde bir azalmanın görülmesi, aşırı ROS birikimi ile ilişkili olup, hücre membranlarının fonksiyonunun ve bütünlüğünün bozulmasına neden olmuştur. Çalışmamızda ratlara arsenik uygulanması CAT aktivitesinde de azalmalara neden olmuştur. Bu azalma nedeniyle artan H₂O₂'ler yeterince detoksifiye edilemediğinden tüm dokularda oksidatif strese neden olmuştur.

Bu çalışmada arsenik uygulaması ratların tüm dokularında ki MDA seviyelerinin belirgin şekilde artmasına sebep olmuştur. MDA seviyelerinde ki bu yükselme ise antioksidan savunmanın aşırı oluşan serbest radikalleri önleyememesine ve doku hasarına neden olmaktadır. Çalışmamızda arsenik uygulaması antioksidan savunma mekanizmasından SOD, GSH ve CAT aktivitesinde düşüşe sebep olarak, lipid peroksidasyonuna neden olan H₂O₂'nin yükselmesiyle birlikte dokularda ki antioksidan kapasitesini azaltmıştır.

Arsenik ile Karvakrolü birlikte uyguladığımızda AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinin karvakrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığını ayrıca eklenen karvakrol miktarının artmasıyla birlikte bu değerlerin dikkat çekici düzeyde düşmeye devam ettiğini gözlemlendik. Biyokimyasal sonuçlarımızla paralel olarak histopatolojik ve genetik sonuçlarımızda da arsenik verilen dokularda orta ve şiddetli derecede dejenerasyon, damarlarda hiperemi, intersitisyel alanda kalınlaşma, düzensiz bazal membrana sahip TSK oluşumları ve bowman boşluğunda genişlemelere sebep olduğunu tespit ettik. Arsenik uygulamasıyla meydana gelen

hasarın karvakrol ile tedavi edilmesiyle hasarın en aza indiği görüldü.

Sonuç olarak deneysel verilerimiz doğrultusunda ratlara, arsenik indüklemesiyle dokularda ve genetiklerde oluşan hasara oksidatif stresin neden olduğunu ve bu hasarın karvakrol tarafından azaltılabildiğini histolojik ve biyokimyasal sonuçlarımız ışığında ortaya koyduk. Bu yüzden, ağır metallere karşı tüketiciyi bilinçlendirmek ve bu antioksidanlarla bireysel tedaviden daha iyi koruyucu değer sağlayabilir. Ayrıca bu ürünlere karşı doğal bir antioksidan olan karvakrolün alımı arseniğin oluşturduğu zararlı etkilere karşı anlamlı derecede iyileştirme sağlayacaktır. Sonuç olarak, arseniğin hasar etkisinin daha iyi anlaşılması aynı zamanda koruyucu ya da destek tedavilerinin geliştirilmesi noktasında çalışmaların ilerletilmesi gerektiğinde hemfikiriz.

KAYNAKLAR

- Aebi H. (1974). "Catalase, Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)", 2: 673-684.
- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol.* 32, 1: 31-6.
- Anderson, O.M., Markham, K.R. (2006). *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications.* CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 219-470.
- Aksu, E.H., Kandemir, F.M., Altun, S., Küçükler, S., Çomaklı, S., Ömür, A.D., (2016). Ameliorative effect of carvacrol on cisplatin-induced reproductive damage in male rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 30(10): 513-520
- Alagawany MM, Farag MR, Dhama K, Abd El-Hack ME, Tiwari R, Alam GM (2015a). Mechanisms and Beneficial Applications of Resveratrol as Feed Additive in Animal and Poultry Nutrition: A Review. *Int. J. Pharmacol.* 11: 213-221.
- Allen T, Rana SV. (2003). Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135: 157-162.
- Ashour EA, Alagawany M, Reda FM, Abd ElHack ME (2014). Effect of Supplementation of *Yucca schidigera* Extract to Growing Rabbit Diets on Growth Performance, Carcass Characteristics, Serum Biochemistry and Liver Oxidative Status. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 9: 732-742.
- Atalay, Mustafa, and David E. Laaksonen. (2002). "Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise." *Journal of Sports Science and Medicine* 1(1): 1–14.
- Arena JM, Drew RH. *Poisoning.* Fifth edition. Charles C Thomas, Springfield. 1986 pp, 1128.
- Aybek, H., Demir, S., Sert, S., Alatağ, E., (2005). Overektomili Sıçanlarda Ğskemi Reperfüzyon Sonrası Olufian Uzak Doku Hasarının Göstergesi Olarak Karaciğer Malondialdehid Düzeyi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. XVI 1, 32- 35.
- Ayaz, A., Yurttagül, M. (2008). *Besinlerdeki Toksik Öğeler II,* Ankara.
- Aydın, S., Beis, R., (2005). Karvakrol yüzdesi farklı *Origanum Onites L.* Uçucu yağının analjezik etkisi 18. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 28. Eylül- 1 Ekim 2005, İzmir.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*, *Food Microbiology*, 21, 33-42, p.
- Baser, K.H.C., (2001). Her derde deva bir bitki kekik. *Bilim ve Teknik.* Mayıs. 74-77.
- Bashir S, Sharma Y, Irshad M et al. (2006). Arsenic induced apoptosis in rat liver following repeated 60 days exposure. *Toxicology*; 217: 63-70.

