

Siklofosfamid Nedenli Hematoksisite Üzerine Karvakrol'ün Sitoprotektif Etkileri

Öznur Yeşildağ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2012

Protective Effect of Carvacrol on Cyclophosphamide-Induced Hematoxicity in Rats

Öznur Yeşildağ

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

June 2012

Siklofosamid Nedenli Hematoksisite Üzerine

Karvakrol'ün Sitoprotektif Etkileri

Öznur YEŞİLDAĞ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Adnan AYHANCI

(Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fon'unca desteklenen
201019007 numaralı projenin bir kısmıdır.)

Haziran 2012

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Öznur Yeşildağ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Siklofosfamid Nedenli Hematoksisite Üzerine Karvakrol’ün Sitoprotektif Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Adnan AYHANCI

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Adnan AYHANCI

Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ

Üye : Prof. Dr. Mehtap KUTLU

Üye : Prof. Dr. Kubilay UZUNER

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Siklofosfamid (CP) klinikte kanser ve non-malignant hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan alkilleyici sitotoksik bir ilaçtır. CP'nin antitümoral etkinliği yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır. Ancak yüksek doz CP kan ve kemik iliği toksisitesine neden olmaktadır. CP'ye bağlı hematoksisite, kan dokusunda lipit peroksidasyonunun artışıyla yakından ilişkilidir. Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulmuş hematoksisitede uçucu yağların temel bileşeni olan ve antioksidan özellikleri bilinen karvakrol'ün (Car) kan ve kemik iliğinde olası koruyucu etkilerini saptamak amaçlandı. Çalışmamızda, Sprague-Dawley cinsi 91 adet erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 13 gruba ayrılmıştır (kontrol, 50, 100 ve 150 mg/kg CP; 0.5 mL zeytinyağı; 5 ve 10 mg/kg Car; 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg Car; 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car). CP ile birlikte Car verilen gruplarda Car uygulamasına CP uygulamasından 3 gün önce başlandı ve deney sonuna kadar devam edildi (6 gün). 4. gün hayvanlar tekrar tartıldı, CP dozları hesaplandı ve CP+Car birlikte verildi. Sadece CP verilen gruplarda CP uygulamasından üç gün sonra anestezi yapıldı. Böylece 4. ve 7. günlerde hayvanlardan anestezi altında intrakardiyak kan alımı yapıldıktan sonra sıçanların femurundan kemik iliği dikkatlice alındı. Periferik kan hücreleri ve kemik iliği çekirdekli hücreleri kan sayım cihazında sayıldı. İntraperitoneal CP uygulaması doz artışına paralel olarak sırasıyla lökosit (%59, 77, 86), trombosit (%9, 30, 35) ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarını (%58, 82, 94) azalttı. CP ile birlikte 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney gruplarındaki lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının sadece CP verilen gruplara göre önemli bir oranda arttığı görüldü ($p<0.001$). CP nedenli myelosupresyon ve hematoksisitenin önlenmesinde 10 mg/kg Car 5 mg/kg Car'e göre daha koruyucu olmuştur. Verilerimiz, Car dozunun belirli oranlarda değiştirilmesiyle, artan CP dozuna karşı daha güçlü bir koruyucu etkinliğin sağlanabileceğini düşündürmektedir. CP nedenli hematoksisitenin önlenmesinde Car'ün farklı dozlarını içeren çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Siklofosfamid, hematoksisite, karvakrol, sitoprotektivite, sıçan.

SUMMARY

Cyclophosphamide (CP) is an alkylating agent used in clinics to treat malign and non malign diseases. The antitumor activity of the drug depends on the dose of administration whereas the higher doses cause blood and bone marrow toxicity. The hematoxicity of CP is closely linked to increase in lipid peroxidation of blood. The aim of this study is to test protective effect of carvacrol (Car) which is the main component of volatile lipids showing an antioxidant activity on blood and bone marrow. In this study there were 91 male Sprague-Dawley rats used, rats were divided into 13 groups each consisting 7 animals; (control, 50, 100 and 150 mg/kg CP; 0.5 mL olive oil; 5 and 10 mg/kg Car; 50+5, 100+5 and 150+5 mg/kg Car; 50+10, 100+10 and 150+10 mg/kg CP+Car). In groups which Car was administrated with CP, Car therapy alone was started 3 days earlier and continued till the end of the experiment (6 days). On 4th day animals were weighed again the relative doses of CP was calculated and CP was given together with Car. In groups which receive CP alone, anesthesia was given 3 days after CP administration. On days 4 and 7 blood was taken intracardiacally under anesthesia and then femur was dissected carefully. Peripheric blood cells and bone marrow nucleated cells were counted on blood counter. Intraperitoneal CP administration reduced dose dependantly leukocyte (%59, 77, 86), thrombocyte (%9, 30, 35) and bone marrow nucleated cells (%58, 82, 94). In groups where CP was adminisrated together with 5 ve 10 mg/kg Car leukocyte, thrombocyte and bone marrow nucleated cell numbers were significantly increased ($p<0.001$) compared to cell numbers of the groups where CP was given alone. 10 mg/kg Car was better than 5 mg/kg Car at preventing CP related myelosuppression and hematoxicity. These results show that Car doses can be increased relative to the CP dose to reach a stronger protective effect. We think there should be further experiments in which different doses of Car will be used to prevent CP related toxicity.

Key words: Cyclophosphamide, hematoxicity, carvacrol, cytoprotectivity, rat.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleşmesinde bana danışmanlık ederek, beni ynlendiren ve her trl olanağı sağlayan danışman Sayın Hocam Do. Dr. Adnan AYHANCI'ya en içten saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Sayın hocalarım Prof. Dr. Mehtap KUTLU, Prof Dr. Fatma Sultan KILIÇ, Prof Dr. Kubilay UZUNER ve Yrd. Doç. Dr. nal ZELMAS'a zaman ayırıp teze buldukları katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistiksel işlemlerinde çok değerli yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Ahmet MUSMUL'a ve yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sibel GÜNEŞ'e de teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin sonlanmasını sabırla bekleyen, maddi manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim annem Güzide, babam Ali YEŞİLDAĞ'a ve kardeşlerime teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siklofosfamid	3
2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	5
2.3. Antioksidanlar	6
2.4. Kekik	6
2.4.1. Karvakrol'ün genel özellikleri	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1. Deney Hayvanları.....	12
3.2. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonlar.....	12
3.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar.....	13
3.4. Deney Grupları.....	13
3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	15

4. BULGULAR.....	16
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Siklofosfamidin kimyasal yapısı	3
2.1.2. Siklofosfamidin metabolizması	5
2.4.1.1 Karvakrol'ün kimyasal yapısı	11
4.1. Kontrol grubu ve diğer grupların lökosit sayılarının ortalama değerlerinin dağılımı	17
4.2. Kontrol grubu ve diğer grupların trombosit sayılarının ortalama değerlerinin dağılımı	19
4.3. Kontrol grubu ve diğer grupların kemik iliği sayılarının ortalama değerlerinin dağılımı	21

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.3.1. Serbest radikal kaynakları etkisiz hale getiren antioksidan maddeler	6
3.4.1. Uygulanan siklofosfamid ve karvakrolun gruplara göre dağılımı	14
3.4.2. Siklofosfamid ve karvakrolun gruplara uygulanma şekli	15
4.1. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	24
4.2. 0,5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	25
4.3. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	26
4.4. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler****Açıklama**

μ	Mikrometre=mikron=10 ⁻⁶ metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
n	Denek sayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar**Açıklama**

ACR	Akrolein
AO	Antioksidan
Car	Karvakrol
CP	Siklofosamid
FAM	Fosforamid mustard
SOR	Serbest Oksijen Radikali

1. GİRİŞ

Kanser dünyada ve ülkemizde sağlığı tehdit eden önemli sorunlardan biri olup, ölüme yol açan hastalıklar arasında dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye’de kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ayrıca teknolojinin gelişmesi, erken tanı, bireysel bilinçlenme ve tanı alanında arayışlar, tanılanan kanser sayısının artması, bu vakalara her geçen gün yenilerinin eklenmesi, tanı ve tedavi alanında daha fazla çalışma yapılmasına ve yeni ilaçların uygulama alanına girmesine neden olmaktadır (OHD, 2009).

Kemoterapi kanser tedavisinde, neoplastik hastalığın sürecini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla antineoplastik ilaç kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların bazılarının kansere neden olduğu gerek insanlar üzerinde yapılan gözlemler gerekse hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Ehrenfried et al., 1997; Furuta et al., 2000; Watanabe et al., 2001; Fairchild et al., 1979; Kinlen et al., 1981). Antineoplastik ilaçların en fazla kanserojenik olanları alkilleyici (Siklofosfamid, Karmustin, Klorambusil, Prokarbazin vb.) tipte olanlarıdır (Kayaalp, 1989). Alkilleyici ilaçların kemoterapide dozunu kısıtlayan en önemli etkisi ise bağışıklık baskılayıcıdır (Pool et al., 1988; Kawabata et al., 1990; Stockman et al., 1973; Turc and Poulter, 1972). Alkilleyici ilaçların immunosupressif etkilerine bağlı olarak lökopeni, trombositopeni ve lenfopeni gelişmektedir. Bu durum onların yüksek dozda ve/veya daha sık kullanılmasıyla daha güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanmasını engeller (Kalaycıoğlu et al., 1995; Sandberg et al., 1995; Cingi ve ark., 1996).

Siklofosfamid, kanser tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir ilaçtır. CP; akut ve kronik lösemi, meme kanseri, multiple myeloma, lenfoma, romatoid artrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde sıkça kullanılır (Kumar et al., 2004; Senthikumar et al., 2006). CP’nin başlıca yan etkileri hematopoietik depresyon, hemorajik sistit ve renal toksisitedir. CP hematoksisite, ürotoksisite, teratojenite, mutajenite, karsinojenite ve kemik iliğinin baskılanması gibi düşündürücü toksik etkilere sahiptir (Kumar et al., 2004).

CP’nin iki aktif metaboliti fosforamid mustard (FAM) ve akroleindir (ACR). CP’ nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM’ ın DNA’ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP’nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı

olduğu düşünölmektedir. CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku antioksidan (AO) savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda SOR oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir (Kawabata et al., 1990).

ACR kaynaklı oluşan serbest radikaller; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların fonksiyonlarını bozarlar. Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir (Senthilkumar et al., 2006).

CP'nin toksik etkilerini önleyerek daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiş ise de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek metotların arayışı içindedir (Ayhanci et al., 2008). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı fenolik bileşiklerin hücre koruyucu etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur.

