

Farklı Test Sistemleri ile Somatik Hücrelerde Profenofos Genotoksitesine Karşı Kuşburnu (*Rosa canina* L.) Ekstrelerinin Doğal Bir Antigenotoksik Ajan Olarak Kullanılması

Caner KASIMOĞLU, Handan UYSAL*

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum, Türkiye

Received: 05.01.2016; Accepted: 29.02.2016

Özet. Bu çalışmada, profenofos insektisitinin genotoksik etkileri, *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve insan periferik lenfosit hücrelerinde mikronükleus (MN) testi ile araştırılmıştır. Bu maddenin olası genotoksik etkilerinin giderilebilmesi için de kuşburnu (*Rosa canina*) bitkisine ait su ve etanol ekstraktları kullanılmıştır.

SMART için *D.melanogaster*'in kanat preparatları incelendiği zaman, profenofosun artan konsantrasyonuna (0,025, 0,05, 0,075 ve 0,1ppm) bağlı olarak normal kanat fenotipinde mutasyon frekansının arttığı özellikle en yüksek uygulama grubunda (0,1 ppm) bu artışın pozitif etkili (+) olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Serrat kanat fenotipinde ise mutasyon frekansındaki artış tüm uygulama gruplarında önemsiz etkili (i) bulunmuştur ($P>0,05$). Kuşburnu bitkisinin su (RCsu) ve etanol (RCeta) ekstraktları, profenofosun en yüksek konsantrasyonu (0,1 ppm) ile birlikte uygulandığı zaman (profenofos+ RCsu/RCeta) mutasyon frekansındaki artışın azaldığı ve bunun da istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$).

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda *in vitro* profenofos uygulaması (0,25, 0,5, 0,75 ve 1ppm) ile insan periferik lenfosit hücrelerinde mikronükleus frekansının arttığı ve nükleer bölünme indeksinin (NBI) azaldığı da görülmüştür ($P<0,05$). Ancak profenofos+RCsu ve RCeta uygulamaları ile mikronükleus frekansı düşerken NBI değeri de kontrol grubuna yaklaşmıştır ($P<0,05$).

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, Profenofos, SMART, Mikronükleus, *Rosa canina*

The Usage of *Rosa canina* L. Extracts As a Natural Anti-Genotoxic Agents Against the Genotoxicity of Profenofos on Somatic Cells by Different Test Systems

Abstract. In this study, the genotoxic effects of profenofos insecticide were investigated with the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* and the micronucleus test (MN) in human peripheral lymphocytes. The water and ethanol extracts of rosehip plants (*Rosa canina*) were used to remove possible genotoxic effects of this substance.

When the wing preparates of *D.melanogaster* were examined for the SMART, it was observed that mutation frequency in normal wing phenotype increased depending on doses of profenofos (0,025, 0,05, 0,075 ve 0,1ppm) and this increase was positive effect (+) in the highest application group (0,1 ppm), especially. The increase in mutation frequency of the serrate wings phenotype was found insignificant (i) in the all application groups ($P>0,05$). When the water (RCwtr) and ethanol (RCeth) extracts of the rosehip plants were applied together with the highest application concentration of profenofos (profenofos+ RCwtr/RCeth), it was observed that the increase in the mutation frequency decreased and this decrease was statistically significant ($P<0,05$).

In this study, the mutation frequency increased and nuclear division index (NBI) decreased in the human lymphocyte cells with *in vitro* profenofos application in the different concentration were showed ($P<0,05$). But as the MN frequencies decreased, NBI values approached to control group with profenofos+RCwtr and RCeth applications ($P<0,05$).

Keywords: *Drosophila melanogaster*, Profenofos, SMART, Micronucleus, *Rosa canina*

* Corresponding author. Email address: hauysal@atauni.edu.tr

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı ile birlikte besin ihtiyacı da artmış ve bu durum teknolojik gelişmelere paralel olarak insanları yeni arayışlara yönlendirmiştir. Tarımsal üretimi artırmak için tarım zararlıları ile etkin mücadele de benimsenen yöntemlerden birisi olmuştur. Bu amaçla pestisit adı verilen çeşitli kimyasallar geliştirilmiştir. Pestisitler içerisinde zararlılara karşı en yaygın olarak kullanılan grup insektisitlerdir.

Profenofos, Dünyada zirai ve evsel amaçlı olarak kullanılan geniş spektrumlu organofosfat insektisitlerden birisidir [1]. Pamukta, meyve ağaçlarında ve sebzelerde böcekleri ve akarları kontrol etmek amacıyla kullanılır [2, 3]. İsmail et al. [4]'a göre, zooplanktonlar ve böcekler üzerinde yüksek, balıklarda orta, memelilerde ise düşük düzeyde toksik etkiye sahiptir. Çeşitli araştırmacılar tarafından profenofosun farelerde kromozomal bozukluklara yol açtığı, sıçanların polikromatik eritrositlerinde mikronükleus frekansını artırdığı [5], insan periferik lenfosit hücrelerinde de kromozomal kırıklara, gaplara ve DNA hasarlarına neden olduğu bildirilmiştir [6]. Benzeri DNA hasarları profenofosa maruz kalan *Rana spinosa* kurbağa iribaşlarının alyuvarlarında da tespit edilmiştir [7].

