

Antikanser Tedavide Siklofosfamid Nedenli Renal Hasarda Karvakrol'ün Koruyucu
Etkileri

Sibel Güneş

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2012

Cytoprotective Effects of Carvacrol on Cyclophosphamide-Induced Renal Toxicity in
Anticancer Treatment

Sibel Güneş

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

August 2012

Antikanser Tedavide Siklofosfamid Nedenli Renal Hasarda Karvakrol'ün Koruyucu Etkileri

Sibel Güneş

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Adnan AYHANCİ

Ağustos 2012

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sibel Güneş'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Antikanser Tedavide Siklofosfamid Nedenli Renal Hasarda Karvakrol'ün Koruyucu Etkileri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç Dr. Adnan AYHANCI

İkinci Danışman : Prof. Dr. Ruhi UYAR

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç Dr. Adnan AYHANCI



Üye : Prof. Dr. Ruhi UYAR



Üye : Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK



Üye : Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ



Üye : Prof. Dr. Mehtap KUTLU

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Siklofosfamid (CP), neoplastik hastalıkların tedavisinde tek başına ya da diğer kemoterapötiklerle birlikte sıklıkla kullanılır. CP'nin doz kısıtlayıcı ürotoksik yan etkisi hemorajik sistittir. Bu ürotoksisite nefrotoksisiteye neden olabilir. CP nedenli renal hasarda oksidatif stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Karvakrol (Car) antioksidan (AO), analjezik ve antikarsinojenik özellikleri bilinen fenolik bir bileşiktir. Bu çalışmada CP nedenli nefrotoksisitenin önlenmesinde Car'ün olası koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Sprague-Dawley cinsi 91 adet erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 13 gruba (kontrol, 50-100-150 mg/kg CP grupları, 0.5 mL zeytinyağı, 5-10 mg/kg Car grupları ile CP+5 ve CP+10 mg/kg Car grupları) ayrıldı. Tüm enjeksiyonlar intraperitoneal (i.p.) olarak yapıldı. Deney sonunda tüm hayvanlar ketamin/ksilazin ile anestezi edilerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı. Car'ün böbrek homojenatlarındaki koruyuculuk derecesini belirlemek için malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), toplam AO kapasite (TAC), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) ve plazma kreatinin seviyeleri ölçüldü. Böbrekler histolojik olarak da incelendi.

Sadece CP uygulanan sıçanların böbreklerinde MDA, TOS ve OSİ düzeyleri artarken GSH, SOD, CAT ve TAC düzeylerinin azaldığı gözlemlendi. CP ile birlikte Car verilen gruplarda ise MDA, TOS ve OSİ düzeyleri azalırken AO düzeyleri artmış bulundu. Kreatinin düzeyleri sadece CP uygulanan gruplarda hafif artarken CP+Car uygulanan hayvanlarda azaldı. Böbrek dokusunun histolojik analizlerinde de CP nedenli doku hasarının Car uygulanan hayvanlarda önemli derecede azaltıldığı gözlemlendi.

Verilerimiz, Car'ün AO etkilerinin olduğunu ve CP nedenli oksidatif hasarı azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, oksidatif stres, nefrotoksisite, karvakrol, antioksidan, sıçan.

SUMMARY

Cyclophosphamide (CP) is used alone or in combination of other chemotherapeutic agents to treat neoplastic diseases. The dose limiting urotoxic side effect of CP is hemorrhagic cystitis which can lead to nephrotoxicity. It is known that oxidative stress plays an important role in CP related renal damage. Carvacrol (Car) is a phenolic compound having antioxidant (AO), analgesic and anticarcinogenic properties. In this study protective effect of Car against CP related nephrotoxicity is investigated.

91 male Sprague-Dawley rats were separated in 13 groups having 7 groups in each (control, 50-100-150 mg/kg CP groups, 0.5 mL olive oil, 5-10 mg/kg Car groups and CP+5 and CP+10 mg/kg Car groups). All injections were intraperitoneal (i.p.). At the end of experiments all animals were sacrificed under ketamin/xylazine anesthesia and blood and kidney samples were taken. In order to assess the degree of protectiveness of Car in kidney homogenates, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total AO capacity (TAC), total oxidant state (TOS), oxidative stress index (OSI) and plasma creatinine levels were measured. Kidneys were also analyzed histologically.

In kidneys of animals to which CP was administered alone, MDA, TOS and OSI levels increased whereas GSH, SOD, CAT and TAC levels decreased. In groups where CP and Car were given together MDA, TOS and OSI levels decreased whereas AO levels increased. Creatinine levels were increased slightly in groups where CP was administered alone and decreased in CP+Car groups. Histological analysis of kidney tissue showed that tissue damage was significantly lower in animals where CP was administered with Car.

Our results show Car has AO effects and that it may be useful to eliminate CP related oxidative damage.

Keywords: Cyclophosphamide, oxidative stress, nephrotoxicity, carvacrol, antioxidant, rat.

TEŞEKKÜR

Akademik yaşantım boyunca yaptıkları öncülükle beni aydınlatan, birer bilim insanı, eğitimci ve yol gösterici olarak benden birlikteliklerini esirgemeyen, üzerimde ölçülemez emekleri olan sayın hocalarım Doç. Dr. Adnan AYHANCİ'ya ve Prof. Dr. Ruhi UYAR'a en samimi teşekkürlerimi sunuyorum. Her ikisi de danışman hocalarım olarak bu tezin ortaya çıkarılmasında büyük emek sarfetmişlerdir.

Çok değerli tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalanma şansını bulduğum hocam Prof. Dr. Varol Şahintürk'e çalışmamdaki histolojik işlemlerin yorumlanmasında göstermiş olduğu özveri ve emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamın istatistiksel işlemlerinin yapılmasında ve değerlendirilmesinde çok büyük yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Ahmet Musmul'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora çalışmam boyunca yapıcı ve eğitici eleştirileriyle değerli katkılarda bulunan hocalarım Prof. Dr. Mehtap Kutlu ve Prof. Dr. Fatma Sultan Kılıç'a teşekkür ediyorum.

ESOGÜ Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda tezimin deneysel aşamalarının gerçekleştirilmesinde emek sarfeden arkadaşlarıma yardımları için teşekkür ederim.

Bugüne kadar yanımda olmuş bundan sonra da yanımda olmalarını umut ettiğim benimle birlikte yorulan ama hiç şikayetçi olmayan, üzüntüsüyle sevinciyle hayatı paylaştığım, varlıklarıyla bana güç ve huzur veren canım annem ve abime ve desteklerini esirgemeyen birbirinden değerli arkadaşlarım Ersan Gürdoğan, Mürvet Demirkaya ve Sabri Alper Karataş'a teşekkürlerimle...

Babama...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
 1. GİRİŞ	 1
 2. GENEL BİLGİLER.....	 4
2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	4
2.1.1. Serbest oksijen radikallerinin sınıflandırılması	5
2.1.2. Serbest radikaller ve hastalıklar	7
2.1.3. Serbest radikalleri araştırma yöntemleri	8
2.2. Antioksidan Savunma Sistemi	8
2.2.1. Enzimatik antioksidanlar	9
2.2.1.1. Redükte glutatyon	9
2.2.1.2. Glutatyon peroksidaz	10
2.2.1.3. Glutatyon redüktaz	11

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

2.2.1.4. Süperoksit dismutaz	12
2.2.1.5. Katalaz	13
2.3. Toplam Antioksidan Kapasite ve Oksidatif Stres İndeksi	13
2.4. Antineoplastik İlaçlar ve Nefrotoksisite	14
2.5. Alkilleyici Bileşikler	15
2.6. Siklofosfamid	16
2.7. Karvakrol'un Genel Özellikleri	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Gereçler	22
3.2. Yöntemlerin Uygulanması	22
3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması	22
3.2.2. Siklofosfamid ve karvakrol uygulaması	23
3.3. Böbrek Dokusu Malondialdehid Düzeyinin Belirlenmesi	25
3.4. Böbrek Dokusu Katalaz Düzeyinin Belirlenmesi	26
3.5. Böbrek Dokusu Süperoksit Dismutaz Düzeyinin Belirlenmesi	27
3.6. Böbrek Dokusu Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi.....	28
3.7. Toplam Antioksidan Kapasitenin Ölçümü	29
3.8. Toplam Oksidan Seviyenin Ölçümü	29
3.9. Oksidatif Stres İndeksinin Ölçümü	30