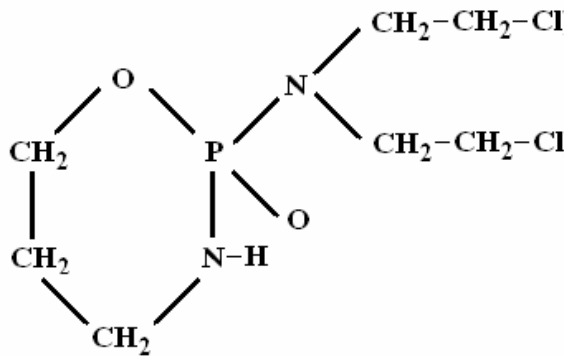
Kekik yağının ve kekik suyunun ana bileşiği olan karvakrolün (Car) lipozom fosfolipidlerinin peroksidasyonunu inhibe ettiği ve çeşitli sentetik AO'lardan çok daha yüksek bir AO aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Uçucu bir monoterpen olan bu bileşik; antimikrobiyal, antifungal, doğal gıda koruyucu ve memelilerde yaşlanmayı geciktirici özelliklere sahiptir (Tran-Thi et al., 2006). Ayrıca Car'ün güçlü bir antimutajenik ve antitümör etkilerinin olduğu ileri sürölmüştür (Ipek et al., 2005).

Biz de bu çalışmamızda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş CP nedenli kan ve kemik iliği toksisitesine karşı hücre ve dokularda koruyucu etkisinin olduğu düşünölen Car'ün olası koruyucu etkilerini araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide = CP)

Alkilleyici ilaçlar grubuna giren CP kanser tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir oxazaphosparin'dir (Pool et al., 1988). Ancak myelosupresyon, ürotoksisite, mutajenite, teratojenite ve karsinojenite gibi düşündürücü toksik etkilere de sahiptir (Ayhanci et al., 2008; Büyüknacar et al., 2008). CP'nin insanda özellikle lösemi ve mesane karsinojenitesine neden olduğu konusunda yeterli veri vardır (IARC, 1981). CP'nin kimyasal yapısı şekil 2.1.1'de gösterilmiştir (Budavari, 1987).



Şekil 2.1.1 Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3-oksazofosforin 2-oksit (Budavari, 1987).

CP tarafından oluşturulan bağışıklık baskılayıcılık ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında CP, 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Bu metabolit enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide yeniden düzenlenir. Bu da FAM ve ACR'ye ayrılır. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Öte yandan ACR'nin önemli makromoleküllerinin sülfidril gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiği böylece bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Kawabata et al., 1990; Kwon et al., 1987; Pool et al., 1988). Oluşan ara ürünler veya son metabolitlerin;

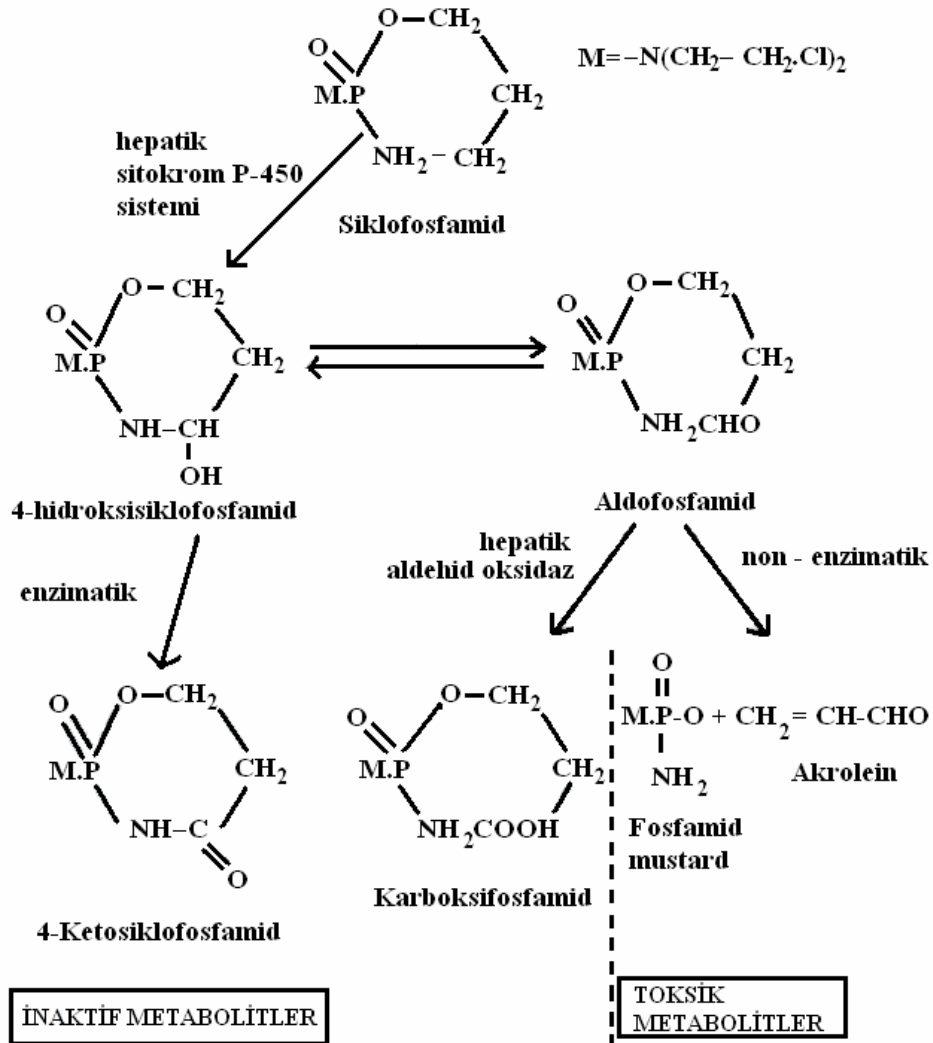
kanser seçiciliği, sistemik toksisite, mutajenite, teratojenite, genotoksisite ve kanserojenite gibi farklı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir (Pool et al., 1988). CP'nin metabolizması şekil 2.1.2'de gösterilmiştir (Gilman et al., 1999).

CP'nin kullanım alanları şunlardır;

- _ Hodgkin dışı lenfomalar (Glode et al., 1981; Kreuser et al., 1993)
- _ Çocukların akut lenfositik lösemisi (Bokser et al., 1990; Morris, 1993)
- _ Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri (Thatcher et al., 1988)
- _ Hodgkin hücreleri (Ayhanci et al., 2008)
- _ Pediatrik solid tümörler (Bramwell et al., 1987)

Ayrıca güçlü bağışıklık baskılayıcı etki göstermesi nedeni ile romatoid artrit, çocukların nefrotik sendromu (Koyama et al., 1977), behçet hastalığı (Özyazgan ve ark., 1992) ve diğer bazı otoimmün hastalıklarda (Kayaalp, 1989) da kullanılmaktadır.

CP'nin kendine özgü bir yan etkisi steril hemorajik sistittir (Di Palma and Di Gregorio, 1990; Büyüknacar et al., 2008). Bu durum idrar içindeki ilaçtan ve onun 4-hidroksi metabolitinden ziyade tahriş edici bir madde olan ACR oluşumuna bağlıdır (Al- Safi and Maddoks, 1986; Cavaletti et al., 1986). Öte yandan CP'nin insanlarda ve deney hayvanlarında mesane kanseri yaptığı yönünde raporlarda bulunmaktadır (Lahdetie et al., 1990). CP' nin kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olduğunu göstermiştir (Bramwell et al., 1987; Blom et al., 1995; Moore et al., 1995).



Şekil 2.1.2 Siklofosfamidin metabolizması (Gilman et al.,1999).

2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Serbest oksijen radikalleri (SOR), besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında SOR kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır (Memişoğulları, 2005).

Aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere AO savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut AO savunma sistemi SOR'ların etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (ARGE, 2010). Oksidatif stres SOR'lar ve AO'lar arasındaki dengenin SOR'lar lehine bozulmasıdır (Memişoğulları, 2005).

2.3. Antioksidan (AO)

AO'lar vücudu SOR'ların yıkıcı gücüne karşı hücreleri koruyan moleküllerdir. Hücrenin DNA'sı, protein yapılarının özellikle oksijen ve akrabalarının yıkıcı gücüne karşı korunması yaşlanma hızını düşürebilir (Turgay, 2008).

Tablo 2.3.1. Serbest radikal kaynakları etkisiz hale getiren antioksidan maddeler (Turgay, 2008).

Serbest Radikal Kaynakları	Antioksidan Moleküller
Aşırı alkol tüketimi	Enzimler (SOD, Katalaz, GSH-Px)
Sigara kullanımı	Proteinler (Albumin, serüloplazmin)
Elektromanyetik radyasyon	Selenyum
Güneş ışınları(UV)	Askorbik asit (C vitamini)
Kronik inflamasyonlar	Tokoferoller (E vitamini)
Aşırı demir yüklemesi	Karotenoidler
Aşırı fiziksel egzersiz	Flavonoidler
Yaşlanma	Glutatyon ve tiyoller
Doğum kontrol hapları	Koenzim Q, ubikinon ve türevleri

2.4. Kekik

Aromatik hoş bir koku ve lezzet verici özelliğinden dolayı besin olarak kullandığımız bitki çeşitlerinden birisi de kekiktir. Tedavi amaçlı ilaç olarak da değerlendirilen kekiğin ülkemizde ticareti de yapılmaktadır. Hepsi Ballıbabagiller (Labiatae = Lamiaceae) familyasına bağlı kekik türlerinin dahil olduğu *Origanum*, *Thymbra*, *Coridothymus*, *Satureja* ve *Thymus* cinsleri vardır. Türkiye, Lamiaceae familyasının önemli bir gen merkezi konumunda olup, bu familyaya ait 45 cins olmak üzere toplam 731 takson ile temsil edilmektedir. Ülkemizdeki endemizm oranı %44.2 olan bu familya, Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır (Başer, 1993; Kocabaş, 2001). Uçucu yağ üretiminde kullanılan türlerinin ise *Origanum onites*

(bilyalı kekik, izmir kekiği), *Origanum vulgare* sub sp. *hirtum* (İstanbul kekiği, kara kekik), *Origanum minutiflorum* (sütçüler kekiği, yayla kekiği, toka kekiği), *Origanum majorana* (beyaz kekik, alanya kekiği) *Origanum syriacum* var. *bevanii* (dağ kekiği, Suriye kekiği, İsrail kekiği) dir (Başer, 2001, 2002). *Origanum*, sindirim, solunum sistemi rahatsızlıklarında, antiseptik, antispazmatik, gaz giderici, terletici, kadın hastalıklarında, uyarıcı, balgam, idrar ve gaz söktürücü, ses kısıklığı, öksürük, boğmaca, kellik ve uyuzluğun tedavisinde kullanılabilecek özelliklere sahiptir (Ayhancı et al., 2008). Bu bitkinin özüt ya da yağlarının yaşlanma önleyici, antibakteriyel, antifungal, antiseptik özellikleri vardır. Uçucu yağın %60' tan fazla bir kısmını Car ve timol oluşturmaktadır.