- Baydar, H., Sagdıç, O., Özkan, G. and Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*, 15, 169-172, p.
- Başer, K.H.C., Tümen, G., Özek, T., Kürkçüoğlu, M. (1991). Halk ilacı olarak kullanılan *Thymus sibthorpii* Benth. 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, 389
- Baydar, H. (2007). Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri bilimi ve teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, S.D.Ü. Yayın No: 51.
- Baytop, A., (1991). Farmasötik Botanik. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3637, Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 58, İstanbul, 234-237.
- Baytop, T. (1999). Türkiye’de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün. İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul.
- Berman, E. (1980). *Toxic Metals and Their Analysis*. London; Philadelphia: Heyden.
- Beutler, E. Duron , O., Kelly, B.M., (1993). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab. Clin. Med.* 61,882-888
- Bravo D, Pirgozliev V, Rose SP (2014). A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsaicin oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *J. Anim. Sci.* 92(4): 1531-1536.
- Burt, S.A., Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.*, 36: 162-7.
- Calvo C., Bolado, S., Alvarez-Benedi, J., Andrade, M. A. (2006). Arsenic uptake and accumulation in curly endives (*Cichorium endivia* L.) irrigated with contaminated water. *J Environ Sci Health B.* 41(4):459-470
- Cemeli E, Baumgartner A and Anderson D (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 681: 51–67.
- Chang SI, Jin B, Youn P, Park C et al. (2007). Arsenic induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 218(2): 196-203.
- Cornelli U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol*; 27: 175–94.
- Çaylak, E., (2011). “Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres İle Antioksidanlar.” *Tıp Araştırmaları Dergisi* 9(1): 73–83.
- Das, A.K., Sahu, R., Dua, T.K., Bag, S. Gangopadhyay, M., Sinha, M.K., Dewanjee, S. (2010). Arsenic-induced myocardial injury: Protective role of *Corchorus olitorius* leaves. *Food Chem Toxicol.*, 48: 1210-1217.
- Demirel H.H. Ratlarda Arsenik Toksikasyonunun Patolojisi ve Eş Zamanlı Uygulanan *CISTUS LAURIFOLIUS* L. (CISTACEA) Bitkisinin Koruyucu Etkisi, 129 s. AKÜ, Doktora Tezi, Afyonkarahisar.

- Dhama K, Shyma K Latheef, Saminathan M, Abdul Samad H, Karthik K, Tiwari R, Khan RU, Alagawany M, Farag MR, Alam GM, Laudadio V, Tufarelli V (2015). Multiple beneficial applications and modes of action of herbs in poultry health and production-A review. *Int. J. Pharmacol.* 11: 152- 176.
- Division of Toxicology and Environmental Medicine, Public Health Statement, Arsenic, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007) [Internet] Web sayfası: www.atsdr.cdc.gov/
- Dorman, H.J., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88: 308-16.
- Drabkin, D. L., & Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112(1), 51-65.
- Draper H.H., Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.
- Eriş, S., (2008). Fibromyalji Hastalarında Serum Leptin Düzeylerinin Araştırılması. 86 s. Uzmanlık tezi, SDU, Isparta.
- El-Sayed EM, Abd-Allah AR, Mansour AM, and EL-Arabey AA. (2015). Thymol and carvacrol prevent cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 29(4), 165-172.
- Farag MR, Alagawany MM Dhama K (2014). Antidotal effect of Turmeric (*Curcuma longa*) against endosulfan-induced cytogenotoxicity and immunotoxicity in broiler chicks. *Int. J. Pharmacol.* 10: 429-439.
- Friberg L, Nordberg G, Vouk VB. (1979). *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam;New York New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; sole distributors for the U.S.A. and Canada.
- Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. and Gudrups, I., (1999). The use of species and medicinals as bioactive protectants for grains, chapter 5, *Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*.
- Guerin, O., El Mouatassim, S., Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7 (2), 175-189.
- Hashemipour H1, Kermanshahi H, Golian A, Veldkamp T. (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92(8):2059-69.
- Hassimotto NMA, Pinto MDS and Lajolo FM (2008). Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *J Agric Food Chem* 56:11727–33.