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)**Sayfa**

3.10. Histolojik Analizler	30
3.11. İstatistiksel Değerlendirmeler	30
4. BULGULAR	32
4.1. Biyokimyasal Bulgular	32
4.2. Histolojik Bulgular.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	62
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	69
7. EKLER	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Serbest radikalın yapısı	5
2.2.1.1.1. Redükte Glutasyon	9
2.2.1.3.1. Glutasyon redoks döngüsü	12
2.6.1. Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3- oksazofosforin 2 oksit	16
2.6.2. Siklofosfamid metabolizması	17
2.6.3. ACR'nin üroepitelyal hücreye girmesi	18
2.7.1. Karvakrol'ün kimyasal formülü	21
4.1.1. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar ve 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney gruplarının MDA seviyeleri	47
4.1.2. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının GSH seviyeleri	48
4.1.3. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının SOD seviyeleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

Sekil

Sayfa

4.1.4. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının CAT seviyeleri	50
4.1.5. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının kreatinin seviyeleri	51
4.1.6. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının TAC değerleri	52
4.1.7. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen grupları, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının TOS değerleri	54
4.1.8. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen grupları, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının OSİ değerleri	55
4.2.1. Kontrol gruplarına ait böbrek kesitleri .	57
4.2.2. Farklı dozlarda CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri	58

4.2.3. 50 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri	59
4.2.4. 100 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri	60
4.2.5. 150 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri	61

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1.1. Oksijen türevi bileşikler	6
3.2.1.1. Uygulanan Siklofosfamid ve Karvakrol'ün gruplara göre dağılımı	23
3.2.2.1. Siklofosfamid ve Karvakrol'ün gruplara uygulanma şekli	24
3.3.1. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	25
3.4.1. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı	26
3.5.1. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	28
3.6.1. GSH ölçümü için kullanılan HPLC ayarları ve kolon	29
4.1.1. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	33
4.1.2. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	34
4.1.3. 0.5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car uygulanan deney grupları ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması	36
4.1.4. 0.5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları ve sf verilen kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	37

TABLOLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Tablo

Sayfa

4.1.5. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	39
4.1.6. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSI ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	40
4.1.7. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	42
4.1.8. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSI ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
mL	Mililitre (10^{-3} litre)
mg	Miligram (10^{-3} gram)
kg	Kilogram (10^3 gram)
μ m	Mikromol (10^{-6} mol)
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
μ g	Mikrogram (10^{-6} gram)
n	Denek sayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)

<u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CP	Siklofosfamid (Cyclophosphamide)
Car	Karvakrol (Carvacrol)
PAM	Fosforamid mustard (Phosphoramid mustard)
ACR	Akrolein (Acrolein)
MDA	Malondialdehid (Malondialdehyde)
GSH	Glutatyon (Glutathione)
SOD	Süperoksit dismutaz (Superoxide dismutase)
CAT	Katalaz (Catalase)
TAC	Toplam antioksidan kapasite (Total antioxidant capacity)
TOS	Toplam oksidan seviye (Total oxidant state)
OSİ	Oksidatif stres indeksi (Oxidative stress index)

1. GİRİŞ

Günümüzde tanısı, tedavisi ve önlenmesi için büyük ve çok sayıda araştırmaya konu olan kanser, uzun bir süreç içerisinde genetik materyalin mutasyonlar etkisiyle hasara uğraması sonucu oluşan ölümcül bir hastalık grubudur. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, 5 yaş üzerindeki her üç ölüm nedeninden biri kanserle ilişkilidir [Demirelli, 2003; Burgut ve Tuncer, 1994]. Kanserle mücadelede birçok tedavi yöntemi çalışılmakta ve uygulanmaktadır. Bunlar genel olarak kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapidir. Çoğunlukla birlikte kullanılan bu tedavi yöntemlerinde esas, neoplastik hücrelerin gelişimini yavaşlatmak ve sayılarını azaltmaktır. Bunu sağlamak için bu yöntemler hastaya ve hastanın kliniğine göre farklı sırayla veya eşzamanlı olarak uygulanır. Bu uygulamalar arasında kemoterapiye sıkça başvurulur. Kanser kemoterapisinde amaçlanan, tümörün büyümesini ve farklı odaklarda yeniden gelişmesini engelleyecek ve hatta tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayacak sitotoksik etki oluşturmaktır. Burada en büyük sınırlayıcı faktör tümörün tedavide kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesidir. Karşılaşılan diğer temel sorun ise kemoterapötiklerin normal dokular üzerindeki toksik etkisidir [Calabresi and Welch, 1962; Kızılcı, 1999].

İnsan tümörlerin antikanser ilaçlara gösterdikleri direncin üstesinden gelebilmek için tümörlü hastalara yoğun bir kemoterapi uygulanmalıdır. Bunun için özellikle Siklofosfamid (Cyclophosphamide = CP) gibi yüksek doz alkilleyici ajanların kullanılması gerekir [Cavalletti et al., 1986]. Ancak yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması ve kanser hastalarının sağkalım sürelerinin uzaması ilaçların yan etkilerini de artırmıştır [Kumar and Kuttan, 2004]. 1958'den bu yana kanser ve malignant olmayan hastalıkların tedavisinde etkinliği kanıtlanmış, pek çok neoplastik hastalıkta tek başına veya diğer kemoterapötiklerle birlikte geniş bir kullanım alanına sahip olan CP'nin de yan etkileri mevcuttur. Bunlardan başlıcaları; hematopoietik depresyon, hemorajik sistit (hemorrhagic cystitis = HC) ve renal toksisitedir [Abraham and Isaac, 2011]. HC, CP'nin en önemli yan

etkisidir. Ciddi HC; mesane kontraksiyonu, anemi, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu, mesane delinmesi (perforasyonu), böbrek yetmezliği ve ölüme yol açabilir [West, 1997].

Sitotoksik bir ilaç olan CP'nin büyük bir kısmı karaciğerde az bir kısmı da böbrek ve akciğerde metabolize edilir. Artık metabolitlerin büyük bir çoğunluğu boşaltım sistemiyle bedenden atılırken %15'ten az bir kısmı da değişmeden kalır. Bu metabolik artıklar ürotoksik ve nefrotoksik etkileriyle renal hasara yol açarlar ve CP'nin klinik yararlılığını sınırlarlar [Juma et al., 1981].

CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan akrolein (acrolein = ACR) ile ilgilidir. ACR doku antioksidan (AO) savunma sistemine etki ederek yüksek oranda serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna yol açar [Senthilkumar et al., 2006]. SOR bedende normal metabolizma sırasında veya çeşitli dış etkenler yoluyla üretilir ve başta kanser ve kalp-damar hastalıkları olmak üzere birçok dejeneratif hastalığın oluşmasında önemli rol oynar. SOR endojen veya eksojen oluşabilir. Endojen SOR normal hücre metabolizması ve oksidatif fosforilasyon sonrası oluşur. İlaçlar, hormonlar ve bazı kimyasallar, eksojen SOR'u oluştururlar. Oksidatif stres sonrası oluşan SOR; deoksiribonükleik asit (DNA), lipit ve protein hasarına yol açar. SOR ile okside olan yağ asitleri lipit peroksi radikallerine ve lipit hidroperoksitlere dönüşürler. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'tir. Oluşan MDA hücre zarlarında iyon alışverişine etki ederek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Lipit radikalleri DNA ile de reaksiyona girerek DNA-MDA ürünleri oluşturur. Lipit radikalleri hücre zarını rahatlıkla geçerek hücredeki homeostazisi bozar [Porter, 1984]. ACR kaynaklı oluşan SOR'lar; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların işlevlerini bozarlar. Yapılan çalışmalarda ACR kaynaklı oluşan SOR'ların böbrekte oksidatif strese ve doku hasarına neden olduğu kanıtlanmıştır [Ayhanci et al., 2010].

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan SOR'lar ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir AO savunma sistemine sahiptir. Plazmada AO'lar bir etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki

oluşmaktadır. Bu etkileşime örnek, glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması verilebilir. Toplam AO kapasitenin (total antioxidant capacity = TAC) ölçümü, AO'ların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir, bu yüzden kanın antioksidatif durumunu saptamada, bireysel AO'lardan ziyade bunların toplam AO değerini veren TAC ölçümü yaygınlaşmaktadır. Hücrelerin normal işlevleri sırasında açığa çıkan ve bu hücrelerin doğal AO sistemleriyle yok edilen SOR, bedende oksidatif bir denge halindedirler. Bu oksidatif denge sağlandığı sürece organizma bu bileşiklerin zararlı etkilerinden korunmuş olur. SOR oluşum hızı AO sistemin yok etme gücünü aştığında, denge bozulur ve SOR'lara bağlı oksidatif stres ortaya çıkar [McCord, 1993].

CP'nin ürotoksik etkisi birçok çalışmada kanıtlanmıştır ancak oksidatif ve nitrozatif strese neden olmasına rağmen CP nedenli nefrotoksik etki fazla çalışılmamıştır. 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 [Pool et al., 1988; Ayhanci et al., 2010].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar karvakrol (carvacrol = Car) gibi bazı fenolik bileşiklerin hücre koruyucu etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Kekik yağının ve kekik suyunun ana bileşiği olan Car'ün lipozom fosfolipitlerinin peroksidasyonunu baskıladığı 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. Ayrıca Car'ün güçlü bir antitümör etkisinin olduğu bildirilmiştir [Ipek et al., 2005; Baser, 2008].