Kekik türlerinin yer aldığı Labiate familyasının tüm cinslerinde ortak özellik, yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşiminin kekiğe kendine özgü kokusunu veren Car ve/veya timol' ün olmasıdır (Başer, 2001; Baydar et al., 2004).

Yüksek oranda Car (5-isopropyl-2-methylphenol) ve timol içeren esansiyel yağların en yüksek AO etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Balladin and Headly, 1999). Bu bileşikler farklı biyoaktif özellikler de gösterirler. Flavonoidler ve E vitamini gibi uçucu olmayan AO'lar *Timus vulgaris* türünün ekstraktlarında bulunur (Dapkevicious et al., 2002). Kekik sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı besin sanayisinde koruyucu olarak kullanılır. *Origanum* cinsi Akdeniz, Avrupa, Sibirya ve İran bölgelerinde yaklaşık 38 tür içerir. *Origanum* türlerinin üyeleri dünyada en önemli aromatik bitkiler arasında yer alır.

Türkiye ve doğu ege florasında 24 türü ve 27 sınıfı bulunan *Origanum* cinsinin 16 türü endemiktir (Aligiannis et al., 2001). *Origanum* bitkileri genellikle yemeklere lezzet katmak için ve alkollü içki yapımında kullanılır. *Origanum* bitkilerinin antifungal, antibakteriyel, antioksidan, antikanserojen ve insektisel özelliklerinden ötürü *Origanum* türlerinin bileşikleri çok fazla çalışılmıştır (İpek et al., 2005). *Origanum* sınıfı aşağıda belirtilmiş olan ana bileşiklere göre 3 gruba ayrılabilir (Kokkini, 1996);

- 1) Linalool, terpinen-4-ol, sabinene
- 2) Karvakrol ve Timol
- 3) Sesquiterpenler

Esansiyel yağların antimikrobiyal etkilere sahip olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Esansiyel yağlar bitkilerden elde edilen, uçucu ve lipofilik bileşiklerdir. Bitkilerin sekonder metabolitlerinden elde edilirler. Genellikle mekanik baskıyla, su ve buhar distilasyon yöntemiyle elde edilirler (Bruneton, 1999). Kimyasal olarak başlıca monoterpenler, sesquiterpenler, alkoller, eterler, aldehitler, esterler ve ketonlar esansiyel yağların ana bileşenleridir (Dorman and Deans, 2000). Günümüzde esansiyel yağların antibakteriyal, antioksidan, antifungal, bakterisid, fungusid ve insektisel etkilere sahip oldukları çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Aeschbach, 1994; Twetman, 1995). Yüksek oranda fenolik bileşikler içeren esansiyel yağların yüksek oranda antimikrobiyal etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Bunlara ilaveten antioksidan özelliklerinden dolayı kozmetikte, antiseptik özelliklerinden dolayı ağız bakım ürünlerinde ve besinleri koruyucu özelliklerinden ötürü de besin sanayinde kullanılmaktadırlar (Tepe, 2005; Tran, 2006).

Monoterpenler, çeşitli bitki özlerindeki yağlardan elde edilmektedir. Aynı zamanda çeşitli ilaçların da içinde kullanılmaktadır (Vaddi et al., 2002; Kunta et al., 1997; Godwin and Michniak, 1999). Monoterpenler, esansiyel yağların en önemli bileşenleridir (Muhlbauer et al., 2003).

Monoterpenler; hidrokarbonlar, alkoller, oksitler ve diğerleri gibi çeşitli kimyasal sınıflara aittir (Vaddi et al., 2002; Godwin and Michniak, 1999; Gao and Singh, 1998).

Esansiyel yağlar ve monoterpenler lipofilik bileşiklerdir, kolaylıkla hücre membranlarından geçerler ve bu nedenle deri ve akciğer tarafından absorbe edilmektedirler (Muhlbauer et al., 2003).

Yapılan bir çalışmada bağırsak hücreleri ve *E. coli* bakterisi üzerinde *Oregano* (*Lamiaceae*), *Timus* (*Lamiaceae*), *Clove* (*Myrataceae*) ve *Cinnamon* (*Lauraceae*) esansiyel yağları ve onların ana bileşenleri olan Car, timol, eugenol gibi bileşiklerin etkilerine bakılmıştır. Esansiyel yağların bakteriyi tamamen inhibe ettikleri dozların görece olarak kültürlenmiş intestinal hücrelerde yüksek sitotoksik etkileri olduğu bulunmuştur. Bu etkiler doza bağlıdır. Yapılan çalışmada cinnamon ve clove uçucu yağı ile onların major bileşeni eugenol düşük dozlarda sitotoksik etki göstermezken kısmi bir antimikrobiyal etki göstermiştir. *Oregano* uçucu yağı ve major bileşeni Car düşük dozlarda apoptotik hücre ölümünü çok hafifçe artırırken şiddetli antimikrobiyal

etki göstermiştir. Timus uçucu yağı yüksek sitotoksositeye sahipken onun ana bileşeni timol sitotoksik etki göstermeyip kuvvetli antimikrobiyal etki göstermiştir (Dusan et al., 2006).

Diğer bir çalışmada da, Car'un insan ve köpek myositleri üzerindeki kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Magyar et al., 2002). Başka bir çalışmada ise, Car'e benzer bir molekül olan timol'un kalsiyum ve potasyum kanallarını bloke ettiği bildirilmiştir (Magyar et al., 2004).

Car'un AO ve analjezik etkilerini ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır. *Sideretis congesta*, *Satureja cuneifolia* ve *Origanum onites* türleri iki farklı bölgeden toplanmış ve bu türlerin esansiyel yağları Clevenger distilasyonu ile elde edilmiştir. Esansiyel yağların analjezik etkileri standart analjezikler olan morfin ve fenoprofen ile karşılaştırılmıştır. Test maddeleri arasında sadece *Origanum onites*' in spesifik analjezik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. *Origanum onites*' in analjezik etkilerinin yetiştiği bölgeye bağlı olduğu bulunmuştur. Bulgular analjezik etkinin esansiyel yağın bir bileşeni olan karvakrol ile bağlantılı olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (Aydın et al., 1998).

Yapılan diğer bir çalışmada da *Thymus pulegioides* türünün fenolik kemotiplerinden elde edilen ekstraktların serbest radikalleri yok etmekte etkili olduğu gösterilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin patojen bakterilere karşı seçici olmasına karşın, zayıf bakterisid özelliklerinden dolayı yiyecek koruma teknolojisinde faydalanılabileceği bildirilmektedir (Loziene et al., 2004).

Yapılan diğer bir çalışmada da *Origanum minutiflorum*'un esansiyel yağının ciprofloksacin- dirençli *Campylobacter spp.* türüne olan antimikrobiyal etkilerini Borth mikrodilasyon ve agar jel difüzyon yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Sonuç olarak, *O. minutiflorum* türünün esansiyel yağının *Campylobacteriosis* gibi besin zehirlenmesine sebep olan hastalıkları önlemede doğal bir yiyecek koruyucu olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır.

Ayrıca gaz kromatografisi ve kütle spektrometresini (GC/MS) kullanarak *O. minutiflorum* türünün esansiyel yağının %98.7 sini kapsayan 22 bileşeni olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bitkinin esansiyel yağının %73.9 Car ve %7.20'si pcymene oluşturduğunu göstermişlerdir (Aslım and Yücel, 2008).

Yapılan diğler bir çalışmada da, *Origanum onites L.* turnden fraksiyonel distilasyonla elde edilen Car'n farklı dozlarının N-ras onkogeni transfer edilmiş myoblast hücrelerinin (CO25) DNA sentezini growth medium ve ras aktive edici mediumda inhibe ettiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla Car'n kanser tedavisinde yeri olabileceğini ileri sürmektedirler (Zeytinoğlu et al., 2003).

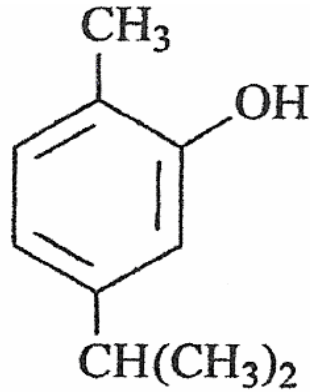
Yapılan diğler bir çalışmada da, timol ve Car'n hem DPPH hem de ̢-karoten/linoleik asit test sistemlerinde güçlü bir antioksidan aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Tepe et al., 2005).

Yapılan diğler bir çalışmada da, timol, Car, 6-gingerol, hidroksitirosol ve zingeron'un AO ve prooksidan etkilerini araştırmışlardır. Timol, Car, 6-gingerol ve hidroksitirosol'un askorbat ve Fe⁺³ varlığında fosfolipid lipozomların peroksidasyonunu azalttığını, fakat zingeron'un çok zayıf bir inhibe edici etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların bulguları, timol, Car ve 6-gingerolun önemli derecede AO etkilerinin olduğunu ve sentetik AO katkı maddelerinin yerine kullanılabilcek doğal bir AO madde olduğunu düşündürmektedir (Aechbach et al., 1994).

2.4.1. Karvakrol'n Genel zellikleri

Karvakrol (Car), birçok aromatik bitkinin önemli bir bileşeni ve onların uçucu yağ bileşenlerinden biridir (De Vincenzi et al., 2004). Car; *Thymbra spicata* bitkisinden elde edilen uçucu yağların fenolik ve fungitoksik bir bileşenidir. Ayrıca Car *Anabasis*, *Carum*, *Mentha*, *Ocimum*, *Zea* gibi bitkilerden de izole edilmektedir. Bu bileşik alkol ve eter ile kolay biçimde çözünebilir ancak, su ile kolay çözünemez (Ayhanci et al., 2008).

Car; açık formülü; 2-metil -5-(1-metil etil)fenol, kapalı formülü; C₁₀H₁₄O, molekül ağırlığı; 150,21 gram/mol olan bir bileşiktir. Sinonimleri; isopropil-o-cresol, p-cymen-2-ol, 2-hidroksi-pcymen, 5-izopropil-2-metilfenol, iso-timol 'dr (De Vincenzi et al., 2004). şekil 2.3.1 Car'n kimyasal yapısı gösterilmiştir (Golob, et al., 1999).