Günümüzde insanlarda dahil pek çok organizma, insektisitler gibi çeşitli kimyasal maddelere maruz kalabilmektedir. Bu kimyasal maddelerin etkilerini giderebilmek için şifalı bitkilerden sıklıkla faydalanılmaktadır. Özellikle farmakognozide farklı bitki türlerine ait etken maddelerin ilaç sanayinde kullanımına ilişkin çalışmalar hızla ilerlemektedir. Principe [8]'e göre, gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenlidir ve şifalı bitkiler hem tedavide hem de ilaç yapımında önemli yer tutmaktadır [9]. Gülgiller (Rosaceae) familyası içerisinde yer alan kuşburnu (*Rosa canina* L) bitkisi de soğuk algınlığı, grip [10], romatizma [11], diyabet [12], öksürük [13] gibi çeşitli hastalıklarının tedavisinde kullanılan şifalı bitkilerden birisidir. Fenolik bileşikler ve C vitamini bakımından zengin olan bu bitki [14, 15, 10], çeşitli araştırmacılar tarafından antioksidan olarak kabul edilmektedir [16].

Bu çalışmada, organofosfat insektisitlerden olan profenofosun genotoksik etkileri *D. melanogaster*'de *in vivo* olarak somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile insan periferik lenfosit hücrelerinde de *in vitro* olarak mikronükleus (MN) testi ile araştırılmıştır. Ayrıca profenofosa ait olası genotoksik etkilere karşı kuşburnu bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının antijenotoksik olup olamayacağı da aynı test teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2. 1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada kullanılan profenofos (CAS No; 41198-08-7), etil metansülfonat (EMS, CAS No; 62-50-0), sitokalaşin (CAS No; 14930-96-2), metanol (CAS No; 67-56-1), etanol (CAS No; 64-17-5) ve asetik asit (CAS No; 64-19-7) Sigma, giemsa (Cat No: 109204) Merck, dimetil sülfoksit (DMSO, CAS No; 67-68-5) Riedel ve kromozom B (Cat No; F 5023) Biochrom firmalarından satın alınmıştır.

2. 2. Somatik mutasyon ve Rekombinasyon testi

Bu test için, *D.melanogaster*'in körelmiş kanat kılına sahip *flr³* (*flare*) ve çoklu kanat kılına sahip *mwh* (*multiple wing hear*) mutant soyları kullanılmıştır [17]. Virgin *flr³* ♀♀ ile *mwh* ♂♂ çaprazlanmasından elde edilen 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalar, dört farklı dozda profenofos (0,025, 0,05, 0,075 ve 0,1ppm) ve kuşburnunun su (RCsu) ve etanol (RCeta) ekstrelerini içeren hazır *Drosophila* besiyerine alınmıştır. Profenofos ve profenofos+kuşburnu ekstrelerini içeren uygulama grupları dışında negatif kontrol grubu olarak profenofosun çözücüsü olan %1 DMSO, pozitif kontrol grubu olarak da 1 mM EMS kullanılmıştır. Tüm uygulama grupları için erginleşen bireylere ait kanat preparatları hazırlanmış ve ışık mikroskobu (400X) ile incelenmiştir. Elde edilen veriler Frei and Wügler [18] tarafından belirtilen yöntemle değerlendirilmiştir.

2. 3. Mikronükleus Testi

Bu test için, insan periferik lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Sigara içmeyen, sağlıklı dört farklı kişiden alınan heparinize kan, Kromozom B besiyeri içeren kültür tüplerine eklenmiştir. Kültür tüpleri 37°C'de üç gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde ortama profenofos ve kuşburnu ekstreleri, 48. saatte ise sitokalaşin eklenmiştir. 72. saatte inkübasyon bitirilmiştir. Kültür tüpleri, hipotonik solüsyondan ve 1/3 oranında asetik asit /metanol içeren tespit çözeltilisinden geçirilmiş ve santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atıldıktan sonra preparatlar hazırlanmıştır. Her donör için 1000 binükleuslu hücre (400X) incelenmiştir. Mikronükleus içeren hücre sayısı ve mikronükleus frekansı Fenech et al. [19]'a göre, nükleer bölünme indeksi (NBİ) ise Kocaman and Topaktas [20]'a göre belirlenmiştir.