Çalışmamızda CP verilerek oluşturulmuş böbrek hasarına karşı, AO özellikleri bilinen Car'ün olası koruyucu etkilerini histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle (kreatinin, MDA, glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), toplam AO kapasite (TAC), toplam oksidan seviye (total oxidant status = TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) ölçümlerini yaparak) araştırdık.

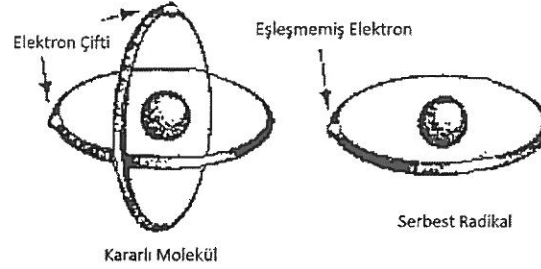
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Organizmanın yaşamı ve bütünlüğü homeostatik dengenin sürdürülmesine bağlıdır. Homeostaz hem içsel hem de dışsal stres etkenleriyle sürekli olarak tehdit edilir. Hücre bu stres etkenlerine karşı kendini koruyucu mekanizmalar geliştirmiştir. Aerobik organizmalar tarafından organik moleküllerden enerji açığa çıkarılmasında oksijenin kullanılması, bu organizmaları toksik oksijen ürünlerinin zararlı etkileriyle karşı karşıya bırakmıştır. İlginçtir ki, bu toksik oksijen ürünleri hücre için yaşamsal olan fizyolojik ve metabolik süreçlerden kaynaklanır [McCord, 1993].

Evrimsel süreç içinde, reaktif oksijen türlerini (reactive oxygen species = ROS) etkisiz hale getirmek için AO savunma sistemi olarak tanımlanan koruyucu bir sistem gelişmiştir [Halliwell and Gutteridge, 1990]. Bu sistemin görevi hücreyi, oksijenin tam olmayan indirgenmesi sırasında oluşan SOR'ların zararlı etkilerinden korumaktır. Normalde organizmada oluşan SOR ile AO aktivite arasında hassas bir denge vardır, zararlı etkiler gözlenmez [McCord, 1993].

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır (Şekil 2.1.1). En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir ($R^{\cdot}$, $R^{\cdot}$) [Meister, 1994; Cros et al., 1997].



Şekil 2.1.1. Serbest radikalın yapısı. En dış yörüngesinde eşlenmemiş elektron görülmektedir.

SOR, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri" de denmektedir. Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı ROS'lar bedene yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Çoğunu SOR'ların oluşturduğu ROS'lar normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır [Halliwell, 1991; Diplock, 1998].

2.1.1. Serbest oksijen radikallerinin sınıflandırılması

Organizmada pek çok türde SOR oluşabilir (Tablo 2.1.1.1). Ancak en sık olarak lipit yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipit radikali meydana gelir. Oluşan lipit radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksi radikali oluşturur. Lipit peroksi radikali diğer lipitlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipit hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipit peroksidasyonunu hızlandırır. Lipit radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan MDA'dır. MDA üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir. Oluşan MDA, hücre zarlarında iyon alışverişine etki ederek zardaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur.

MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir [Porter, 1984; Kalender et al., 2002].

Hidrojen peroksit zarlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle ROS, süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir [McCord, 1993]. Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar [Halliwell, 1991].

Tablo 2.1.1.1. Oksijen türevi bileşikler.

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO [•])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [•])	Singlet oksijen (O ₂ ^{1Δ})
Peroksil (ROO [•])	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Hipoklorit (HOCl)
Nitrik oksit (NO [•])	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ [•])	Peroksinitrit (ONOO [•])

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık bedendeki farklı doğal savunma sistemleri SOR'ları kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı SOR'lar üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir [Diplock, 1998].

2.1.2. Serbest radikaller ve hastalıklar

SOR'lar birçok patobiyolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. İltihabi hastalıklar, otoimmün hastalıklar, kanser, radyasyon hasarı, göz hastalıkları, yaşlanma, Alzheimer, diyabet ve birçok kimyasal maddenin toksisite göstermesinde SOR'ların etkili olabileceği belirtilmiştir [Aydın ve ark., 2001].

SOR'lar kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişme evrelerinde etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin, diğer safhalarda ise nispeten azdır. SOR etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma meydana gelir. Çok sayıda genin aktivitesi redoks reaksiyonları ile kontrol edilir. SOR'lar da redoks reaksiyonlarını başlattıklarından dolayı oksidatif stres bazı genlerin aktifleşmesine neden olur. Böylece, SOR'lar onkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını artırır.

Tümör durdurma genlerinin SOR'lar tarafından inaktif edilmesi kanserin başlamasına sebep olabilir. Deney hayvanlarının diyetlerinde, kalori sınırlaması yapılarak metabolik hızın düşürülmesi sonucu, tümör görülme sıklığının önemli oranda azaldığı görülmüştür. Çünkü, metabolik hızın düşürülmesi SOR üretiminin de azalmasına neden olur.

Yaşlanmanın metabolizma hızı ile ters orantılı olduğu düşünülmektedir. Hızlı metabolizmada oksijen tüketimi ve bunun sonucunda SOR üretimi artar. Bu radikaller de yaşlanmayı hızlandırırlar. Bu görüş son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu büyük ilgi toplamıştır. 1956 yılında Harman tarafından ortaya atılan bu teoriye göre yaşlanma, normal hayat süresince meydana gelen SOR'ların sebep olduğu yıkımların bir sonucudur. Buna göre, metabolizması hızlı ve fazla oksijen tüketen ve böylece SOR üretimi fazla olan canlılar daha kısa ömürlü olacaklardır. Şüphesiz burada AO savunma sistemleri de önemli rol oynarlar.

Memeliler arasında en uzun ömre sahip olan insanlarda AO bir enzim olan SOD aktivitesi en yüksek, en kısa ömürlü olan farelerde ise en düşüktür. SOR oluşumunu artıran iyonize radyasyon, yaşlanmaya benzer bir tablo meydana getirir ve yaşama süresini kısaltır. Yaşlanmada SOR teorisiyle çelişkili bazı bulgular da vardır. SOR'ların önemli bir kaynağı

olan sitokrom P-450'nin (CYP450) aktivitesi yaş ile ters orantılıdır. CAT ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin de yaşla birlikte arttığı kaydedilmiştir [Akkuş, 1995].

2.1.3. Serbest radikalleri araştırma yöntemleri

SOR'ların hastalıkların patogenezindeki rolü anlaşıldıkça bu radikalleri ölçmek için gerekli olan tekniklere de ihtiyaç artmaktadır. SOR'lar son derece reaktif ve kısa ömürlüdürler. Bu yüzden genellikle lipitlerle, proteinlerle ve DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli son ürünlerin ölçümü ile dolaylı yöntemler kullanılır. Bunlar arasında lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin (MDA) ölçümü en çok kullanılan yöntemdir. Bundan başka, protein hasarı, DNA hasarı ve AO seviyelerinin tayini de kullanılabilir.

MDA ve enzimatik AO'lardan GSH, CAT ve SOD düzeylerinin ölçülmesi en çok kullanılan yöntemlerden biridir. SOR'ları direkt ölçen tek analitik yöntem, elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisidir. Çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda SOR gerektirmesinden dolayı ESR yönteminin kullanımı yaygın değildir. İleri teknik donanım gerektiren ESR yöntemi uygulanması ve sonuçları bakımından çok güvenilir değildir.

Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar, SOR'lar, lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon ürünleri ile kanserojenler arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. Birçok kanserojen maddenin hücre etrafındaki oksidan stresi artırarak kansere sebep olduğu anlaşılmıştır. Bu maddeler SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri dahil hücrenin AO savunmasında ani ve sürekli bir azalmaya sebep olurlar. SOR üreten birçok bileşiğin, in vivo tümörleri ilerlettikleri gösterilmiştir. Radyasyon da SOR üretimi ile kansere sebep olur [Akkuş, 1995].

2.2. Antioksidan Savunma Sistemi

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için bedende "antioksidan savunma sistemi" adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir.

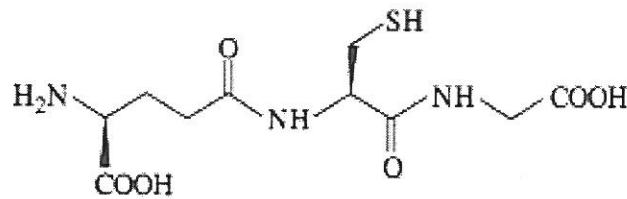
Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar. Savunma sistemlerini SOR tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır ve savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır [Seven ve ark., 1998].