Şekil 2.4.1.1 Karvakrol'ün kimyasal yapısı.

Car'ün çeşitli aktiviteleriyle çok sayıda AO özellikleri belirlendiği için ve kimyasal yapısında hidroksil (-OH) grupları bulunmasından dolayı AO olarak değerlendirilebilir (Kulisic, et al., 2004; Sökmen, et al., 2004). *Origanum vulgare*' de yüksek oranda Car ile timol bulunur ve uçucu yağın SOR bağlayıcı özelliğini sergilerler (Sahin, et al., 2004). Son yapılan bir araştırmada da Car'ün genotoksik maddelere karşı insan sağlığını koruyabileceği bildirilmiştir (Ipek, et al., 2005). Car'ün bu tip özellikleri Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi (TBAM) tarafından yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (Başer, 2001). Car'ün subakut, kronik toksitesi ile üreme sağlığı üzerine ve teratojenik etkilerine yönelik veri bulunmamaktadır (De Vincenzi et al., 2004).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 220 ± 20 gram ağırlıkta, 3 aylık Sprague-Dawley cinsi albino sıçanlar kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuar'ında temin edilerek deney süresince 12; 12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısısı ($22\pm 2C^{\circ}$) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta süre ile ortam koşullarına adaptasyonu sağlandı (Ehrenfried et al., 1997; Furuta et al., 2000; Watanabe et al., 2001). Bu adaptasyon sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

%99 saflıktaki karvakrol (Car) ve siklofosamid (CP) ticari olarak temin edildi. Bu maddelerden Car 0,5 mL zeytinyağında, CP'nin ise 500 mg'ı 25mL bidistile suda çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirildi.

Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptandı ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlenerek steril tek kullanımlık enjektörler ile intraperitoneal (i.p.) olarak verildi.

Sadece CP verilen 1, 2 ve 3. gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonundan 6 gün sonra anestezi edildi. CP ile birlikte Car verilen gruplarda Car uygulamasına CP uygulamasından 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. 4. gün hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlendi ve böylece 4. gün CP+Car verildi. 7. gün hayvanlar anestezi edilerek kan ve kemik iliği alındı (Ayhanci et al., 2008).

3.3. Anestezi ve Cerrahi Uygulamalar

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi.

Ketamin/rompun (50/10 mg/kg) ile anestezi edilmiş hayvanlardan intrakardiyak kan alımı yapıldı. Kan örneklerinin 1/5'lik kısmı sitratlı tüplere konularak, Hemavet 850 marka ve model kan sayım cihazının sıçan kalibrasyonunda sayımı yapıldı (Sanz et al., 1998; Aktay et al., 2000; Theocharis et al., 2001).

Kan alımından sonra hafif ketamin/rompun anestezisi ile öldürülecek hayvanların bir femuru kaslarından iyice temizlenerek ortaya çıkarıldı (Lerza et al., 1988; Uyar et al., 1990). Kemik iki ucundan kesilerek bir pens yardımı ile tutularak, enjektördeki serum fizyolojik femurun bir ucundan basınçla fişkırtılarak iliğin tamamının tüpün içine geçmesi sağlandı. Toplam 5 mL serum fizyolojik ve kemik iliği içeren dereceli tüpteki hücrelerin dağılımının homojen olması için aynı enjektör ile tüp içindeki hücreli sıvı birkaç kez çekilip boşaltıldı. Bu işlemler yapılırken sıvının köpürmemesine dikkat edildi. Kemik iliği içeren tüpler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek ve süpernatant enjektör ile alındı. Dereceli tüpte 2 mL serum fizyolojik ile hücreleri içeren bu karışım tekrar enjektör ile birkaç kez çekilip boşaltılarak homojen hale getirildi. Daha sonra kan parametreleri sayımında olduğu gibi kemik iliği hücreleri de kan sayım cihazında sayılarak elde edilen veriler kaydedildi (Ayhancı et al., 2008).

3.4. Deney Grupları

Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinden =7' şer sıçan olmak üzere kontrol dahil toplam 13 grup oluşturuldu. Bunlar;

Kontrol grubu: Her hayvana 0,5 mL serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

Grup 1: Her hayvana 50 mg/kg CP tek doz enjeksiyonu yapıldı.

Grup 2: Her hayvana 100 mg/kg CP tek doz enjeksiyonu yapıldı.

Grup 3: Her hayvana 150 mg/kg CP tek doz enjeksiyonu yapıldı.

Grup 4: 0,5 mL zeytinyağı enjeksiyonu yapıldı.

Grup 5: 5 mg/kg Car (MSDS, NIOSH) tek doz enjeksiyonu yapıldı.

Grup 6: 10 mg/kg Car (MSDS, NIOSH) tek doz enjeksiyonu yapıldı.

Grup 7: 50+5 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Grup 8: 100+5 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Grup 9: 150+5 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Grup 10: 50+10 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Grup 11: 100+10 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Grup 12: 150+10 mg/kg CP tek doz+Car enjeksiyonu yapıldı.

Tablo 3.4.1 Uygulanan siklofosfamid ve karvakrolün gruplara göre dağılımı.

Dozlar/ Gruplar	50 mg/kg CP	100mg/kg CP	150mg/kg CP	0.5 mL zeytin yağı	5 mg/kg Car	10mg/kg Car
Kontrol grubu						
1. grup	+					
2. grup		+				
3. grup			+			
4. grup				+		
5. grup					+	
6. grup						+
7. grup	+				+	
8. grup		+			+	
9. grup			+		+	
10. grup	+					+
11. grup		+				+
12. grup			+			+

Tablo 3.4.2 Siklofosfamid ve karvakrolün gruplara uygulanma şekli.

GÜN VERİLEN MADDE	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol	SF	SF	SF	SF	SF	SF	Kesim
CP				+			Kesim
Zeytinyağı	+	+	+	+	+	+	Kesim
Car	+	+	+	+	+	+	Kesim
CP +Car	Car	Car	Car	CP+Car	Car	Car	Kesim

3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 18.0 for windows” versiyonu bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin bilgi işlem merkezinin lisanslı programıdır. Kan serumlarında analizi yapılacak olan periferik kan hücreleri (lökosit ve trombosit) ve kemik iliği hücre sayımından elde edilen veriler; gruplar arasındaki farklılık durumları Kruskal Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks ile değerlendirilmiştir.

Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

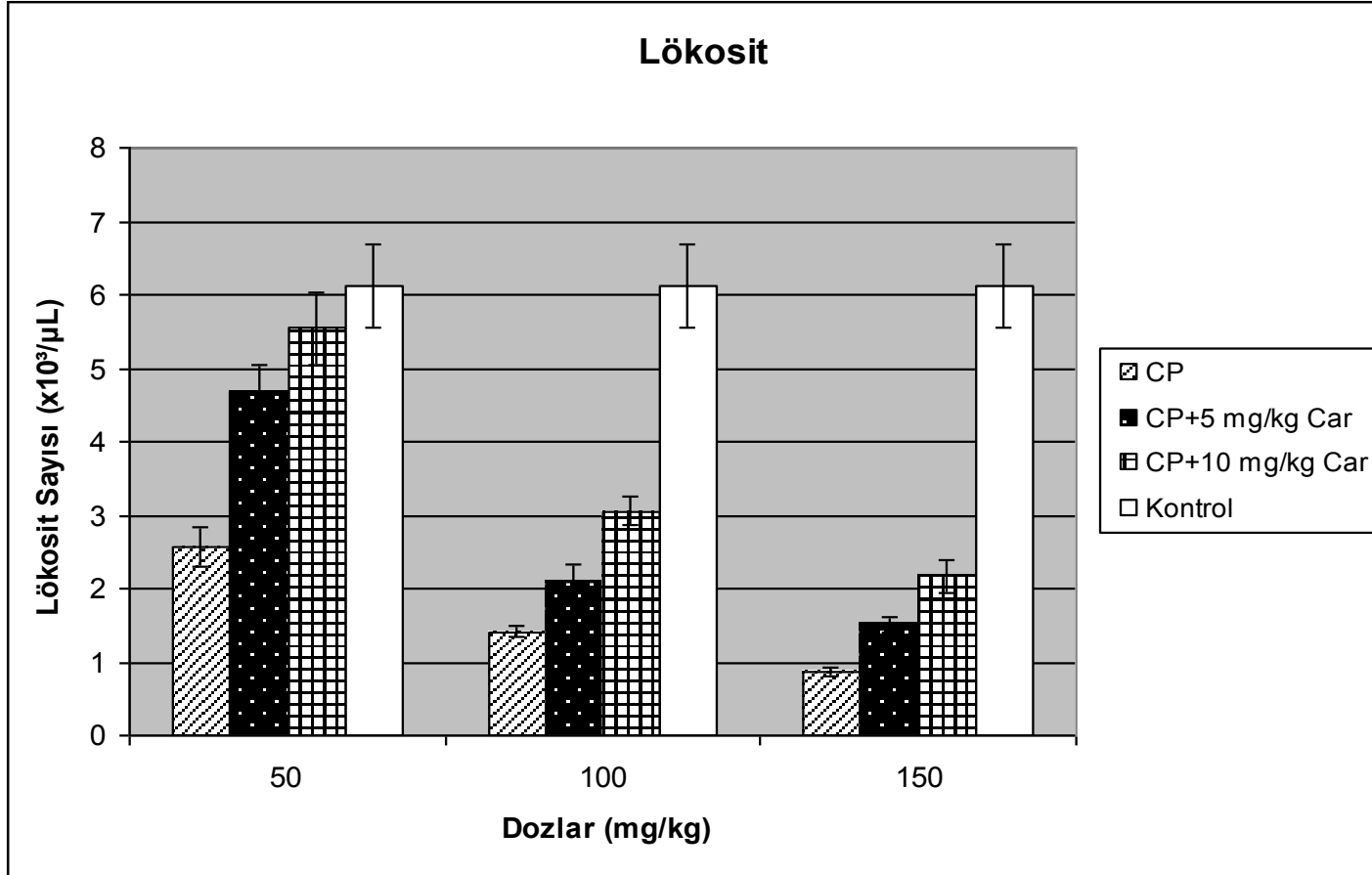
Kontrol ve deney gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalma (%59) göstermiştir ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı da kontrole göre ileri derece de önemli bir azalma (%77) göstermiştir ($p<0.001$). En yüksek toksisitenin görüldüğü 150 mg/kg CP verilen deney grubunda lökosit sayısı kontrol lökositlerine göre aşırı bir azalma (%86) göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi zeytinyağı verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı önemli bir fark (%9) göstermemiştir ($p>0.05$). 5 mg/kg Car verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış olmasına rağmen (%10) anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 10 mg/kg Car verilen deney grubu kontrole göre %57 oranında artış göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.3’te görüldüğü gibi 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrole göre lökosit sayısı %26 oranında azalma göstermiş ve istatistiksel açıdan ileri derecede bir azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). 100+5 mg/kg CP+Car deney grubu kontrol grubuna göre %60 oranında azalma göstermiştir ($p<0.001$). 150+5 mg/kg CP+Car %82 oranında azalma göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.4’te görüldüğü gibi 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunun lökosit sayısı kontrole göre %10 oranında azalma göstermiş ancak bu azalma anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrole göre %50 oranında azalma göstermiştir ($p<0.001$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen %64 oranında azalma göstermiştir ($p<0.001$).