2. 4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Kuşburnu meyveleri Erzurum'un Aşkale ilçesi Kapıkale köyünün 2000-2200m dağlık alanlarından olgunlaşma dönemi olan eylül ayında toplanmış ve tür teşhisi Atatürk Üniversitesi,

Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Meryem Şengül Köseoğlu tarafından yapılmıştır. Kurutulan kuşburnu meyve ve tohumları blender yardımı ile öğütülmüştür. Kuşburnu etanol ekstresini hazırlamak için öğütülmüş örnekler dört gün etanolde bekletilmiştir. Her günün sonunda bitki-etanol karışımı filtre edilmiş ve açığa çıkan çözeltilerden etanol uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan özüt etanol ekstresi (RCeta) olarak kullanılmıştır [21]. Kuşburnunun su ekstresi ise Halici vd. [22] tarafından uygulanan yöntem baz alınarak hazırlanmıştır. Buna göre; 200 ml distile suya 100 gr öğütülmüş kuşburnu konulmuş ve bu karışım 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda iki saat tutulduktan sonra filtre edilmiştir. Açığa çıkan çözelti liyofilizatörden geçirilerek kuşburnu bitkisinin su ekstresi (RCsu) elde edilmiştir. Daha sonra bu ekstrelere ait uygulama dozunun belirlenmesi amacıyla ön denemeler yapılmıştır. SMART için larval mortalite değerleri göz önüne alınarak %1'lik uygulama dozu, MN testi için ise 100 ppm bitki ekstresi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3. 1. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden (SMART) Elde Edilen Bulgular

Larval toksisitenin belirlenmesi için farklı dozlarda uygulanan profenofos, *D.melanogaster*'in 3. evre larvalarında hayatta kalış oranlarını düşürmüştür (Tablo 1). Tablo 1'de de görüldüğü gibi DMSO negatif kontrol grubunda % 98 olan hayatta kalış oranı, doz artışına bağlı olarak profenofosun en yüksek uygulama grubunda (0,1 ppm) % 47'ye kadar düşmüştür. Bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05).

Tablo 1. *D.melanogaster*'in 3.evre larvalarında profenofosa bağlı hayatta kalış ve ölüm oranları.

Uygulama grupları (ppm)	Larva sayısı	Larva ölüm oranları (%)	Hayatta kalış oranları (%)
DMSO (%1)	100	2 ^a	98 ^a
PROFENOFOS			
0.025	100	7 ^b	93 ^b
0.05	100	11 ^c	89 ^c
0.075	100	25 ^d	75 ^d
0.1	100	53 ^e	47 ^e

İstatistikî değerlendirmeler grup içi yapılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0.05'e göre önemlidir.

SMART için, farklı dozlarda profenofosa maruz kalan 3.evre larvalardan elde edilen ergin bireylerin kanat preparatları incelendiği zaman, normal kanatta doz artışına bağlı olarak mutasyon artışı gözlenmiştir (Tablo 2). Öncelikle DMSO negatif kontrol grubunda küçük tek tip (KTT) klon frekansı 0,11; büyük tek tip (BTT) klon frekansı 0,01; toplam mwh ve toplam klon frekansları ise 0,13 olarak hesaplanmıştır. EMS pozitif kontrol grubunda ise KTT frekansı 1,40; BTT frekansı 1,11; ikiz klon frekansı 0,18; toplam mwh frekansı 2,51 ve toplam klon frekansı ise 2,69 olarak bulunmuştur. DMSO negatif kontrol grubu ile EMS pozitif kontrol grubu arasındaki fark

istatistiki olarak önemlidir ($P<0.05$). Profenofosun ilk üç uygulama grubunda ise (0,025, 0,05, 0,075pm) tüm klonlar için hesaplanan mutasyon frekansına ait değerler, önemsiz etkili (i) bulunurken en yüksek uygulama grubunda (0,1 ppm) bu değerler sırasıyla 0,24; 0,03; 0,26 ve 0,26 olarak belirlenmiştir. DMSO negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında profenofosun en yüksek uygulama grubuna (0,1 ppm) ait KTT, toplam mwh ve toplam klon frekanslarındaki yükselişler istatistiksel olarak pozitif (+) önemli ($P<0.05$), BTT klon frekansındaki artış ise önemsiz etkili (i) bulunmuştur. Ayrıca DMSO negatif kontrol grubunda 0,512 olan KİF değeri EMS pozitif kontrol grubunda 11,015'dir. Profenofosun en düşük ve yüksek uygulama gruplarında ise bu değer 0,768'den 1,076'ya yükselmiştir (Tablo 2).