- Halden RU. (2000). Plastics and health risks, *The Annual Review of Public Health*, 31: 179- 194.
- Hedhili, L., Romdhane, M., Abderrabba, A., Planche, H., Cherif, I. (2002). Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 26
- Hopenhayn, C., Ferrecio, C., Browning, S. R., Huang, B., Peralta C., and Gibb, H., (2003). “Arsenic exposure from drinking water and birth weight”.
- Huang, Y.L., Hsueh, Y.M., Huang, Y.K., Yip, P.K., Yang, M.H., Chen, C.J., (2009). Urinary arsenic methylation capability and carotid atherosclerosis risk in subjects living in arsenicosis-hyperendemic areas in southwestern Taiwan, *Science of the Total Environment*, 407, 8, 2608-14.
- Hughes MF. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology Letters*, 133: 1–16.
- Hughes MF, Beck BD, Chen YL, Ari S., Thomas, David J. (2011). Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences*, 123 (2): 305–332.
- <http://www.organoil.com/carvacrol.htm>:- Mediterranean-Guaienteed Wild Mountain- Grown Houdpicked. The Turkish Oregano Company.
- Langcake P, Pryce RJ (1976). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16: 1193–1196.
- Lanciotti R., Gianotti A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E. and Gardini F., (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 201-208, p.
- León-Rodríguez A de, Escalante-Minakata P, Jiménez-García MI, Ordoez-Acevedo LG, Flores Flores JL, Barba de la RA (2008). Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.* 46(4): 448-455.
- Liu, C.M., MA, J.Q., Sun, Y.Z. (2010a). Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ. Toxicol. Phar.*, 30: 264-271.
- Luna L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of armed forces institute of pathology*. 3rd Ed, McGraw-Hill Book Company, New York;1-253.
- Luna A1, Lábaque MC, Zygadlo JA, Marin RH (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult Sci.* 89(2): 366-70.
- Luck H.A. (1963). Katalaz tahmini için spektrofotometrik yöntem. *Enzimatik analiz yöntemleri*.
- Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193, 265-275.
- IRC, (2006). Arsenic in drinking water. Thematic Overview Paper 17, by: Branislav Petrusovski, Saroj Sharma, Jan C. Schippers (UNESCO-IHE), and Kathleen Shordt (IRC), IRC International Water and Sanitation Centre.

- Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A, Eryavuz A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 24:161–164.
- Ince, S., Kucukkurt, I., Acaroz, U., Arslan-Acaroz, D., & Varol, N. (2019). Boron ameliorates arsenic-induced DNA damage, proinflammatory cytokine gene expressions, oxidant/antioxidant status, and biochemical parameters in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 33(2), e22252.
- İpek, E., Tüylü-Ayaz, B., Zeytinoğlu, H., (2005). Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures, *Cytotechnology*, 43, 145-148.
- Jomova K, Jenısova Z, Feszterova M, Baros S, Lıska J, Hudecova D, Rhodes CJ, Valko M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.*, 31 (2): 95– 107.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C. (2005). Analysis of essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 235.
- Kahraman, A., Erkasap, N., Serteser, M., Koken, T., (2003). Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats, *J Nephrol*, 16, 219-224.
- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A.H., (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics*, 3(1),1-14.
- Kang, J. H., Aasi, D., Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms, *Critical Reviews in Toxicology*, 37: 607–625p.
- Kannan GM, Flora SJS. (2004). Chronic arsenic poisoning in the rat: treatment with combined administration of succimers and an antioxidant *Ecotox Environ Safe* 58: 37-43.
- Karataş F, Kamlı F.(2007). Variations of vitamins (A, C and E) and MDA in apricots dried in IR and microwave. *J Food Process Eng* 78: 662–8. 17.
- Kulısic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 85, 633- 640, p.
- Koparal, A.T., Zeytinoğlu, M. (2003). Effects of carvacrol on a human nonsmall cell lung cancer (NSCLC) cell line. *Cytotechnology*, 43(1-3): 149- 154.
- Marwah, R.G., Fatope, M.O., Deadman, M.L., Ochei, J.E., Al-Saidi, S.H. (2007). Antimicrobial activity and the major components of the essential oil of *Plectranthus cylindraceus*. *J Appl Microbiol.*, 103, 4: 1220-6
- Meriçli F. (2010). Solunum Yolları Hastalıklarında Önemli Fitoterapötikler. *Fitomed*, 18(3)özel:21-2.
- Mershiba SD, Dassprakash MV, Saraswathy SD (2013). Protective effect of naringenin on hepatic and renal dysfunction and oxidative stress in arsenic intoxicated rats. *Mol Biol Rep* 40:3681–3691.
- McCord, J. M., (2000). The evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *American Journal of*