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve diğer grupların lökosit sayılarının ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ortalama değerlerinin dağılımı.

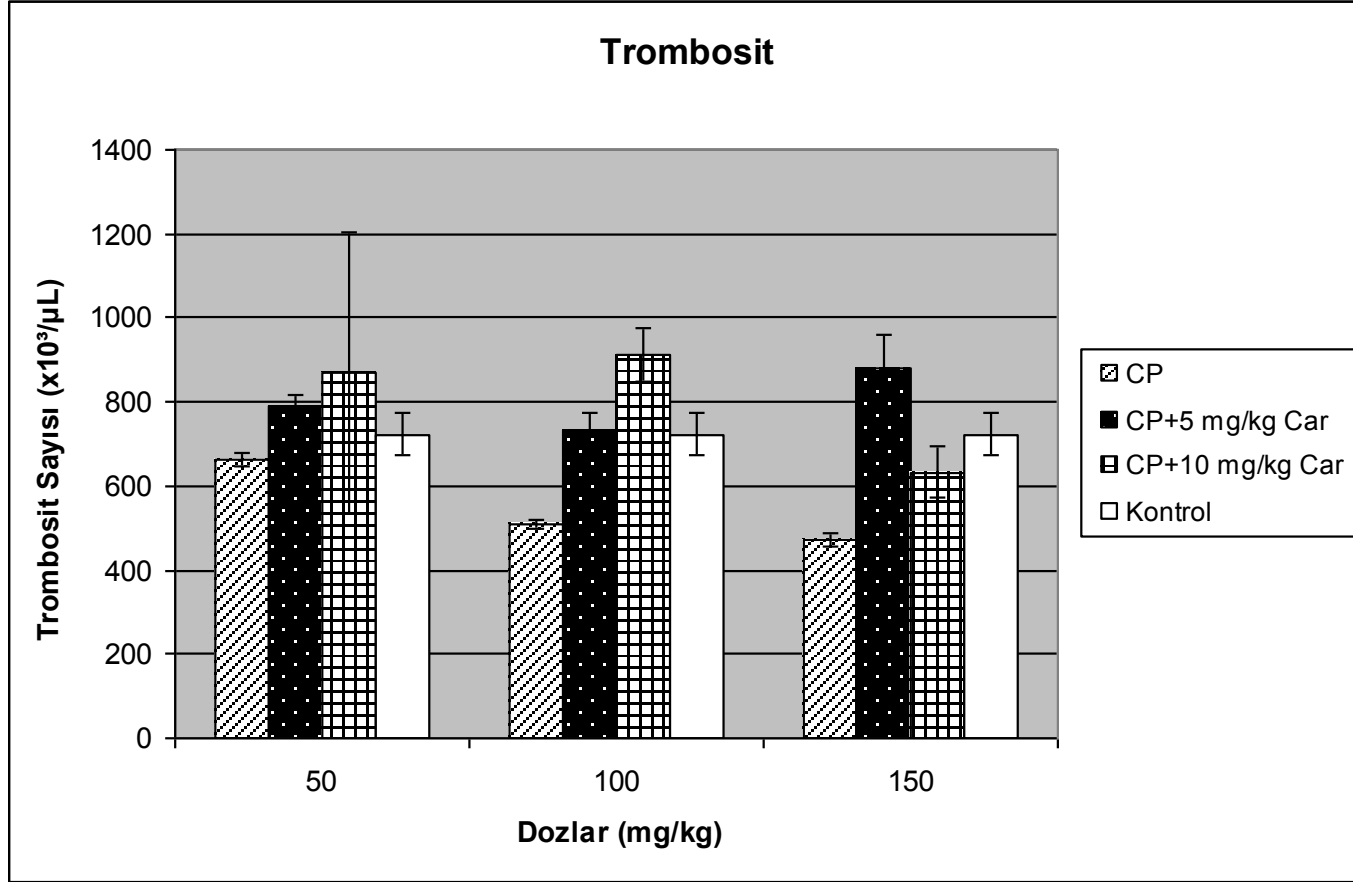
Kontrol grubu ve deney gruplarının trombosit sayılarının ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında trombosit sayısı kontrole göre %8 oranında azalma göstermiş ancak bu azalma anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında trombosit sayısı kontrole göre %29 oranında azalma göstermiştir ($p<0.05$). En yüksek toksisitenin görüldüğü 150 mg/kg CP verilen deney grubunda trombosit sayısı kontrole göre %34 oranında azalmıştır ($p<0.001$).

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi zeytinyağı verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında trombosit sayısı %26 oranında artış göstermiştir ($p<0.05$). 5mg/kg Car verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %26, 10 mg/kg Car verilen deney grubu ise %29 oranında artış göstermiştir ($p<0.05$).

Tablo 4.3.'de görüldüğü gibi 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre trombosit sayısı %9 oranında artış göstermiş ancak bu artış önemli bir artış olarak kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre %2 oranında artış göstermiştir ($p>0.05$). 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre %12 oranında azalma göstermesine rağmen bu azalma önemli kabul edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.4.'de görüldüğü gibi 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kontrol grubuna göre trombosit sayısı %20 oranında artış göstermiş ve bu artış istatistiksel açıdan önemli bir artış olarak kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre %21 oranında artış göstermiş ve bu artış istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre %20 oranında artış göstermiş ve bu artış önemli bir artış olarak kabul edilmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.2 Kontrol grubu ve diğer grupların trombosit sayılarının ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ortalama değerlerinin dağılımı.

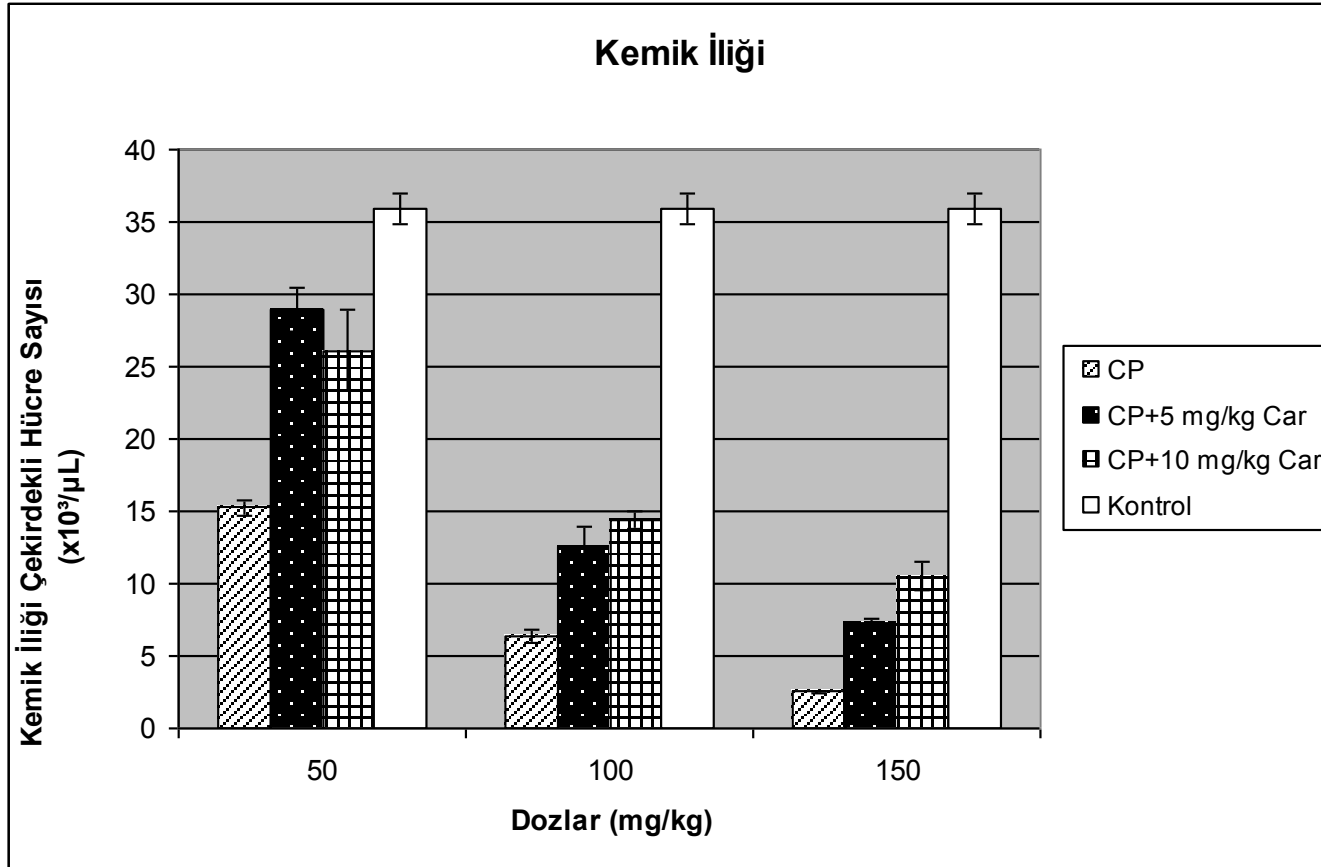
Kontrol grubu ve deney gruplarının kemik iliği çekirdekli hücre sayılarının ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalma (%57) göstermiştir ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre ileri derecede önemli bir azalma (%82) göstermiştir ($p<0.001$). En yüksek toksisitesinin görüldüğü 150 mg/kg CP verilen deney grubunda kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre aşırı bir şekilde azalma (%94) göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi 0,5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği çekirdekli hücre sayıları sırasıyla %2, %3 ve %5 artış göstermelerine rağmen bu artışlar anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.3’te görüldüğü gibi 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kemik iliği çekirdekli hücre sayısı bakımından kontrol grubuyla kıyaslandığında %20 oranında bir azalma göstermiştir ($p<0.001$). 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu kontrol grubuna göre %65 oranında azalma göstermiş ve bu azalma istatistiksel açıdan ileri derecede azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). 150+5 mg/kg CP+Car %80 oranında azalma göstermiş ve bu azalma ileri derecede azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.4’te görüldüğü gibi 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunun kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrol grubuna göre %24 oranında azalma göstermiş ve bu azalma istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunun kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrol grubuna göre %59 oranında azalma göstermiş ve bu azalma istatistiksel açıdan ileri derecede bir azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunun kemik iliği çekirdekli hücre sayısı kontrole göre %70 oranında azalma göstermiş ve bu azalma ileri derecede önemli bir azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).