Serrat kanat için yapılan değerlendirmelerde de DMSO negatif kontrol grubuna ait KTT, toplam mwh ve toplam klon frekanslarının tümü 0,09; BTT klon frekansı ise 0,00 olarak hesaplanmıştır. EMS pozitif kontrol grubunda KTT frekansı 1,05; BTT frekansı 0,41; toplam mwh ve toplam klon frekansı ise 1,46 olarak tespit edilmiştir. İki grup arasındaki fark $P<0.05$ düzeyinde önemlidir. Profenofosun en yüksek uygulama grubunda (0.1 ppm) ise KTT klon frekansı 0,15; BTT klon frekansı 0,01; toplam mwh ve toplam klon frekansları ise 0,18 olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Negatif kontrol grubunda 0,358 olan KİF değeri de profenofosun en yüksek uygulama grubunda 0,666'ya yükselmiştir. Ancak negatif kontrol grubuna göre tüm klon frekanslarında yükseliş gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak bu durum önemsiz etkili (i) bulunmuştur ($P>0.05$).

Tablo 2. Profenofos ve profenofos+kuşburnu ekstralarının birlikte uygulaması sonucu SMART için elde edilen değerler.

Uygulama grubu (ppm)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip (1-2 hücre) (n=2)			Büyük tek tip (≥2 hücre) (n=5)			İliriz klon (n=5)			Toplam mwh klon (n=2)			Toplam klon (n=2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal kanat (mwh/fb)																	
Saf su	80	6	(0,08)		0	(0,00)		0	(0,00)		6	(0,08)		6	(0,08)		0,307
DMSO (%1)	80	9	(0,11)		1	(0,01)		0	(0,00)		10	(0,13)		10	(0,13)		0,512
EMS (1mM)	80	112	(1,40)	+	89	(1,11)	+	14	(0,18)	+	201	(2,51)	+	215	(2,69)	+	11,015
PROFENOFOS																	
0,025	80	12	(0,15)	i	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	15	(0,19)	i	15	(0,19)	i	0,768
0,05	80	14	(0,18)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	15	(0,19)	i	15	(0,19)	i	0,768
0,075	80	14	(0,18)	i	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	17	(0,21)	i	17	(0,21)	i	0,871
0,1	80	19	(0,24)	+	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	21	(0,26)	+	21	(0,26)	+	1,076
PRO + RCsu	80	15	(0,19)	i	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	17	(0,21)	i	17	(0,21)	i	0,871
PRO + RCeta	80	13	(0,16)	i	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	16	(0,20)	i	16	(0,20)	i	0,820
Serrat kanat (mwh/TM3)																	
Saf su	80	5	(0,06)		0	(0,00)					5	(0,06)		5	(0,06)		0,256
DMSO (%1)	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,358
EMS (1mM)	80	84	(1,05)	+	33	(0,41)	+				117	(1,46)	+	117	(1,46)	+	5,993
PROFENOFOS																	
0,025	80	8	(0,10)	i	1	(0,01)	i				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,461
0,05	80	12	(0,15)	i	0	(0,00)	i				12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,614
0,075	80	10	(0,13)	i	2	(0,03)	i				12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,614
0,1	80	12	(0,15)	i	1	(0,01)	i				13	(0,18)	i	13	(0,18)	i	0,666
DMSO: dimetil sülfoksit; EMS: etil metansülfonat; No: klon sayısı; Fr: frekans; D: istatistiksel sonuçların gösterimi; +: pozitif, -: negatif; i: önemsiz fark; mçarpım faktörü; p>0.05																	

Kuşburnu bitkisinin iyileştirici etkisini belirlemek için RCsu ve RCeta ekstreleri bir kez de profenofosun en yüksek konsantrasyonu (0,1 ppm) ile birlikte uygulanmıştır. RCsu uygulama grubu için hazırlanan kanat preparatları incelendiği zaman normal kanatta KTT, BTT, toplam mwh ve toplam klon frekansları sırası ile 0,19; 0,03; 0,21 ve 0,21; RCeta uygulama grubunda ise bu değerler sırasıyla 0,16; 0,04; 0,20 ve 0,20 olarak tespit edilmiştir. KİF değerleri ise RCsu uygulama grubunda 0,871; RCeta uygulama grubunda ise 0,820 olarak hesaplanmıştır. (Tablo 2). Profenofosun en yüksek uygulama grubu (0,1 ppm) ile hem RCsu hem de RCeta uygulama gruplarından elde edilen değerler karşılaştırıldığı zaman; KTT, toplam mwh ve toplam klon frekansları yönüyle azalmalar gözlenmiştir (Tablo 2). Şöyle ki; profenofosun en yüksek uygulama grubunda 0,24 olan KTT klon frekansı RCsu ve RCeta uygulama gruplarında sırasıyla 0,19 ve 0,16'ya; 0,26 olan toplam mwh ve toplam klon frekansları ise RCsu uygulama grubunda 0,21'e ve RCeta uygulama grubunda 0,20'ye düşmüştür. Bu düşüşler istatistiksel olarak negatif etkili (-) bulunmuştur ($P<0,05$). Serrat kanatta ise profenofosun en yüksek uygulama grubu pozitif etkili bulunmadığı için bitki ekstreleri ile iyileştirici etki çalışılmamıştır.