AO'lar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil AO'lar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil (enzimatik) AO'lar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni SOR oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Enzimatik AO kategorisinde yer alan SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzim sistemleri SOR'ları yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak SOR'ların DNA, proteinler ve lipitler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak yoluyla bir hücresel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler. İkincil (enzimatik olmayan) AO'lar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir [Diplock, 1998].

2.2.1. Enzimatik antioksidanlar

2.2.1.1. Redükte glutatyon

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90 kadarını oluşturan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. Tripeptit yapıdaki GSH (L- γ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar (Şekil 2.2.1.1.1). GSH sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROS'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir [Knapen et al., 1999].



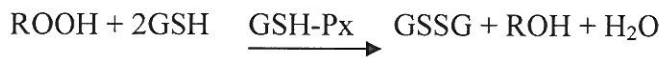
Şekil 2.2.1.1.1 Redükte glutatyon (GSH).

Hücrede milimolar (mM) derişimde bulunan GSH primer olarak redükte formda (GSH) bulunur ancak okside formda (GSSG) disülfid dimeri olarak da bulunabilir. GSH'nin hücresel seviyesi γ -glutamil transpeptidaz, aminoasit taşıyıcıları, glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur [Cnubben et al., 2001].

GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken AO enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu (scavenger) gibi davranır. GSH özellikle peroksidaz ve redüktaz enzimlerinin aktiviteleri için son derece önemlidir. GSSG de indirgenmiş GSH'nin yükseltgenmesiyle oluşur. Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG artar. Bu durumda biriken H_2O_2 ve organik hidroperoksitler glutatyon peroksidaz ve redüktaz etkisiyle ortadan kaldırılırlar. Bu bileşğin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır. GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde kalmasını sağlar ve bu grupları oksidasyona karşı korur [Knapen et al., 1999].

2.2.1.2. Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H_2O_2 'nin redüksiyonunu katalizler [Cnubben et al., 2001].



GSH-Px'in selenyuma bağlı ve bağımsız 2 izomeri vardır. Selenyuma bağlı izoenzimi selenosistein formunda bulunmaktadır. Bu enzim hem hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri kullanabilir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px ise, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında yerleşip, yalnızca lipit hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir [Cnubben et al., 2001].

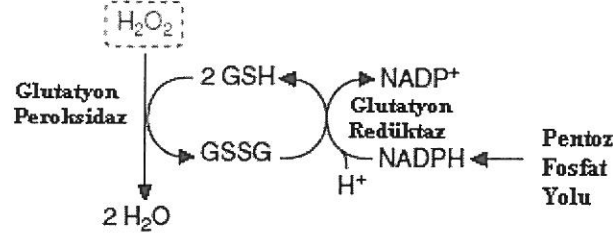
Selenyum bağımlı üyelerden, GSH-Px-1 veya hücresele GSH-Px bütün hücrelerde eksprese edilen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. Eritrosit, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarda bulunur. GSH-Px-2 veya gastrointestinal GSH-Px insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir; böbrek, kalp, akciğer, plasenta ve uterusda bulunmaz. GSH-Px-3 veya plazma GSH-Px plazmanın lipit kısmından izole edilmiş bir glikoproteindir, akciğer, plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunur. GSH-Px-4 veya fosfolipit GSH-Px sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. GSH-Px-5 veya epididimal GSH-Px selenyum bağı değildir ve yalnız epididimiste eksprese edilir. GSH-Px-6 hücresele GSH-Px ile homoloji gösterir, burun epiteli ve embriyolarda eksprese edilir [Haan et al., 1998; Knapen et al., 1999].

2.2.1.3. Glutasyon redüktaz

Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağı flavo enzim olan glutasyon redüktaz (GSH-Rd) tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir [Knapen et al., 1999].



GSH-Rd'nin kalıtımı otozomal dominanttır, 8. kromozom üzerindedir. GSH-Px ile benzer doku dağılımı gösterir. GSH-Rd, flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'den bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH SOR hasarına karşı gereklidir ve kaynağı pentoz fosfat yoludur (Şekil 2.2.1.3.1) [Özkan ve Fışkın, 2004].



Şekil 2.2.1.3.1. Glutasyon redoks döngüsü.

2.2.1.4. Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit anyonunun hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler.



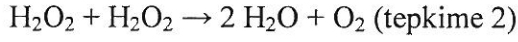
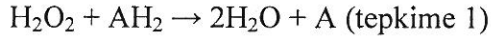
SOD, GSH-Px ve CAT oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD ile $O_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 çıkarılması hücre için biyolojik avantaj sağlar. Hücreden H_2O_2 çıkarılması için SOD, CAT ve GSH-Px enzimleri ile birlikte çalışır [Smith et al., 1983].

SOD enziminin bakır-çinko (Cu-Zn) SOD ve mangan (Mn) SOD olmak üzere iki tipi vardır. Bunların hücre içindeki dağılımı; tetramerik Mn formunun esas olarak mitokondriyal matrikste, kısmen sitoplazmada; dimerik Cu-Zn formunun ise esas olarak sitoplazmada ve kısmen mitokondri zarları arası alanda bulunması şeklindedir. Karaciğer hepatositlerinde, yaklaşık %70'i sitoplazmada bulunmaktadır. Cu-Zn SOD enziminin aktivitesi Cu'a, konformasyonu ise Zn'ya bağlıdır [Blum and Fridovich, 1985; Mena et al., 1991].

SOD aktivitesi bakımından dokular arasında fark vardır. Karaciğer, adrenal bez, böbrek ve dalakta en yüksek düzeydedir. Enzimin aktivitesi, doku oksijenasyonuna duyarlı olan biyosentezi aracılığıyla düzenlenmektedir [Southorn and Powis, 1998].

2.2.1.5. Katalaz

Katalaz (CAT), yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz zarda yüksek miktarda bulunmaktadır. H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır. CAT daha çok hidrojen peroksinin arttığı durumlarda etkilidir [Anderson and Meister, 1998].



CAT daha çok peroksizomlarda, GSH-Px sitozol ve mitokondride lokalize olarak birbirlerini tamamlayıcı bir yerleşim gösterirler. Böylece hücre içi hidrojen peroksit konsantrasyonunu etkin bir şekilde düzenlerler [Burk, 1990].

2.3. Toplam Antioksidan Kapasite ve Oksidatif Stres İndeksi

Normal koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan SOR'lar ve bunlara bağlı gelişen oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir AO savunma sistemine sahiptir. Bedenin oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde, kan çok önemli rol oynamaktadır. Kan, AO'ların bütün bedene taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar [Yao et al., 1998].

Toplam AO kapasiteye en büyük katkı plazmada bulunan AO moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında SOR'ları kapatan zincir kırıcı AO'lar da bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total AO durumun %85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, indirgenmiş GSH, flavonoidler, α -tokoferol ve β -karoten gibi AO durumun bileşenlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır. Plazmada AO'lar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır.

Bu sinerjizme örnek olarak; glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesini sağlaması verilebilir. Toplam AO kapasitenin ölçümü, AO'ların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Bu yüzden kanın AO durumunu saptamada bireysel AO'lardan ziyade bunların toplam AO değerini veren toplam AO kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır [Ghiselli et al., 2000; Erel, 2004].

2.4. Antineoplastik İlaçlar ve Nefrotoksisite

Antineoplastik ilaçların çoğu antitümör etkilerini doğrudan DNA üzerine etki ederek ya da hücre bölünmesini önleyerek gösterirler. İdeal bir kanser ilacı sadece tümör hücrelerini hedef almalı, sitotoksik veya sitostatik etki ile tümör çoğalmasını azaltmalıdır. Gerçekte spesifitenin az olması nedeniyle çoğu kanser ilacının normal hücre ve organlar üzerine de yan etkileri vardır [Kintzel, 2001; Viale and Minetti, 2003].

Antineoplastik ilaç tedavisine bağlı nefrotoksisite kemoterapinin en sık görülen yan etkilerinden biridir. Kemoterapiye bağlı glomerular filtrasyon hızının (GFR) azalması, serum elektrolit dengesinin bozulması ve anormal idrar bulguları görülebilmektedir. Bu durum bazen akut böbrek yetmezliğinden kalıcı böbrek hasarına yol açacak kadar ciddi boyutlara ulaşabilir [Kintzel, 2001]. Böbrekler; yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır [Süleymanlar, 1996]. Nefrotoksinler renal perfüzyonu azaltıp oksijen taşınmasına engel olarak, hücresel oksijen ve adenozin trifosfat (ATP) kullanımını artırarak ve direkt olarak mitokondrilerdeki enerji üretimini bozarak etkilerini gösterirler [Weinberg, 1993]. İlaçlar böbreklerden glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler taşıma yoluyla atılır. Nefrotoksik etki önce hücresel hasara sonra da böbrek işlevlerinde bozulmaya neden olur [David and Berndt, 2001]. Antimetabolitler, alkilleyici ilaçlar, antrasiklinler ve metotreksat en sık nefrotoksisiteye neden olan antineoplastik ilaçlardır [Fillastre and Godin, 1998].