Şekil 4.3. Kontrol grubu ve diğer grupların kemik iliği hücre sayılarının ($x10^3/\mu\text{L}$) ortalama değerlerinin dağılımı.

50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu lökosit sayısı bakımından 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede önemli bir artış (%82) göstermiştir ($p<0.001$). Trombosit sayısı da %18 oranında artış göstermiştir ($p>0.05$). Bu grupta kemik iliği çekirdekli hücre sayısında oldukça büyük bir artış (%90) kaydedilmiştir ($p<0.001$).

50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı %115 oranında ($p<0.001$), trombosit sayısı %31 oranında ($p<0.05$) kemik iliği çekirdekli hücre sayısı ise %71 oranında artış göstermiştir ($p<0.001$).

100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı %47 oranında ($p<0.01$), trombosit sayısı %43 oranında ($p<0.01$) ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısı ise %97 oranında bir artış göstermiştir ($p<0.001$). 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı %114 ($p<0.001$), trombosit %78 ($p<0.001$) ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısı da %125 oranında artış göstermiştir ($p<0.001$).

150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı %74 ($p>0.05$), trombosit sayısı %34 ($p>0.05$) ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısı da %189 oranında artış göstermiştir ($p<0.001$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı ileri derecede (%150) artış göstermiştir ($p<0.001$). Trombosit sayısı ileri derecede önemli bir artış (%86) göstermiştir ($p<0.001$). Kemik iliği çekirdekli hücre sayısı da ileri derecede önemli bir artış (%317) göstermiştir ($p<0.001$).

50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısındaki %18 oranındaki artış önemli kabul edilmiştir ($p<0.01$). Ancak trombosit sayısındaki %10'luk artış anlamlı bulunmazken ($p>0.05$) kemik iliği çekirdekli hücre sayısındaki %10 'luk artış anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$).

100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısında %45 oranındaki artış ileri derecede

önemli bulunmuş ($p<0.001$), trombosit sayısındaki %24 ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısındaki %14'lük artışlar anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı %43 ($p<0.05$), trombosit sayısı %39 ve ($p<0.001$) kemik iliği çekirdekli hücre sayısı da %44 oranında artış göstermiştir ($p<0.01$).

5 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısındaki %1'lik artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 10 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayısı ileri derecede artış (%44) göstermiştir ($p<0.001$). 5 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında trombosit sayısı %2 oranında bir artış göstermiştir ($p>0.05$). 10 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında trombosit sayısı %2 oranında artmıştır ($p>0.05$). 5 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği çekirdekli hücre sayısındaki %5'lik artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 10 mg/kg Car verilen deney grubu 0,5 mL zeytinyağı verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında kemik iliği çekirdekli hücre sayısındaki %3'lük artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.1. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	Lökosit (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>	Trombosit (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>	Kemik İliği (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>
KONTROL	6,126 ± 0,562	***	722,286± 50,146	0	35,909 ± 1,134	***
I. GRUP 50 mg/kg CP	2,566 ± 0,278		663,571 ± 17,822		15,234 ± 0,513	
KONTROL	6,126 ± 0,562	***	722,286± 50,146	*	35,909 ± 1,134	***
II. GRUP 100 mg/kg CP	1,417 ± 0,0725		509,286 ± 11,814		6,391 ± 0,415	
KONTROL	6,126 ± 0,562	***	722,286± 50,146	***	35,909 ± 1,134	***
III. GRUP 150 mg/kg CP	0,866 ± 0,05		471,857 ± 15,614		2,511 ± 0,137	

0 : $p > 0.05$, fark yok

* : $p < 0.05$, fark var

** : $p < 0.01$, Önemli fark var

*** : $p < 0.001$, İleri derecede önemli fark var

Tablo 4.2. 0,5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	Lökosit (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>	Trombosit (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>	Kemik İliği (X 10 ³ / μ L)	<i>p</i>
KONTROL	6,126 ± 0,562	0	722,286± 50,146	*	35,909 ± 1,134	0
IV. GRUP 0,5 mL zeytinyağı	6,709 ± 0,321		910,857 ± 38,369		36,657 ± 1,313	
KONTROL	6,126 ± 0,562	0	722,286± 50,146	*	35,909 ± 1,134	0
V. GRUP 5 mg/kg Car	6,777 ± 0,21		913,429 ± 22,89		34,937 ± 2,699	
KONTROL	6,126 ± 0,562	***	722,286± 50,146	*	35,909 ± 1,134	0
VI. GRUP 10 mg/kg Car	9,671 ± 0,808		936,286 ± 62,449		37,891 ± 2,441	

0 : $p > 0.05$, fark yok

* : $p < 0.05$, fark var

** : $p < 0.01$, Önemli fark var

*** : $p < 0.001$, İleri derecede önemli fark var

Tablo 4.3. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	Lökosit (X 10 ³ / μ L)	p	Trombosit (X 10 ³ / μ L)	p	Kemik İliği (X 10 ³ / μ L)	p
KONTROL	6,126 \pm 0,562	***	722,286 \pm 50,146	0	35,909 \pm 1,134	***
VII. GRUP 50+ 5 mg/kg CP+Car	4,683 \pm 0,349		788,429 \pm 28,224		28,971 \pm 1,479	
KONTROL	6,126 \pm 0,562	***	722,286 \pm 50,146	0	35,909 \pm 1,134	***
VIII. GRUP 100+5 mg/kg CP+Car	2,086 \pm 0,237		733 \pm 38,781		12,609 \pm 1,255	
KONTROL	6,126 \pm 0,562	***	722,286 \pm 50,146	0	35,909 \pm 1,134	***
IX. GRUP 150+5 mg/kg CP+Car	1,511 \pm 0,0979		633,429 \pm 61,741		7,269 \pm 0,273	

0 : $p > 0.05$, fark yok

* : $p < 0.05$, fark var

** : $p < 0.01$, Önemli fark var

*** : $p < 0.001$, İleri derecede önemli fark

Tablo 4.4. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	Lökosit (X 10³ /μL)	p	Trombosit (X 10³ /μL)	p	Kemik İliği (X 10³ /μL)	p
KONTROL	6,126 \pm 0,562	0	722,286 \pm 50,146	0	35,909 \pm 1,134	***
X. GRUP 50+ 10 mg/kg CP+Car	5,54 \pm 0,501		872 \pm 333,85		26,129 \pm 2,741	
KONTROL	6,126 \pm 0,562	***	722,286 \pm 50,146	*	35,909 \pm 1,134	***
XI. GRUP 100+10 mg/kg CP+Car	3,046 \pm 0,193		910 \pm 63,248		14,411 \pm 0,61	
KONTROL	6,126 \pm 0,562	***	722,286 \pm 50,146	0	35,909 \pm 1,134	***
XII. GRUP 150+10 mg/kg CP+Car	2,166 \pm 0,217		881,714 \pm 76,554		10,491 \pm 1,009	

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, Önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

*** : $p < 0.001$, İleri derecede önemli fark var

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada CP'nin toksik aktivitesi ve dolayısıyla koruyucu ajana (Car) bağlı gelişen değişikliği belirlemek için periferik kan hücrelerini (lökosit, trombosit) ve kemik iliği çekirdekli hücrelerinin sayısal varyasyonlarını test ettik.

Gerek kemik iliğinde gerekse periferik kanda yaptığımız incelemelerden elde ettiğimiz bulgular araştırmacılar tarafından ileri sürülen bulgulara benzemektedir. Nitekim, sadece 50, 100 ve 150 mg/kg CP uyguladığımız hayvanların lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarında sırası ile kontrole göre belirgin azalmalar kaydedilmiştir ($p < 0.001$). Özellikle 150 mg/kg CP uygulanan deney grubundaki hayvanlarda lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayısında sırasıyla % 85, % 34, % 94'e varan azalmalar kaydedilmiştir.

CP'nin antitümoral etkinliği, yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır (Osborne et al., 1987). Ancak yüksek dozlarda kullanılamamasının nedeni kemik iliğini baskılaması ve hemorajik sistit oluşturmasıdır (Ayhancı et al., 2008; Al-Safi and Maddocks, 1986; Moore et al., 1995; Calavetti et al., 1986; Di Palma and Gregoria, 1990; Osborne et al., 1987). CP'nin immunosupressif etkilerine bağlı olarak lökopeni, trombositopeni ve lenfopeni gelişmektedir. Bu durum CP'nin yüksek dozda ve/veya daha sık kullanılmasıyla daha güçlü bir terapötik etkinlik sağlanmasını engellemektedir (Kalaycıoğlu et al., 1995; Sandberg et al., 1995; Cingi ve ark., 1996). Bir deneysel çalışmada 20 ve 40 mg/kg CP'nin sıçanlarda dalak ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir (Moore et al., 1995).

CP'nin iki aktif metaboliti fosforamid mustard (FAM) ve akroleindir (ACR). CP'nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir (Kawabata et al., 1990). CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku antioksidan (AO) savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir.

ACR kaynaklı oluşan SOR'lar; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların işlevlerini bozarlar (Senthilkumar et al., 2006). Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir.

CP'nin toksik etkilerini önleyerek daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiş ise de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek yöntemlerin arayışı içindedir (Ayhanci et al., 2008).

Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin azaltılması gerekmektedir. Platinum nedeniyle renal toksisiteye karşı bir tiyol AO olan amifostinin sitoprotektif etkisi vardır. Ancak hipokalsemi, anksiyete ve hipotansiyon gibi yan etkilerinden dolayı bundan kaçınılmaktadır. Sodyumtiyosülfat, mesna ve procainamide gibi diğer sitoprotektif etkili ajanlar etkinliklerinin yetersizliği yüzünden geniş klinik kullanımlar için onaylanmamaktadır. Bu bileşikler aynı zamanda tümör dokusunda platinum ve alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan toksisiteye karşı sitoprotektivitede seçici değildir (Senthilkumar et al., 2006).