3. 2. Mikronükleus (MN) Testinden Elde Edilen Bulgular

Yapılan ön çalışmalar neticesinde profenofos için 1 ppm'den daha yüksek uygulama gruplarında binükleuslu hücre sayısının yeterli düzeyde olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle en yüksek uygulama grubu olarak 1 ppm ve diğer uygulama grupları da 0,25, 0,5 ve 0,75 ppm olmak üzere belirlenmiştir.

DMSO negatif kontrol grubunda 1,62 olan NBİ değeri, profenofos'un en yüksek uygulama grubunda (1 ppm) 1,25'e gerilemiştir (Tablo 3). NBİ değerinde gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Kuşburnu bitkisine ait iyileştirici etkilerin belirlenmesi için, profenofosun en yüksek uygulama grubu (1 ppm) ile birlikte uygulanan RCsu ve RCeta için ise NBİ değerleri sırasıyla 1,28 ve 1,30 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3). 1 ppm profenofos uygulama grubunda 1,25 olan NBİ değerinin, RCsu ve RCeta uygulama gruplarında yükseldiği ve bu yükselişinde istatistiki olarak önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$).

DMSO negatif kontrol grubunda $0,725\pm 0,24$ olan ortalama MN frekansı ise tüm profenofos uygulama gruplarında artmıştır. Profenofos'un 0,25, 0,5, 0,75 ve 1ppm uygulama gruplarında ortalama mikronükleus frekansları sırasıyla $0,750\pm 0,25$, $0,825\pm 0,40$, $0,950\pm 0,40$ ve $1,025\pm 0,60$ olarak belirlenmiştir (Tablo 3). Profenofosun en düşük uygulama grubu (0,25 ppm) hariç diğer uygulama gruplarında gözlenen bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). 1 ppm profenofos uygulama grubunda $1,025\pm 0,60$ olan ortalama MN frekansı, RCsu ile $0,925\pm 0,45$ 'e, RCeta ile de $0,900\pm 0,48$ 'e gerilemiştir (Tablo 3). Profenofos + RCsu ve RCeta uygulama gruplarına ait ortalama MN frekansında gözlenen gerileme istatistiki açıdan önemli iken ($P<0,05$), RCsu ve RCeta uygulama grupları arasındaki fark önemsizdir ($P>0,05$).

Tablo 3. Profenofos ve profenofos+kuşburnu ekstralarının uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri.

Uygulama grupları (ppm)	İncelenen binüldeuşu Hüre sayısı	Binüldeuşu hücrelerdeki MN sayısı			Ortalama MN frekansı \pm S.H. (%)	Nükleer bölünme indeksi \pm S.H. (NBİ)
		(1)	(2)	(3)		
DMSO (%1)	4000	27	1	-	0,725 \pm 0,24 ^a	1,62 ^a
EMS (1mM)	4000	85	10	1	2,700 \pm 1,22 ^a	1,52 ^c
PROFENOFOS						
0,25	4000	30	-	-	0,750 \pm 0,25 ^a	1,56 ^d
0,5	4000	31	1	-	0,825 \pm 0,40 ^b	1,49 ^c
0,75	4000	36	1	-	0,900 \pm 0,40 ^{bc}	1,37 ^b
1	4000	37	2	-	1,025 \pm 0,60 ^c	1,25 ^a
PROFENOFOS + KUŞBURNU						
PRO 1+ RCsu	4000	33	2	-	0,925 \pm 0,45 ^b	1,28 ^b
PRO 1+ RCeta	4000	36	-	-	0,900 \pm 0,48 ^b	1,30 ^b

MN: Mikronükleus; S.H.: Standart hata; * Duncan testine göre gruplar arasındaki fark P<0,05 düzeyinde önemlidir.

4. TARTIŞMA

Artan profenofos konsantrasyonuna bağlı olarak *D.melanogaster*'in 3.evre larvalarında mortalitenin artması (Tablo 1), insan periferik lenfosit hücrelerinde ise NBİ değerinin kontrol grubuna göre azalması (Tablo 3) toksik etkinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Profenofosun toksik etki gösterdiği yönünde daha önce yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Prabhavathy Das et al. [6] tarafından yapılan bir çalışmada, profenofosun insan lenfosit hücrelerinde apoptozis ve nekroze neden olduğu gözlenmiştir. 28 gün boyunca profenofosa maruz kalan sıçanların karaciğer, böbrek, dalak ve testis dokularında patolojik değişikliklerin olduğu belirlenmiştir [5]. Reddy and Rao [23], yine bu insektisite maruz kalan alabalık solucanlarında (*Eisenia foetida*) vücutta kopmalar, lezyonlar, hücre bezeleri ve kas parçalanmaları şeklinde çeşitli histolojik ve morfolojik değişiklikler gözlerken İsmail et al. [4]'da sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) denge, hareket ve davranış bozukluklarının meydana geldiğini rapor etmiştir. Farelerde anormal sperm oluşumuna, sperm sayısının ve canlılığının azalmasına [24, 25], 16 haftalık wistar sıçanlarında ise seminer tüplerinde ve lüding hücrelerinde yapısal bozulmalara yol açtığı da rapor edilmiştir [1]. Abdullah et al. [26]'a göre, profenofos Avustralya tatlı su karideslerinde (*Paratya australiensis*) asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek nötoksik etkiye de sebep olmaktadır.