2.5. Alkilleyici Bileşikler

Kanser tedavisinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından biri alkilleyici (sitotoksik) bileşiklerdir [Meister and Anderson, 1983]. Bifonksiyonel sitostatikler olarak tanımlanan bu bileşikler genel olarak hücre fonksiyonlarını amino, karboksil, sülfidril ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak bozarlar. En sık bağlandıkları hücre bölgeleri hücrenin deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein kısımlarıdır. Etkili olabilmeleri için hücre proliferasyonu gerekirken faz spesifik etki göstermezler. Glutasyon konjugasyonu ve DNA tamir mekanizmalarındaki değişiklikler ilaç rezistansında önemlidir [Yagoda et al., 1972].

Bu bileşiklere iyonize ışınların etkisini artırdıkları için “radyomimetikler” de denir. Tıpkı iyonize ışınlar gibi alkilleyici ajanlar bir taraftan tümör inhibisyonu yaparken diğer taraftan normal hücrede kanserojen özellik gösterirler. Kimyasal yapılarına göre 5 alt gruba ayrılarak incelenebilirler:

1. Azotlu hardallar (siklofosamid, ifosamid, mekloretoamin, melfalan ve klorambusil),
2. Etileniminler ve metilmelaminler (aziridin),
3. Alkil sülfonatlar (busulfan),
4. Nitrozoüreler (karmustin, lomustin, semustin ve streptozosin),
5. Triazen ve hidrazin türevleri (dakarbazin ve prokarbazin)

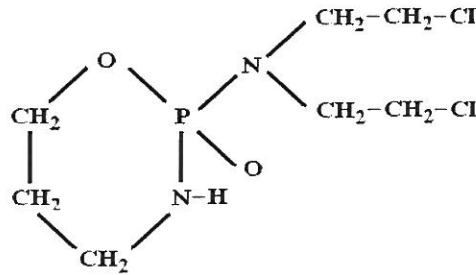
Birinci Dünya Savaşı sırasında zehirli gaz olarak kullanılan ve ciltte toksik vezikül oluşturan kükürtlü hardal (sülfür mustard, dikloroetilsülfür) maddesinin insanlarda lenfoid doku ve kemik iliğinde atrofi yaptığının saptanması, daha sonraki yıllarda azotlu hardal (nitrojen mustard) bileşiklerinin hem kimyasal savaş aracı olarak geliştirilmesine ve hem de deney hayvanlarındaki tümörlerde denenmesine yol açtı. Bu incelemeler sonunda 1948’de bir azotlu hardal olan mekloretoamin adlı bir alkilleyici ilaç klinikte kullanılmaya başlandı ve böylece modern kanser kemoterapisi çağı açılmış oldu. Alkilleyici ilaçlar en uzun bir

süreden beri kullanılan ilaçlar olmalarının yanında, halen en fazla kullanılan antineoplastik ilaçlardır [Kayaalp, 1998].

2.6. Siklofosfamid

CP nitrojen mustard tipi alkilleyici antineoplastik bir ilaçtır. Tek başına veya diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın tedavisinde kullanılır. Karaciğerde aktif metaboliti olan fosforamid mustard (phosphoramid mustard = PAM)'a dönüşerek etkinlik kazanır [Hamsa and Kuttan, 2011].

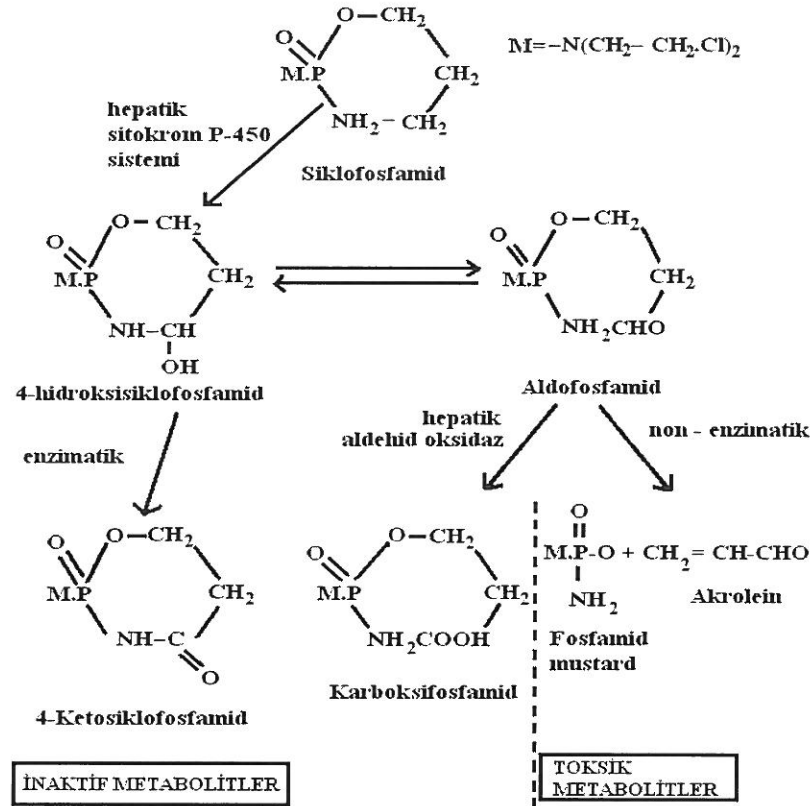
CP'nin kanserostatik aktivitesi PAM oluşumunu veren 'hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz' sistemi ile metabolizmasına bağlıdır [Bernacki et al., 1987]. CP'nin kimyasal yapısı şekil 2.6.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6.1. Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3-oksazofosforin 2 oksit [Budavari, 1987].

P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında CP, 4-hidroksi CP'ye metabolize olur. Bu metabolit, enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide yeniden düzenlenir. Bu da PAM ve akrolein (acrolein = ACR)'e ayrılır (Şekil 2.6.2). PAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan ACR'nin önemli makro moleküllerinin sülfidril

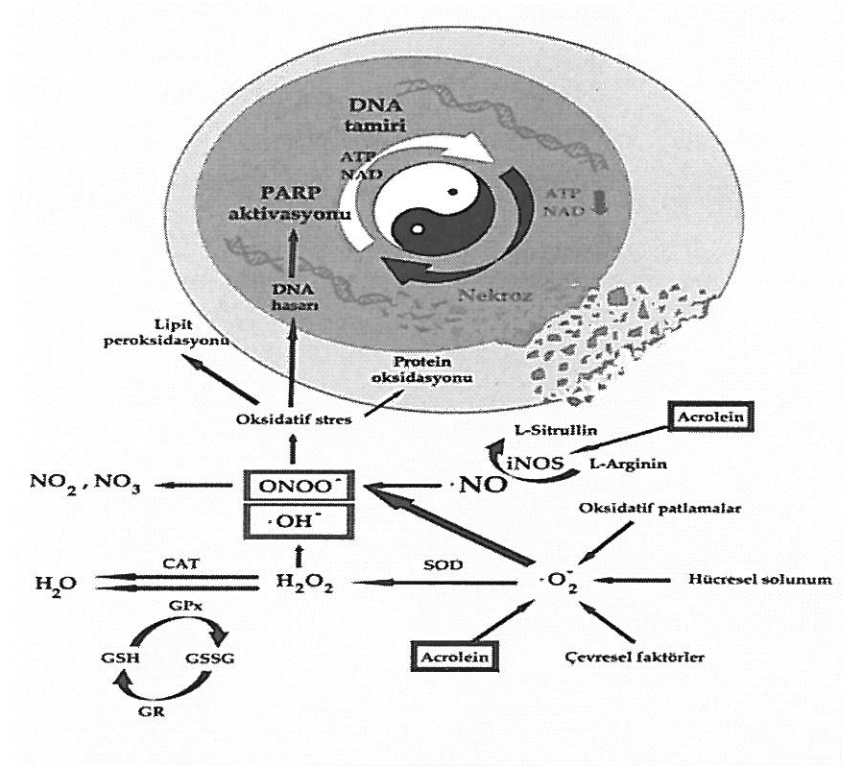
gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiği böylece bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir [Kwon et al., 1987; Pool et al., 1988; Kawabata et al., 1990].



Şekil 2.6.2. Siklofosfamid metabolizması.