Medicine 108:652-9.

- Mishra D, Flora SJ. (2008). Differential oxidative stress and DNA damage in rat brain regions and blood following chronic arsenic exposure. *Toxicol Ind Health* 24: 247-256.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D. (2006). Oxidative stress indices and plasma biochemical parameters during oral exposure to arsenic in rats. *Food Chem Tox* 44: 1579- 1584.
- Nafees, S., Ahmad, S. T., Arjumand, W., Rashid, S., Ali, N., & Sultana, S. (2013). Carvacrol ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in liver of Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, 32(12), 1292-1304.
- Navarro M, Sánchez M, López H, López MC. (1993). Arsenic contamination levels in waters, soils, and sludges in Southeast Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 50: 356-362.
- O’Gara, E., Hill, D.J., Maslin, D.J. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ Microbiol.*, 66: 2269-73
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Omaye ST. (2004). *Food and nutritional toxicology*. New York: CRC Press,
- Özer, M. K., Çiçek, E., Gökalp, O., Koyu, A., Parlakpınar H., Acet, A., (2005). Myokardiyal iskemi reperfüzyon sonrası böbrek hasarında nitrik oksitin rolü ve caffeic acid phenethyl ester (cape)“in etkisi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*, 12, 23-27.
- Özgöçmen S., (2007). Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. *Türk Fiz. Tıp Rehab. Derg.* (53);2: 33-5.
- Pfaffl, M.W., (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT- PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 9.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A. (2006). Growth inhibition and morfological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*, *Food Control*, 17, 359.
- Panizzi L, Flamini G, Cioni PL ve ark. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J Ethnopharmacol*, 39:167-70.
- Pal S, Chattrjee AK. (2006). Possible beneficial effects of melatonin supplementation on arsenic induced oxidative stress in wistar rats. *Drug Chem Toxicol*, 29(4): 422-433.
- Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, et al. (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci Nutr* 60 (Suppl 2): 12–22. 5.
- Ramanathan, K., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C. (2003). Protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced microsomal dysfunctions. *Hum Exp Toxicol*. 22(3):129-136.
- Rahman MM, Ng JC, Naidu R. (2009). Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. *Environ Geochem Health* 31:189-200