Farklı canlı grupları üzerinde toksik özellikleri belirlenen profenofosun hem SMART hem de MN testleri ile genotoksik etkili olduğu da belirlenmiştir. Bu konuya yönelik daha önce yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir kaçında; profenofosun farelerin spermatogoniumlarında, sperm ve kemik iliği hücrelerinde kromozomal bozukluklara yol açtığı [24, 27], sıçanların polikromatik eritrositlerde mikronükleus frekansını artırdığı [5], insan periferik lenfosit hücrelerinde ise kromozomal kırıklara, gaplara ve DNA hasarlarına neden olduğu [6] görülmüştür. Bu araştırmacılara göre, profenofosun toksik ve genotoksik etkileri onun

oksidatif stresi artırıcı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Şöyleki; Mansour et al. [28]'a göre profenofos erkek sıçanlarda katalaz aktivitesini artırmakta ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Siyah Mozambik balıklarında (*Oreochromis mossambicus*) da antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek oksidatif strese neden olmaktadır [29]. Profenofosa bağlı olarak *Drosophila*'da ve insan periferik lenfositlerinde gözlenen genotoksik etkinin de oksidatif strese dayalı olarak meydana gelebileceği kuvvetle muhtemeldir.

Oksidatif strese karşı antioksidan özelliğe sahip çeşitli bitkilerin kullanımı ile genotoksik etkiler giderilebilmektedir. Bu çalışmada da kuşburnu bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının profenofosa karşı antigenotoksik özelliği hem *in vivo* (Tablo 2) hem de *in vitro* (Tablo 3) olarak mutasyon frekansındaki düşüşe bağlı olarak gözlenmiştir.

Kuşburnu gibi farklı bitki türlerinin de benzer etkilere sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Karakaya ve Kavas [30] tarafından yapılan bir çalışmada, Ames testi kullanılarak ısırgan otu, adaçayı, kuşburnu gibi bitkiler ile üzüm pekmezi ve tarhana gibi gıdaların hem genotoksik hem de antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışılan besinlerden hiçbirinin genotoksik etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Üstelik tüm besinlerin sodyum azidin (NaN₃) mutajenik etkilerini azalttığı, en yüksek antimutajenik etkinin ise ısırgan otu (%46,32) ve kuşburnunda (%44,03) gözlemlendiği bildirilmiştir. Kızılet et al. [31], kanat benek testi (SMART) kullanarak yaptıkları çalışmada, kuşburnu etanol ekstresinin etil metansülfonatın (EMS) mutajenik etkilerini azalttığını rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise sipermetrin ve fenvalerat insektisitlerinin genotoksik etkileri kuşburnu bitkisine ait ekstraktlar ile giderilmiştir [32]. Kılıçgün and Dehen [33] *in vitro* test sistemleri ile kuşburnunun DNA hasarı üzerine koruyucu etkilerini araştırmışlar ve % 3'lük uygulama ile protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu ve DNA hasarının belirgin şekilde inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise kuşburnu ile aynı familyada yer alan kestane gülünün (*Rosa roxburghi*), 2-asetilaminoflorin ve aflatoksin B1 gibi mutajen maddelere karşı iyileştirici olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [34]. Kuşburnunda bulunan fenolik bileşiklerden birisi olan protokatehuik asidin [35] hidrojen peroksidin etkilerine karşı antimutajenik özellik gösterdiği *Drosophila* kanat benek testi ile belirlenmiştir [36]. Yine kuşburnu meyvelerinde bulunan metil galat fenolik bileşiğinin de [37] fare periferik kan hücrelerinde mikronükleus oluşumunu ve lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir [38]. Kuşburnunda bol miktarda bulunan bileşiklerden bir diğeri olan askorbik asidin ise etil metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) gibi mutajen maddelerin etkilerini azalttığı *Drosophila* kanat benek testi (SMART) ile gösterilmiştir [39].