ACR üroepitelyumu geçerek ve bazı ROS'ları uyarak etkisini gösterdiği gibi nitrik oksit sentaz (NOS) üzerinden nitrik oksit (NO) seviyelerini artırarak da gösterir (Şekil 2.6.3) [Korkmaz et al., 2007]. NO birçok önemli fizyolojik ve fizyopatolojik süreci düzenleyen SOR öncülü bir üründür. L-argininden NOS yoluyla sentez edilmektedir ve NOS'un 3 tipi vardır. Endotelyal NOS (eNOS) endotelyal hücrelerden ve fibroblastlardan sentez edilir ve ana olarak vazodilatasyondan sorumludur. Sinir sisteminde üretilen nöronal NOS (nNOS) sinirsel sinyalizasyonda görev alan bir enzimdir. İndüklenebilir NOS (iNOS), lökosit ve makrofajlarda sentezlenir. Genel olarak patolojik durumlarda

sentezlenen iNOS'un aktivasyonu ile eNOS aktivasyonundan çok daha fazla NO üretilebilir [Szabo, 1996]. Hemorajik sistit durumunda subüretelyumda iNOS üreten immünoreaktif hücrelerin sayısı artmaktadır. Ayrıca ACR'nin tetiklediği mekanizmalar sonucunda interlokin- α , TNF- β , trombosit aktive edici faktör, COX-2 ve güçlü bir oksidan olan peroksinitrit seviyeleri artmaktadır [Korkmaz et al., 2005].



Şekil 2.6.3. ACR'nin üroepitelyal hücreye girmesi, reaktif oksijen türevlerinin üretimi ve iNOS aktivasyonunun artmasıyla başlayan ve DNA hasarıyla sonuçlanan süreç [Korkmaz et al., 2007].

Hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunan CP, hem oral hem de parenteral olarak kullanılır. CP'nin plazmadaki yarılanma ömrü 6,5 saattir. Parenteral olarak verildiğinde aktif metabolitlerin plazma konsantrasyon pikine ulaşması 2-3 saat sürer [Akçasu ve ark., 1992]. CP'nin kullanıldığı alanlar şunlardır:

- Hodgkin dışı lenfomalar [Glode et al., 1981]

- Çocukların akut lenfositik lösemisi [Bokser et al., 1990]
- Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri [Thatcher et al., 1988]
- Pediatrik solid tümörler [Bramwell et al., 1987]

Bunun yanı sıra, güçlü bir bağışıklık baskılayıcı olduğundan romatoid artrit, çocukların nefrotik sendromu [Koyoma et al., 1977], Behçet hastalığı [Özyazgan et al., 1992] ve diğer bazı otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır [Kayaalp, 1998].

CP'nin en sık görülen yan etkisi bulantı, kusma ve diğer gastrointestinal bozukluklar ile kemik iliği depresyonudur [Ayhanci et al., 2009]. CP'nin sınır dozunda gösterdiği toksisitenin kemik iliğini baskılayıcı toksisite olduğu ileri sürülmüştür [Thatcher et al., 1988]. Kemik iliği depresyonuna bağlı olarak lökopeni, trombositopeni, ve bazı hastalıklarda alopesi gelişmektedir [Banham et al., 1985; Akçasu ve ark., 1992]. CP'nin sıçanlarda alopesi yaptığı deneysel bir çalışmada gösterilmiştir [Hussein, 1995]. CP özellikle daha önce kemoterapi görmüş hastalarda lökopeni yapmaktadır [Bramwell et al., 1987]. Klinik bir çalışmada ileri derecede melonomalı hastalara düşük dozda (350 mg/kg) CP verildiğinde baskılayıcı T hücresi sayısının oldukça azaldığı gösterilmiştir [Mitchell, 1989].

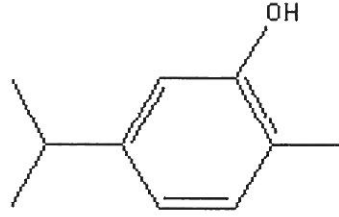
HS, CP'nin en büyük potansiyel toksik etkisi olup bu doz kısıtlayıcı bir yan etkidir. Uzun süreli veya yüksek doz CP tedavisinden sonra hastaların %40'ında HS geliştiği bildirilmiştir [McEvoy et al., 2004]. HS, CP'nin aktif metaboliti olan ACR tarafından üriner epitelin hasar görmesi sonucu oluşur. HS birkaç saat içinde gelişir ve tedaviyle bir iki hafta içinde düzelir [Miller et al., 1994].

Bu nitrojen mustard grubu sitostatik ilacın ürotoksitesisi sadece alkilleyici aktivitelere bağlanmamıştır. Bununla beraber ürotoksisiteden CP'nin hepatik mikrozomal enzimatik hidroksilasyon yoluyla üretilen 4-hidroksi metabolitlerinin ve özellikle de renal ACR salınımının sorumlu olduğu bilinmektedir. Ancak yine de ACR detoksifikasyonu HS semptomlarını tamamen engellemez [Brock et al., 1982; West, 1997].

2.7. Karvakrol'ün Genel Özellikleri

Aromatik hoş bir koku ve lezzet verici özelliğinden dolayı besin olarak kullandığımız bitki çeşitlerinden birisi de “kekik”tir. Tedavi amaçlı ilaç olarak da değerlendirilen kekik ülkemizde ticareti de yapılmaktadır. Hepsî Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasına bağlı kekik türlerinin dahil olduğu *Origanum*, *Thymbra*, *Coridothymus*, *Satureja* ve *Thymus* cinsleri vardır. Uçucu yağ üretiminde kullanılan türlerinin ise *Origanum onites* (bilyalı kekik, İzmir kekiği), *Origanum minutiflorum* (Sütçüler kekiği, yayla kekiği, toka kekiği), *Origanum majorana* (beyaz kekik) ve *Origanum syriacum* var. *bevanii* (dağ kekiği, Suriye kekiği, İsrail kekiği)'dir. *Thymus vulgaris* L.'nin yapraklarının sulu özütünün ya da bundan saflaştırılmış uçucu yağlarının halk tarafından tedavi için kullanıldığı bilinmektedir [Başer, 2001; Baser, 2002].

Solunum bozukluğu, bronşit, üst solunum yolu rahatsızlıkları, öksürük, bağırsak krampları, sindirim sistemi düzensizlikleri, mide ağrısı, dolaşım ve boşaltım sistemi bozuklukları, soğuk algınlığı, romatizma, nezle gibi çok sayıda rahatsızlığa ve enfeksiyona karşı kullanılmaktadır. Bu bitkinin özüt ya da yağlarının yaşlanma önleyici, antibakteriyel, antifungal, antiseptik özellikleri vardır. Uçucu yağın % 60'tan fazla bir kısmını karvakrol (Car) ve timol oluşturmaktadır. Kekik türlerinin yer aldığı Labiate familyasının tüm cinslerinde ortak özellik, yüksek miktarda uçucu yağ içermeleri ve uçucu yağın ana bileşiminin kekike kendine özgü kokusunu veren Car ve/veya timol'ün olmasıdır [Başer, 2001; Baydar et al., 2004]. Ayrıca Car'ün *Anabasis*, *Carum*, *Cinnamomum*, *Mentha*, *Ocimum*, *Zea* gibi bitkilerden de izole edilmektedir [Golob et al., 1999]. Car, $C_{10}H_{14}O$ kimyasal formüllü ve 2-metil-5-(1-metiletil)fenol kimyasal isminde monoterpenoik fenoldür (Şekil 2.7.1).



Şekil 2.7.1. Karvakrol'ün kimyasal formülü [Stammati et al., 1999; Carvalho et al., 2003].

Car'ün 2-hidroksi-1-metil-4-(1-metiletil) benzen, 2-hidroksi-pcymene, 2-metil-5-izopropilfenol, 3-izopropil-6-metilfenol, antioksin, izopropil-o-cresol, izotimol, p-cymen-2-ol ve 5-izopropil-2-metilfenol gibi sinonimlerine de rastlamak mümkündür [MSDS; FAO; De Vincenzi et al., 2004].

Bu bileşik alkol ve eter ile kolay biçimde çözünebilir ancak, su ile kolay çözünmez. Car'ün çeşitli aktiviteleriyle çok sayıda AO özellikleri belirlendiği için ve kimyasal yapısında OH⁻ grupları bulunmasından dolayı AO olarak değerlendirilebilir [Kulisic 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 toksisitesi ile üreme sağlığı üzerine ve teratojenik etkilerine yönelik veri bulunmamaktadır [De Vincenzi et al., 2004].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

Çalışmamızda 3-4 aylık, erkek, 220 ± 20 gram ağırlığında, sağlıklı, Sprague-Dawley cinsi, albino sıçanlar kullanıldı. Bütün deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda normal musluk suyu ve pellet yemle standart bir çevre yaşamında beslendi.