- Rana T, Bera AK, Das S et al. (2010). Effect of ascorbic acid on blood oxidative stress in experimental chronic arsenicosis in rodents. *Food Chem Toxicol* 48: 1072-1077.
- Rhee KS, Anderson LM, Sams AR (1996). Lipid peroxidation potential of beef, chicken and pork. *J. Food Sci.* 61: 8–12.
- Rızkı M, Kossatz E, Velazquez A, Creus A, Farina M, Fortaner S, Marcos R. (2006). Metabolism of arsenic in *Drosophila melanogaster* and the genotoxicity of dimethylarsinic acid in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen.* 47(3):162- 168
- Ríos R, Zarazúa S, Santoyo ME et al. (2009). Decreased nitric oxide markers and morphological changes in the brain of arsenic-exposed rats. *Toxicology* 261: 68- 75.
- Ruberto, G., Barata, M.T., Dorman, H.J., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 235-244.
- Ruiz D, Egea J, Gil MI, et al. (2005). Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *J Agric Food Chem* 53: 9544–52.
- Sajiki J, Yonekubo J. (2003). Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species, *Chemosphere* 51(1), 55-62.
- Schwarz, K., Ernst, H., Ternes, W. (1996). Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 217-223.
- Shila S, Kokilavani V, Subathra M et al.(2005). Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology* 210: 25-36
- Sies, H. and W. Stahl. (1995). Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62; 1315-1321.
- Sies, H., W. Stahl, and A. Sundquest. (1998). Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids. *Annals New York Academy of Sciences* 669: 7-20.
- Sinczuk-Walczak H, Szymczak M, Halatek (2010); T Effects of occupational exposure to arsenic on the nervous system: clinical and neurophysiological studies. *Int J Occup Med Environ Health* 23:347-55.
- Singh, D., Chander, V., Chopra, K., (2004). The Effect Of Quercetine, A Bioflavonoid On Ischemia/Reperfusion Induced Renal Injury In Rats. *Archives Of Medical Research*, 35, 484-494.
- Slamenova, D., Horvathova, E., Sramkova, M., Marsalkova, L. (2007). DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. *Neoplasma*, 54(2): 108- 112.
- Sökmen A, Güllüce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sökmen M, Sahin F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*, *Food Control.* 15, 627-634.
- Sollmann, T. (1991). Carvacrol. *J. Pharmacol.* 14: 251-258. *Chem. Abst.* 14: 1162 1917- 1926.

- Svoboda K.P. and Hampson J.B., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities.
- Sun Y., Oberley L.W., Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase., *Clinical Chemistry*, Cilt 34, Sayı 3, 1 Mart, Sayfalar 497–500,
- Takahashi, R., Noguchi, T., Mizoguchi, Y., Shimoyama, T., Nakazawa, T., & Ikuta, T. (2018). A synbiotic with tumor necrosis factor- α inhibitory activity ameliorates experimental jejunoileal mucosal injury. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9184093>
- Tchounwou PB, Wilson BA, Abdelghani AA, Ishaque AB, Patlolla AK. (2002). Differential cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma (HepG2) cells exposed to arsenic trioxide and monosodium acid methanearsonate (MSMA). *International Journal of Molecular Science*. 3:(11):1117-1132.
- Tchounwou P. B., Patlolla A. K. and Centeno J. A., (2003). ‘‘Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure’’
- Tümen, G., Baser, K.H.C, Demirci, B., Ermin, N. (1994). Composition of essential oil of thymus *cilicicus* boiss. bal. *Journal Essential Oil Research*, 6: 97-98.
- Tosun, Ğ., Karadeniz B., (2005). Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi, O.M.Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun Omü Zir. Fak. Dergisi, 20, 78- 83.
- Uyanoglu, M., Canbek, M., Ara, E., BaÇer, K. H. C., (2008). Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy, *Phytomedicine*, 15, 226-9.
- Veldhuizen E.J.A, Bokhoven J.L.M.T., Zweijtzer C., BURT S.A., Haagsman H.P., (2006). Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1874-1879.
- Vincenzi, M., Stamatii, A., Vincenzi, A., Silano, M., (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*. 75(7-8) : 801-4.
- Vincenzi De M., Stamatii A., Vincenzi De A., Silano M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75:801-804.
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 85(2), 337-341.
- Yagmur F, Hanci YH. *Arsenik. Sted* (2002). 11(7): 250- 251.
- Yılmaz, O., Ekici O. K., (2005). ‘‘Van Yöresinde İçme Sularında Arsenikle Kirlenme Düzeyleri’’.
- Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*. 64: 59-66.
- Young EG, Smith RP. (1942). The arsenic content of hair and bone in acute and chronic arsenical poisoning review of two cases examined posthumously from a medico-legal aspect. *BMJ* 21:251-3.

- WHO, (1990), Arsenic. Environmental Health Criteria. 18. World Health Organization, Genova.
- Wu, S.J., Ng, L.T. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan, LWT, 41, 323–330
- Zarazúa S, Pérez-Severiano F, Delgado JM, et al. (2006). Decreased nitric oxide production in the rat brain after chronic arsenic exposure. *Neurochem Res* 31: 1069-1077.
- Zeybek U, Haksel M. (2010). Kekik (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*). Türkiye’de ve Dünyada önemli Tıbbi Bitkiler ve Kullanımları. İzmir: Meta Basım 112-5.