Son zamanlarda doğal fenolik bileşiklerin bedende oynadıkları rolün önemi açısından yapılan birçok deneysel ve klinik çalışmalar karvakrol (Car) gibi bazı fenolik bileşiklerin sitoprotektif etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Kekik yağının ve kekik suyunun ana bileşiği olan Car'ün lipozom fosfolipidlerinin peroksidasyonunu inhibe ettiği ve çeşitli sentetik AO'lardan çok daha yüksek bir AO aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Uçucu bir monoterpen olan bu bileşik; antimikrobiyal, antifungal, doğal gıda koruyucu ve memelilerde yaşlanmayı geciktirici özelliklere sahiptir (Tran-Thi et al., 2006). Ayrıca Car'ün güçlü bir antimutajenik ve antitümör etkilerinin olduğu bildirilmiştir (İpek et al., 2005). Yapılan deneysel çalışmalarda, Car'ün çok güçlü bir AO kapasiteye sahip olduğu ve bu nedenle sentetik AO katkı maddelerinin yerine kullanılabileceği düşünülmektedir (Aechbach et al., 1994).

CP'nin normal hücrelere olan toksisitesini önlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen, normal hücrelerde CP toksisitesini Car ile önlemeyi amaçlayan direkt bir çalışmaya rastlanmamıştır.

0,5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen gruplarda kemik iliği çekirdekli hücre sayıları kontrollerinden farklı bulunmazken ($p>0.05$) trombosit sayıları her 3 grupta da kontrollerinden biraz yüksek bulundu ($p<0.05$). Trombosit sayısının bir miktar artışı olası kanamaya karşı bir önlem olabilir. Diğer taraftan sadece 10 mg/kg Car verilen grupta lökosit sayısı %50'nin üzerinde bir artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu durum yüksek doz Car'ün lökositoz yapabileceği anlamına gelmektedir. Nitekim bu grubun kemik iliği çekirdekli hücre sayılarında da istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da bir artış gözlenmiştir.

50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar kontrollerine göre lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayıları bakımından bir azalma gösterirken sadece CP verilen gruplara göre %50'nin üzerinde bir artış görülmüştür. Bu artışlar lökosit ve kemik iliği çekirdekli hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bulunurken trombosit sayıları bakımından anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Kemik iliği çekirdekli hücre sayılarındaki artış periferik kandaki lökositlere de yansımıştır. Benzer şekilde 10 mg/kg Car aynı dozlardaki CP ile kullanıldığında, 50+10 mg/kg CP+Car grubu lökosit ve trombosit sayıları bakımından kontrolden farklı bulunmamıştır. 10 mg/kg Car CP'nin oluşturduğu kemik iliği depresyonunu ve dolayısıyla lökopeniyi 5 mg/kg Car'den daha fazla azaltmıştır. Bizim bulgularımız Car'ün 10 mg/kg'lık dozunun 5 mg/kg'a göre daha etkili olduğunu göstermektedir. Sonuçlarımız Car'ün AO ve sitoprotektif etkileri olduğu yönündeki literatür bildirimlerine uygunluk göstermektedir.

Birçok deneysel ve klinik çalışmada Car'ün antimikrobiyal, antitümör, antimutajenik, analjezik, antispazmodik, antiinflamatuvar, antiangiogenik, antiparazitik, antihepatotoksik ve hepatoprotektif aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Car gıda katkı maddesi olarak gıdaların korunmasında da kullanılmaktadır (Baser, 2008; Aydın et. al.,1996). Farmokolojik deneyler, kekik suyunun uzun sürelerle aşırı miktarda alınması durumunda bile, hiçbir toksik etkisinin olmadığı ve güvenle kullanılabileceğini

göstermektedir. Mide ve bağırsaklarda kasılmaları çözdüğü, ağrıları giderdiği, safra salgılanmasını artırarak hazmı kolaylaştırdığı, mide bağırsak sisteminin düzenli çalışmasını sağladığı için buna bağlı hastalıklarda koruyucu ve tedavi edici etkilerinin bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Bağışıklık sistemi %80 oranında bağırsaklar üzerinden düzenlendiğinden, kekik suyunun bu sistemin düzenli çalışmasına da katkıda bulunmaktadır (Baser, 2008).

Halk arasında romatizma ağrıları veya baş ağrılarını gidermek amacıyla, kekik yağının ağrılı bölgede cilde uygulanmasının nedeni de anlaşılmıştır. Car'ün ciltten kolay emildiği ve hücre zarını kolayca geçebildiği bilinmektedir. Kekik yağının yara iyileştirici etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında NIH 3T3 fibroblast hücreleriyle yapılan deneylerde 1 ve 10 mg/kg Car'ün fibroblast hücrelerinde çoğalmayı artırdığını göstermiştir (Baser, 2008).

DeneySEL sonuçlarımız Car'ün CP nedenli hematoksisiteyi azaltmada güçlü bir terapötik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aechbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell B., Aruoma, O.I., 1994, Antioxidant actions of thymol, caruacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Food Chemical Toxicology*, 26, 31-36 p.
- Aktay, G., Deliorman, D., Ergun,E., Ergun, F., Yesilada, E. And Çevik C., 2000, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, *Jounal of Ethnopharmacology*, 73, 121-129 p.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E. Mitaku, S., Chinou, I. B., 2001, Composition and antimicrobial activity of essential oilsfrom two Orianum species, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4168-4170 p.
- Al-Safi, S.A. and Maddocks, J.L., 1986, Does 2- Mercapoethane Sulphonate (Mesna) Prevent Cyclophosphamide and Azathioprine Induced Immunosuppression In vitro studies,*Br. J.clin. Pharmac.* 21:267-270 p.
- AOKİ, T., Murakami, M., Niiya, T., Murai, N., Shimizu, Y., Kato, h and Kusano M., 2001, Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* DOI 10.1007/s120011-008-8189-5.
- ARGE, 2010, Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.
- Aslım, B. And Yücel, N., 2008, In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, 107, 602-606 p.
- Aydın, S., Öztürk, Y., Beis, R., Başer, K.H.C., 1998, Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis Congesta*, *Satureja cuneifolie* essential oils for analgesic activity, *Phytoterapy Research*, 10, 342-344 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ayhanci, A., Uyar, R., Aral, E., Kabadere, S., Apak, S., 2008, Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematotoxicity and Urotoxicity, Biol Trace Elem Research DOI 10.1007/s 12011-008-8189-5.
- Balladin, D. A. and Headley, O., 1999, Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linne) herbs, Renewable Energy, 17, 523-531 p.
- Baphonet, <http://www.bapho.net/baphonet/bbs/h-drive/magick5/oregano.txt>
- Başer, K.H.C., 1993, Essential Oils of Anatolian Labiatea: A Profile. *Acta Horticulturae*, 333, 217-237 p.
- Başer, K.H.C., 2001, Her Derde Deva Bir Bitki- Kekik, Bilim ve Teknik, Mayıs 2001, 74-77 s.
- Başer, K.H.C., 2002, Oregano, The genera *Origanum* and *Lippia*, The Turkish *Origanum* species, Agricultural University of Athens, Greece, London and New York, first edition, 277 p.
- Başer, H.C., 2008, Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol Bearing Essential Oils, Current Pharmaceutical Design, 14p.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., Kara doğan, T., 2004, Antimicrobial activity of and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, Food control, 15, 169-172 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bloom, J.M., Tamarkin, L., Shiber, J.R. and Nelson R. J., 1995, Learned Immuno suppression is Associated with an Increased Risk of Chemically Induced Tumors, *Neuroimmunomodulation* 2(2): 92-99 p.
- Bokser, I., Szende, B., Shally, A. V., 1990, Protective Effects of D-Trp-Luteinising Hormone- Releasing in Female Microcapsules Against Cyclophosphamide- Induced Gonadotoxicity in Female Rats., *Br. J. Cancer*, 61: 861-865.
- Bramwell, V.C.H., Mouristen, H. I., Santora, A., 1987, Cyclophosphamide Versus Ifosfamide: Final Report of a Randomized Phase 2 Trial in Adult Soft Tissue Sarcomas, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23(3):311-321 p.
- Bruneton, T., 1999, Pharmacognosy, phytochemistry, In *Medicinal Plants: Essential Oils*, 2nd ed. Lovoister Publishing, Newyork,
- Budavari, S., 1987, *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, The Mck Index. Elevent Edition Centennial Edition, USA., 429-430 p, 1563.
- Burt, S., 2004, Essential oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods- A Review, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253 p.
- Büyüknacar, H.S., Kumcu, E.K., Göçmen, C., Önder, S., 2008, Effect of Phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide- induced cystitis in rats,
- Cavalletti, E., Tofanetti, O. and Zunino,F., 1986, Comparision of Reduced Glutathione with 2-Mercaptoethane Sulfonate to Prevent Cyclophosphamide Induced Urotoxicity, *Cancer Letters*, 32:1-6 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Cingi, M.İ., Erol, K., Özdemir, M., 1996, Farmakoloji Ders Notları II, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

Dapkevicious, A., Van Beek, T. A., Lelyveld, G.P., Van Veldhuizen A. De Groot Ae., Linssen, J.P.h., 2002, Isolation and Structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves, *Journal of Natural Product*, 65, 892-896 p.

De Jonge Me, Huiteman ADR, Rodenhuis S, Beijinen JH., 2005, Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide *Clin Pharmacokinet* 44(11): 1135-1164 p.

Di Palma, J.R., and Di Gregorio, G.I., 1990, *Basic Pharmacology in Medicine*, Third Edition, 558-559 p.

Dorman, H.J.D and Deans, S.G., 2000, Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils *Journal Applied Microbiology*, 88, 308-316 p.

Dusan, F., Sabol, M., Domaracka, K., Bujnakova, D., 2006, Essential oils-their antimicrobial activity, *Toxicology in Vitro*, 20, 1435-1445 p.

Ehrenfried, J.A., Ko, T.C., Thompson, E.A. and Evers, B.M., 1997, Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration, *Surgery*, 122, 5, 927-935 p.