Bu çalışma ESOĞÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 16.02.2011 tarihli ve 213/2011 nolu kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

3.2. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması

Bütün deney hayvanları enjeksiyondan önce bir haftalık karantinaya alındı ve deney süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22°C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Sıçanlar Tablo 3.2.1.1' de gösterildiği gibi her grupta 7 hayvan olacak şekilde kontrol dahil 13 ayrı gruba ayrıldı ve her kafeste 4 hayvan olacak şekilde yerleştirildi. Hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptandı.

Deney bittiğinde, tüm sıçanların etik kurallarına uygun olarak, ketamin/ksilazin anestezisi altında toraksı açılıp yüreğe enjektörle girilerek kalp kanı yapılacak işleme göre, normal ve EDTA'lı tüplere alındı.

Tablo 3.2.1.1. Uygulanan Siklofosfamid ve Karvakrol'ün gruplara göre dağılımı.

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

3.2.2. Siklofosfamid ve karvakrol uygulaması

Deneyde 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12. gruplara tek doz intraperitoneal (i.p) olarak uygulanan CP Sigma'dan (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) temin edildi (Cyclophosphamide Monohydrate, katalog no: C0768). CP dozları önceki çalışmalara göre (50, 70, 100, 120, 150 ve 200 mg/kg) düzenlendi [Lerza et al., 1988; Uchida et al., 1994; Slattey et al., 1995; Ayhanci et al., 2010]. Deneylerimizde CP'nin üç farklı dozu (50, 100, 150 mg/kg) uygulandı.

Deneysel çalışmamızda 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. gruplara i.p olarak iki farklı dozu (5 ve 10 mg/kg) uygulanan %98 saflıktaki Car Sigma'dan (Sigma-Aldrich, Germany) (Carvacrol, katalog no: 282197-%98) temin edildi. CP'nin 500 mg'ı 25 mL bidistile suda eritilerek 25 mL/500 mg CP içeren çözelti hazırlandı. Car'ün ise 5 ve 10 mg/kg'ı 0.5 mL zeytinyağı ile birlikte enjeksiyona hazır hale getirildi. Bu kimyasal maddeler ve kontrol gruplarına uygulanan uygun dozlardaki serum fizyolojik (sf) i.p. olarak verildi.

İlk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce deney hayvanları tartılarak ağırlıkları saptandı. Sadece CP verilen ilk üç gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonundan 3 gün sonra anestezi edildi. Car ile birlikte CP verilen gruplarda, Car uygulamasına CP uygulamasından üç gün önce başlandı ve deney sonuna kadar devam edildi. Dördüncü günde hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlendi böylece dördüncü gün CP+Car verildi. Yedinci gün hayvanlar anestezi edilerek kan ve böbrekleri alındı [Uyar ve ark., 1990; Ayhanci et al., 2010]. Car'ün CP ile birlikte 5 ve 10 mg/kg'lık dozlarından başka, 5 ve 10 mg/kg'lık dozları da tek başına kullanıldı (Tablo 3.2.2.1).

Tablo 3.2.2.1. Siklofosamid ve Karvakrol'ün gruplara uygulanma şekli.

Gün Verilen Madde	1	2	3	4	5	6	7
CP	+			Kesim			
Car	+	+	+	+	+	+	Kesim
CP+ Car	Car	Car	Car	CP + Car	Car	Car	Kesim
Kontrol	sf	sf	sf	sf	sf	sf	Kesim

3.3. Böbrek Dokusu Malondialdehid Düzeyinin Belirlenmesi

MDA ölçümü Uchiyama ve Mihara yöntemine (1978) göre yapıldı. Bu yöntemin esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesine dayanmaktadır.

Çıkarılan her böbrekten elde edilen dokuların yaklaşık 50-100 mg'lık kısmı MDA ölçümü için kullanıldı. MDA ölçümü için kullanılan dokular +4°C'de 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenizatlar 3000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 gr KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.

2. %1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3. Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 gr TBA tartıldı ve 50 mL distile suda magnetik bar yardımıyla 10 dk karıştırıldı. Ardından üzerine 50 mL asetik asit ilave edilerek çözüldü.

4. Standart çözeltiler: 8.3 µL tetrametoksipropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 3.3.1. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Eklenen Miktar (mL)
Doku homojenatı	0.5
H ₃ PO ₄	3
Tiyobarbitürik asit	1

Tablo 3.3.1'de verilen karışım vortekslendi. Ardından 100 °C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA

pleytine pipetlendikten sonra 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar ise nmol/g protein MDA olarak hesaplandı.

3.4. Böbrek Dokusu Katalaz Düzeyinin Belirlenmesi

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi (1987) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin temeli H_2O_2 ’nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm’de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

1. Fosfat tamponu (pH=7.0 ; 50 mM): 6.81 gr KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L’ye tamamlandı. 8.9 gr $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1L’ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0 ‘a ayarlandı.

2. Hidrojen peroksit: 240 μ L %30’luk H_2O_2 ’den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL’ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 3 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

Tablo 3.4.1. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-----
Numune	1.5	1.5
H_2O_2	-----	0.75

H_2O_2 eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’de 30 saniye (sn) süreyle her 10 sn’de bir absorbanlar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi.

Absorbanlardaki düşüşün 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır.

CAT aktivitesinin belirlenmesinde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 sn'lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2,3/10) \times \log (A_1/A_2) \text{ sn}^{-1} \quad (1)$$

Burada;

A_1 = Başlangıç absorbansı

A_2 = 10 sn sonraki absorbanstır.

Eşitlik 1'e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından böbrek dokularında gram protein başına CAT aktivitesi hesaplandı (U/gr protein).

3.5. Böbrek Dokusu Süperoksit Dismutaz Düzeyinin Belirlenmesi

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (1988) geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır.

Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok O_2^- kaldırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddeti daha az olmalıdır. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Kullanılan Çözeltiler:

1. 0.3 mM ksantin çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözüldü.
2. 0.6 mM EDTA çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü.
3. 150 μ M NBT çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.
4. 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi: 1.01 g Na_2CO_3 alındı ve 24 mL deiyonize suda çözüldü.
5. % 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi: 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözüldü.

Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

6. 2 M Amonyum sülfat çözeltisi: 2.64 gr amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözöldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

7. 0,8 mM CuCl₂ çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözöldü.

8. 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3,3 U/mL’lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL’ye tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 U/mL’lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH’si 7.4 olan 50 mM’lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı.

Standart ve köre etanol/kloroform aşaması uygulanmadı. Numuneler 4 kat seyreltildi.

Tablo 3.5.1. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaktifler	Miktar (mL)
Standart/Dilue Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.25
25°C’de 20 dakika karanlıkta inkübasyon	
Bakır klorür	0.5
560 nm’de spektrofotometrik ölçüm	

Hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre % inhibisyon cinsinden yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

3.6. Böbrek Dokusu Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

GSH ölçümü, Afzal ve arkadaşlarının (2002) geliştirdiği yöntemden modifiye edilerek yapıldı. 0.2 mL doku homojenatı alındı, üzerine %3’lük 400 µL metafosforik asit eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 25 dk bekletildi, ardından 10.000 g’de +4°C’de 5 dk santrifüjlendi. Sep-Pak marka C-19 katı faz ekstraksiyon kolonundan 400 µL süpernatant geçirildi (Bu işlemde önce kolon 400 µL metanol ile 2 kere şartlandırıldı). Daha sonra kolon 400 µL %0.1’lik TFA ile elüe edildi. Elüent viallere alınarak HPLC’de çalışıldı.

Kullanılan Çözeltiler:

1. %0.1'lik Trifloroasetik asit çözeltisi: Orjinal şişeden 1000 µL TFA alındı, son hacim HPLC saflığındaki su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. Metafosforik asit çözeltisi: 1.5 gr metafosforik asit bir miktar HPLC saflığında su ile çözüldü ve son hacim HPLC saflığındaki su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tablo 3.6.1. GSH ölçümü için kullanılan HPLC ayarları ve kolon.

Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Mobil faz	%65 Asetonitril, %35 %0.1 TFA
Akış Hızı	1 mL/dk
Dedektörün dalga boyu	210 nm
Kolon	C-18 Fortis UniverSil C18 250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çaplı

3.7. Toplam Antioksidan Kapasitenin Ölçümü

TAC üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kolorimetrik assay kit (Rel Assay, Ref. RL27, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbansları 530 nm dalga boyunda VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Divices in California, USA) kullanılarak belirlendi [Erel, 2004].

3.8. Toplam Oksidan Seviyenin Ölçümü

TOS üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kolorimetrik assay kit (Rel Assay, Ref. RL27, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbansları 530 nm dalga boyunda VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Divices in California, USA) kullanılarak belirlendi [Erel, 2005].