Bu çalışmada gözlenen iyileştirici etkinin kuşburnuna ait antioksidan özelliklerden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Çünkü birçok araştırmacı tarafından kuşburnunun antioksidan maddeler içerdiği ve oksidatif stresi giderdiği rapor edilmiştir. Tumbas et al. [10] kuşburnu çaylarındaki C vitamini ve fenolik bileşikler ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir ilişki olduğunu tespit etmiştir. Kuşburnundaki fenolik bileşiklerin HeLa, MCF7 ve HT-29 hücrelerinin bölünmesi üzerine inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. 25 µg /ml kurutulmuş kuşburnu özütünün lipit peroksidasyonunu %83,7 oranında inhibe ettiği [40], Montazeri et al. [15] tarafından da kuşburnu metanol ekstresinin güçlü bir antioksidan olduğu ifade edilmiştir. Daels-Rakotorison et al.[41] tarafından yapılan bir çalışmada, kuşburnu ekstraktlarının polinükleer nötrofil hücrelerinde serbest radikallerin oluşumunu azalttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri verilerin sonucunda kuşburnunun sadece besin olarak düşünülmemeyeceğini, tedavi edici

potansiyelinden dolayı biyoaktif moleküllerin de önemli bir kaynağı olduğunu dile getirmişlerdir. Roman et al. [42], çalıştığı diğer kuşburnu türlerine göre *R.canina*'nın biyoaktif bileşikler yönü ile daha zengin olduğunu belirlemiştir. Kuşburnu tohumu ile beslenen farelerde plazma kolesterol ve trigliserit oranının önemli derecede azaldığı dolayısı ile kuşburnunun diyet gıdalarda kullanılabileceği ifade edilmiştir [43].

Sonuç olarak; genotoksik etkili olan profenofos, tarımsal üretimde sürekli ve yüksek dozlarda kullanıldığı takdirde çevre ve insan sağlığı için olumsuz etkilere sebep olabilecek bir insektisittir. Ayrıca antijenotoksik etkileri farklı organizma ya da hücre kültürleri üzerinde gözlenmiş olan kuşburnu meyvelerinin sahip olmuş olduğu etken maddeler , bu çalışmada su ve etanol ekstraktları ile oksidatif stresi inhibe etmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar da bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Ancak kuşburnu meyvesinin piyasada bulunan ve çok fazla işleme tabi tutulmamış ev tipi marmelat, meyve suyu, püre formlarının kullanılması ya da doğal meyve şeklinde günlük diyet için de yer alması ile herhangi bir kimyasal maddenin oksidatif etkilerinin önlenebileceği kuvvetle muhtemeldir.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Moustafa G.G., Ibrahim Z.S., Hashimoto Y., Alkelch A.M., Sakamoto K.Q., Ishizuka M., Fujita S., (2007). Testicular toxicity of profenofos in matured male rats. Arch Toxicol, 81, 875–881.
- [2]. Habiba R.A., Ali H.M., Ismail S.M., (1992). Biochemical effects of profenofos residues in potatoes. J. Agric. Food Chem, 40, 1852–1855.
- [3]. He J., Fan M., Liu X., (2010). Environmental behavior of profenofos under paddy field conditions. Bull Environ Contam Toxicol, 84, 1771–774.
- [4]. İsmail M., Ali R., Ali T., Waheed U., Khan Q.M., (2009). Evaluation of the acute toxicity of profenofos and its effects on the behavioral pattern of fingerling common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). Bull Environ Contam Toxicol; 82, 569–573.
- [5]. Hammam F.M., Abd el Mottaleb E.M., (2007). Studies of the genotoxic and histopathological effects of the organophosphorous insecticide 'profenofos' on white rats. The Egypt J Hosp Med, 29, 685–706.
- [6]. Prabhavathy Das G., Pash A., Jamil S., Jamil K., (2006). Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides *in vitro* on human lymphocytes using DNA diffusion assay. Drug Chem Toxicol, 29, 147–156.
- [7]. Li X., Li S., Liu S., Zhu G., (2010). Lethal effect and *in vivo* genotoxicity of profenofos to Chinese native amphibian (*Rana spinosa*) tadpoles. Arch Environ Contam Toxicol, 59, 478–483
- [8]. Principe P., (1991). Monetizing the Pharmacological Benefits of Plants, US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- [9]. Cowan M.M., (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev; 12, 564–582.
- [10]. Tumbas V.T., Čanadanovic-Brunet J.M., Cetojevic-Simin D.D., Cetkovic G.S., Dilas S.M., Gille L., (2012). Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. J Sci Food Agric, 92, 1273–1281.
- [11]. Willich S.N., Rossnagel K., Roll S., Wagner A., Mune O., Erlendson J., Kharazmi A., Sørensen H., Winther K., (2010). Rose hip herbal remedy in patients with rheumatoid arthritis – a randomised controlled trial. Phytomedicine, 17, 87–93.