Fairchild, W. V., Spencer, C. R., Solomon, H. D. And Gangai, M. P., 1979. The Incidence of Bladder Cancer After Cyclophosphamide Therapy, *J. Urol.*, 122, 163-164 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Frank J. Muller- Riebau, Bern Hard M. Berger, Oktay Yegen and C. Çakır, 1997, Seasonal Variations in the Chemical Compositions of Essential Oils of Selected Aromatic Plants Growing Wild in Turkey, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (12): 4821-4825 p.
- Furuta, K., Kakita, A., Takahaski, T., Tomiya, T. And Fujiwara, K., 2000, Experimental study on liver regeneration after simultanous partial hepatectomy, *Hepatoloji Research*, 17, 223-236 p.
- GAO, S. And Singh, J., 1998, In Vitro Percutaneous Absorption Enhancement of Lipophilic Drug Tamoxifen by Terpenes, *J. Control Release*, 51, 193-199 p.
- Glode, M., Robinson, J., Gould, F.S., 1981, Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone, *The Lancet*, May 23, 1132-1136.
- Godwin, D. A. and Mıcnak, B.B., 1999, Influence of Drug Lipophilicity on Terpenes A.S. Transdermal Penetration Enchancers, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 905-915 p.
- Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. and Gudrups, I., 1999, The use of species and medicinals as bioactive protectans for grains, chapter 5, *Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*.
- IARC, 1981, Monographs on the Evolution of the Carsinogenic Risk of Chemical to Humans, Vol. 26, some Antineoplastic and Immunosuppressive Agent, IARC, Lyon, pp. 165-208 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ipek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoğlu, M. And Baser, K.H.C., 2005, Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal est, Food chemistry, 93, 551-556 p.
- Kalaycıoğlu, M. E., Lichtin, A. E. Andrese, S. W., Tuason, L., Bolwell, B.J., 1995, High-Dose Busulfan and Cyclophosphamide Followed by Autologous Bone Marrow Transplantation and/or Peripheral Blood Progenitor Cell Rescue for Metastatic Breast Cancer., Am. J. Clin. Oncol. 18(6): 491-494 p.
- Kaya, Y., Aral, E., Coskun, T., Erkasap, N., and Var, A., 2002, Increased intra abdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, Journal of Surgical Research, 108, 250-257 p.
- Kayaalp, S. O., 1987, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara cilt:1, S: 954.
- Kayaalp, S. O., 1989, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara, Cilt:I, S: 973-993, Cilt: II, S: 1100-1107 p.
- Kawabata, T. T., Chapman, M. Y., Kim, D. H., Stevens, W.D. and Holsapple, M. P., 1990, Mechanism of in vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4- Hydroxycyclophosphamide, Biochemical Pharmacology., Vol. 40, No. 5, pp. 927-935 p.
- Kearsley, J.H., 1986, Cytotoxic Chemotherapy for Common Adult Malignancies: “ The emperor new clothes” revisited., Brit. Med. S. 293: 871.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kinlen, L. J., Peto, J., Doll, R. And Snel, A.G.R., 1981, Cancer in Patient treated with Immunosuppressive Drugs., Br. Med. J. 282, 474 p.

Kırimer, N., Baser, K.H.C., Tümen, G., 1995, Carvacrol rich plants in Turkey, Chemistry Naturel Compounds, 31, 37-42 p.

Kocabas, Y. Z. and Karaman, S., 2001, Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4, 1221-1222 p.

Kokkini, S., 1996, Taxonomy, diversity and distribution and origanum species, In proceedings of the IPGRI International workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), 12 p.

Koyoma, H., Wada, T., Nishizawa, Y., Iwanaga, T., 1977, Cyclophosphamide- Induced Ovarian Failure and its Therapeutic Significance in Patients with Breast Cancer, 39: 1403-1409.

Köse, 2007, Antioksidanlar ve Sağlık.

Kreuser, E.D.,Klingmuller, D., Thiel, E., 1993, The Role of LHRH-Analoques in Protecting Gonodal Functions During Chemotherapy and Irradiation., Eur. Urol., 23: 157-164.

Kumar, K.B.H, Kuttan,R., 2004, Chemoprotective Activity of an Extract of Phyllanthus Amarus Against Cyclophosphamide Induced Toxicity in Mice, *Phytomedicine*, 12: 494-500 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kulisic, 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.
- Kunta, J.R.,Goskonda, V.R.,Brotherton, H.O., Khan, M.A ve Reddy, I.K., 1997, Effect of Menthol and Related Terpenes on the Percutaneous Absorption of Propranolol Across Excised Hair- Less Mouse Skin, J. Pharm. Sci., 86, 1369-1373 p.
- Lahdetie, J., RATY, R. And SORSA, M., 1990, Interaction of Mesna (2-Mercaptoethane sulfonate) with the Mutagenicity of Cyclophosphamide In vitro and In vivo, Mutation Research,
- Lerza, R., et. al., 1988, Studies on Hemotoxicity of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis- Diamminodichloroplatinum Combined with Sodium-2- Mercaptoethane Sulfonate, Tumori, 74: 333-337 p.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailine, A., Lobokas, J., 2004, Radical Scavenging and antibacterial properties of the extracts from different Thymus pulegioides L. Chemotypes, Food Chemistry, 103, 546-559 p.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fülöp, L., Varro, A., Nanasi, P., 2002, Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes, British Journal of Pharmacology, 136, 330-338 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fülöp, L., Varro, A., Nanasi, P., 2004, Effects of terpenoid phenolderivatives on calcium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes, *European Journal of Pharmacology*, 487, 29-36 p.

Memişoğlu, 2005, Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi, *Düzce Tıp Dergisi*; 3: 30-39.

M. De Vincenzi, A. Stamatı, A. De Vincenzi, M. Silano., 2004, Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75:801-804 p.

Moore, F. R., Urda, G. A., Krishna, G. and Theiss, J.C., 1995, An invivo/invitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen. 1. Studies with Cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 335 (2): 191-199 .

Morris, I. D., 1993, Protection Against Cytotoxic-Induced Testis Damage Experimental Approaches, *Eur. Urol.*, 23:143-147.

Muhlbauer, R.C., Lozano, A., Palacio, S., Reinli, A. ve Felix, R., 2003, Common Herbs, Essential Oils and Monoterpenes Potently Modulate Bone Metabolism, *Bone*, 32, 372-380 p.

Müftüoğlu, 2008, Antioksidan savunma gücünüz ne durumda.

OHD(Onkoloji Hemşire Derneği), 2009, Antineoplastik ilaçların Güvenli Kullanım Standartları Rehberi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Osborne, R., Evans, B., Gallagher, C. et. al., 1987, High-Dose Cyclophosphamide Followed by Cisplatinum in the Treatment of Ovarian Cancer. *Cancer Chemother., Pharmacol.*, 20: 48-52 p.
- Ozyazgan, Y., Yurdakul, S., Yazıcı, s., Tuzan, B., 1992, Low Dose Cycloporin A Versus Pulsed Cyclophosphamide in Behçet's Syndrome: a Single Masked Trial, *British Journal of Ophthalmology*, 76 (4): 241-243.
- Pol, I.E., Krommer, J., Smid, E.J., 2002, Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 55-61 p.
- Pool, B.L., Bos, R. P., Niemeyer, U., Theuws, J. L.G. and Schmalhl, D., 1988, In vitro/invivo Effect of Mesna on the Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide A Study Aimed at Clarifying theult Mechanim of Mesna's Anticarsinogenic Activity, *Toxicology Letters*, 41:49-56 p.
- Sanchez, M. E, Turina, A.V., Danial, A.G., Nolan, M. V. ve Perillo, M. A., 2004, Surface activity of thymol: Implication for an eventual pharmacological activity, *colloids and Surfaces B.*, 34, 77-86 p.
- Sandberg, J. O., Olsson, N., Johnson, R. C., Hellerstrom, C., Andersson, A., 1995, Immunosuppression, Macroencapsulation and Ultraviolet- B Irradiation as Immunoprotection in Porcine Pancreatic Islet Xenotransplantation, *Pharmacol. Toxicol.* 76(6): 400-405 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. and Özer, H., 2004, Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey, *Food Control*, 15, 549-557 p.
- Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L. F., Alvarez, A. and Cascales, M., 1998, Necrogenic and regeneratives responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384, 66-78 p.
- Senthilkumar, S., Yogeeta, S. K., Subashini, R., Devaki, T., 2006, Attenuation of Cyclophosphamide Induced Toxicity by Squalene in Experimental Rats, *Chemico-Biological Interactions*, 160:252-260 p.
- Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M. and 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 p.
- Stockman, G.D., Heim, L. R., South, M. A. and Trentin, J. J., 1973, Differential effects of Cyclophosphamide on the B and T Cell Compartments of Adult Mice., *J. Immunol.* 110: 277-282 p.
- Szentanarassy, N., Szentesi, P., Maggar, J., Nanasi P.P ve Csernoch, L., 2003, Effect of Thymol on kinetic properties of can and K currents in rat Sheletal muscle, *BMC pharmacol.*, 3, 9 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Teocharis,S.E., Margeli, A.P.,Skaltsas, S. D., Spiliopoulou,C.A. and Koutselinis S., 2001, Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, *Toxicology* 161, 129-138 p.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., 2005, Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var *rosulans*, *Journal of Food Engineering*, 66, 447-454.
- Thatcher, N., Smith, D.B., Lind, M. J., Anderson, H., Barclay, J., Chopra, M. P. And Fitz gerald, M. D., 1988, Double Alkylating Agent Therapy with Ifosfamide and Cyclophosphamide for Advanced Non- Small Cell Lung Cancer from the Manchester Lung
- Thompson, J.D., Manicaccy, D., Tarayre, M., 1998, Thirty-five years of thyme: a tale of two polymorphisms. Why so many females? Why so many chemotypes? *Bioscience*, 48, 805-815 p.
- Tran, T., Casabianca, H., Loustalot, M.F. G., 2006, Deuterium/ hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, &-terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography- pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 1132, 219-227 p.
- Tumen, G., Başer K.H.C., Demirci, B., Ermin, N., 1998, The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourli* Velen, *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 65-67 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Turc, J.L. and Poulter, L.W., 1972, Selective depletion of Lymphoid Tissue by Cyclophosphamide., Clin. Exp. Immunol. 10: 285-296.

Twetman, S., Hallgren, A., Peterson, L. G., 1995, Effect of an antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances, Careis Research, 29, 188-191.

Uyar, R., Bayçu, C., Gürer, F., Erol, Cingi, M.İ., Özdemir, M. ve Alban, R. S., 1990, Metotreksat'ın Kemik iliğindeki Toksisitesini Verapamil ile Azaltılabilir mi? Osmangazi Tıp Dergisi Cilt: 18, Sayı:1, S: 29-39 p.

Vaddı, H.K., HO, P.C., Chan, Y.W. ve Chan, S.Y., 2002, Terpenes in Ethanol: Haloperidol Permeation and Partition Through Human Skin and Stratum Corneum Changes, Journal of Controlled Release, 81, 121-133 p.

Watanabe, M., Yamaguchi, K., Chijiwa, K. And Tanaka, M., 2001, FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats, journal of Surgical Research, 101, 146-151 p.

Zeytinoğlu, H., İncesu, Z., Başer, K.H.C., 2003, inhibition of DNA synthesis by carvacrol in Mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene, Phytomedicine, 10, 292-299 p.