- [12].Orhan N., Aslan M., Hosbas S., Deliorman O.D., (2009). Antidiabetic affect and antioxidant potential of *Rosa canina* fruits. Phcog Mag, 5, 309–315.
- [13].Pieroni A., Quave C.L., (2005). Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: A comparison. J Ethnopharmacol 101, 258–270.
- [14].Ercisli S., (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. Food Chem, 104, 1379–1384.
- [15].Montazeri N., Baher E., Mirzajani F., Barami Z., Yousefian S., (2011). Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* fruit from Iran. J Med Plants Res, 5, 4584–4589.
- [16].Serteser A., Kargioglu M., Gok V., Bagci Y., Ozcan M.M., Arslan D., (2008). Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey. Int J Food Sci Nutr, 59, 643–651.
- [17].Graf U., Würgler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. and Kale P.G., (1984). Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mol Mutagen, 6, 153–188.
- [18].Frei H., Würgler F.E., (1996). Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutagenesis, 11, 315–325.
- [19].Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res-Gen Tox En, 534, 65–75.
- [20].Kocaman A.Y., Topaktas M., (2009). The *in vitro* genotoxic effects of a commercial formulation of a-cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen, 50, 27–36.
- [21].Cakir A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. Biochem Syst Ecol, 33, 245–256.
- [22].Halici M., Odabasoglu F., Suleyman H., Cakir A., Aslan A., Bayir Y., (2005). Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. Phytomedicine, 12, 656–662.
- [23].Reddy N.C., Rao J.V., (2008). Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. Ecotoxicol Environ Saf, 71, 574–582.
- [24].El Nahas S.M., De Hondt H.A., Abdou H.E., (1989). Chromosome aberrations in spermatogonia and sperm abnormalities in Curacron treated mice. Mutat Res, 222, 409–414.
- [25].El-Hoda N., Zidan A., (2009). Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rat. Int J Pharmacol, 5, 51–57.
- [26].Abdullah A.R., Kumar A., Chapman J.C., (1994). Inhibition of acetylcholinesterase in the Australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos. Environ Toxicol Chem, 13, 1861–1866.
- [27].Fahmy M.A., Abdalla E.F., (1998). Genotoxicity evaluation of buprofezin, petroleum oil and profenofos in somatic and germ cells of male mice. J Appl Toxicol, 18, 301–305.
- [28].Mansour M.K., El-Kashoury A.A.I., Rashed M.A., Koretem K.M., (2009). Oxidative and biochemical alterations induced by profenofos insecticide in rats. Nat Sci, 7, 1–15.
- [29].Kavitha P., Rao J.V., (2009). Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Ecotoxicol Environ Saf, 72, 1727–1733

- [30].Karakaya S., Kavas A., Antimutagenic activities of some foods. J Sci Food Agr 1999; 79, 237–242.
- [31].Kızılet H., Kasimoğlu C., Uysal H., (2013). Can the *Rosa canina* plant be used against alkylating agents as a radical scavenger? Pol J Environ Stud, 22, 1263–1267.
- [32].Kasimoglu C., Uysal H., (2015). Mutagenic biomonitoring of pirethroid insecticides in human lymphocyte cultures: Use of micronuclei as biomarkers and recovery by *Rosa canina* extracts of
- [33].Kılıçgün H., Dehen A., (2009). *In vitro* antioxidant effect of *Rosa canina* in different antioksidant test systems. Pharmacog Res, 1, 417–420.
- [34].Westhuizen F.H., Rensburg C.S., Rautenbach G.S., Marnewick J.L., Loots T., Huysamen C., Louw R., Pretorius P.J., Erasmus E., (2008). In vitro antioksidant, antimutagenic and genoprotective activity of *Rosa roxburghii* fruit extract. Phytother Res, 22, 376–383.
- [35].Khadem S., Marles R.J., (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. Molecules, 15, 7985–8005.
- [36].Anter J., Romero-Jimenez M., Fernandez-Bedmar Z., Villatoro-Pulido M., Analla M., Alonso-Moraga A., Munoz-Serrano A., (2011). Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. J Med Food, 14, 276–283.
- [37].Hvattum E., (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. Rapid Commun Mass Spectrom, 16, 655–662.
- [38].Lee S.C., Kwon Y.S., Son K.H., Kim H.P., Heo M.Y., (2005). Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. Arch Pharm Res, 28, 775–783.
- [39].Kaya B., (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. Turk J Biol, 27, 241–246.
- [40].Gao X., Björk L., Trajkovski V., Uggla M., (2000). Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. J Sci Food Agr, 80, 2021–2027.
- [41].Daels-Rakotoarison D.A., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Luyckx M., Dine T., Bailleul F., Cazin M., Cazin J.C., (2002). Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst. Phytother Res, 16, 157–161.
- [42].Roman I., Stanila A., Stanila S., (2013). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania, Chem Cent J., 7, 73.
- [43].Kadalkal Ç., Gürsoy O., Nergiz C., (1999). Gümüşhane yöresinde doğal olarak yetişen kuşburnu (*Rosa canina* L.) bitkisinin meyve ve çekirdeğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi, 4, 34-41.