3.9. Oksidatif Stres İndeksinin Ölçümü

TOS/TAC oranı alınarak OSİ değeri hesaplandı. Hesaplama sırasında, TAC değerlerinin birimi, mmol Trolox equivalent/L cinsinden μmol Trolox equivalent/L cinsine dönüştürüldü. OSİ, $\text{OSİ} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (\text{TAC}, \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 100]$ formülü kullanılarak hesaplandı [Aycicek et al., 2005].

3.10. Histolojik Analizler

Mikroskopik inceleme için hayvanların sağ böbrekleri %10' luk formaldehitte fikse edildikten sonra olağan doku takip işlemleri yapılarak parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 4-5 μm kalınlığında alınan seri kesitler hematoksilin+eozin (H+E) boyama tekniği ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi. İncelemede kanama, inflamasyon, tübüler atrofi, tübüler nekroz, glomerül hasarı, Bowman kapsül aralığında daralma dikkate alındı. Tüm mikrograflar Olympus marka DP70 kamera ile elde edildi.

3.11. İstatistiksel Değerlendirmeler

Tüm veri analizleri SPSS 20.0 ve SigmaStat 3.5 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdelerik değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler, One Way Anova (bu testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey ve Student Newman Keuls yöntemlerinden yararlanılmıştır) testi ile, normal dağılım göstermeyen skor değişkenlerinden oluşan veriler ise Kruskal-Wallis (bu testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey ve Student Newman Keuls yöntemlerinden yararlanılmıştır) testi ile analiz edilmiştir.

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

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

50, 100 ve 150 mg/kg CP uygulanan deney gruplarının ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS, OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.1 ve 4.1.2’de gösterilmiştir.

50 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 50 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA (%14), TOS (%31) ve OSİ (%75) değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir artış gösterirken kreatinin düzeyindeki %11’lik artış anlamlı bulunmamıştır. Bu grupta GSH, SOD, CAT ve TAC seviyelerinin kontrole göre sırasıyla %19, %14, %24 ve %25 oranlarında istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.001$).

100 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA, TOS ve OSİ değerleri kontrole göre sırasıyla %38, %88 ve %165 oranlarında istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir artış göstermiştir ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubundaki kreatinin seviyesinin kontrole göre %26 oranında arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). GSH, SOD, CAT ve TAC değerleri kontrole göre sırasıyla %27, %53, %42 ve %31 oranlarında istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir azalma göstermiştir ($p<0.001$).

En yüksek toksisitenin görüldüğü 150 mg/kg CP uygulanan deney grubunda MDA (%65), TOS (%175) ve OSİ (%500) düzeyleri kontrole göre istatistiksel açıdan ileri derecede önemli artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu grupta kreatinin seviyesi kontrole göre %26 oranında bir artış gösterirken ($p<0.05$) GSH, SOD, CAT ve TAC seviyeleri kontrole göre sırasıyla %52, %68, %58 ve %55 oranlarında istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir azalma göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.1.1. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	MDA (nmol/g protein)	<i>p</i>	GSH (µg/mg protein)	<i>p</i>	SOD (U/mg protein)	<i>p</i>	CAT (U/g protein)	<i>p</i>	Kreatinin (mg/dL)	<i>p</i>
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
I. GRUP 50 mg/kg CP	438±6,856	***	40,286±0,738	***	0,302±0,00783	***	38,114±0,717	***	0,429±0,0488	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
II. GRUP 100 mg/kg CP	530±7,118	***	36±0,739	***	0,164±0,00365	***	29,2±0,529	***	0,486±0,069	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
III. GRUP 150 mg/kg CP	632,143±10,14	***	24±0,346	***	0,112±0,00231	***	20,8±0,49	***	0,486±0,069	0

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

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

Tablo 4.1.2. 50, 100, 150 mg/kg CP verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSI ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	p	TAC ($\mu\text{mol Trolox equivalent/L}$)	p	OSİ (TOS/TAC)	p
KONTROL	15.071 $\pm$ 0.160	ns	0.841 $\pm$ 0.0254	**	1.792 $\pm$ 0.0437	***
I. GRUP 50 mg/kg CP	15.200 $\pm$ 0.129		0.789 $\pm$ 0.0204		1.928 $\pm$ 0.0495	
KONTROL	15.071 $\pm$ 0.160	***	0.841 $\pm$ 0.0254	***	1.792 $\pm$ 0.0437	***
II. GRUP 100 mg/kg CP	16.629 $\pm$ 0.522		0.680 $\pm$ 0.0327		2.451 $\pm$ 0.157	
KONTROL	15.071 $\pm$ 0.160	***	0.841 $\pm$ 0.0254	***	1.792 $\pm$ 0.0437	***
III. GRUP 150 mg/kg CP	17.214 $\pm$ 0.241		0.589 $\pm$ 0.0135		2.925 $\pm$ 0.0613	

0 : $p > 0.05$, fark yok
 ** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var
 *** : $p < 0.001$, ileri derecede önemli fark var

0.5 mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car uygulanan deney grupları ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.3 ve 4.1.4'te gösterilmiştir.

0,5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ile 5 ve 10 mg/kg Car uygulanan deney gruplarında MDA, TOS, OSİ ve kreatinin değerleri kontrolle fark göstermemiştir ($p<0.05$). 0,5 mL zeytinyağı verilen gruptaki GSH ve TAC değerleri kontrolle fark göstermezken ($p<0.05$), GSH düzeyi 5 ve 10 mg/kg Car verilen her iki deney grubunda da kontrole göre sırasıyla %23 ve %24 oranlarında artmıştır ($p<0.001$). SOD düzeyi bakımından her üç grupta da kontrole göre fark bulunmamıştır ($p<0.05$). CAT seviyesi 10 mg/kg Car verilen grupta kontrole göre farklı bulunmazken ($p<0.05$), zeytinyağı uygulanan grupta %4 oranında azalmış ($p<0.05$), 5 mg/kg Car verilen gruplarda %8 oranında artmıştır. TAC, 5 ve 10 mg/kg Car verilen guruplarda kontrole göre sırasıyla %17 ve %19 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.1.3. 0.5mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları uygulanan deney grupları ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması.

GRUPLAR (n=7)	MDA (nmol/g protein)	<i>p</i>	GSH (µg/mg protein)	<i>p</i>	SOD (U/mg protein)	<i>p</i>	CAT (U/g protein)	<i>p</i>	Kreatinin (mg/dL)	<i>p</i>
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
IV. GRUP 0.5 mL zeytinyağı	396±4,32	0	49,931±1,549	0	0,36±0,0073	0	48,114±0,72	*	0,4±0	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
V. GRUP 5 mg/kg Car	380,286±7,251	0	61,057±1,231	***	0,362±0,002	0	54,029±0,482	***	0,429±0,0488	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
VI. GRUP 10 mg/kg Car	382±2,828	0	61,343±0,223	***	0,362±0,00383	0	51,114±0,414	0	0,4±0,0577	0

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

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

Tablo 4.1.3. 0.5mL zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg Car verilen deney grupları uygulanan deney grupları ve sf verilen kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	<i>p</i>	TAS ($\mu\text{mol Trolox equivalent/L}$)	<i>p</i>	OSİ (TOS/TAC)	<i>p</i>
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651		4,715 $\pm$ 0,0769	***
IV. GRUP 0.5mL zeytinyağı	4,8 $\pm$ 0,0702		214 $\pm$ 6,325		4,46 $\pm$ 0,176	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
V. GRUP 5 mg/kg Car	5,117 $\pm$ 0,018		170,286 $\pm$ 5,219		3,327 $\pm$ 0,094	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
VI. GRUP 10 mg/kg Car	5,2 $\pm$ 0,0589		178 $\pm$ 4,899		3,422 $\pm$ 0,0792	

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

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

50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car uygulanan deney gruplarının ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.5 ve 4.1.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.1.5'te de görüldüğü gibi, 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kreatinin seviyesi kontrole göre farklı bulunmazken ($p>0.05$), MDA seviyesi kontrol grubuna göre %1 oranında artmıştır. 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kontrol grubuna göre TOS %13, OSİ ise %16 oranlarında azalmıştır. 50+5 mg/kg CP+Car grubunda GSH, CAT ve TAC değerleri kontrol grubuna göre sırasıyla %1 %10 ve %4 oranlarında artmıştır. 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki SOD seviyesi kontrol grubuna göre hafif bir artış gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki kreatinin seviyesi kontrole farklı bulunmazken ($p>0.05$) MDA, TOS ve OSİ değerleri kontrol grubuna göre sırasıyla %11, %24 ve %22 oranlarında istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir artış göstermiştir ($p<0.001$). 100+5 mg/kg CP+Car uygulanan deney grubundaki SOD seviyesi kontrol grubuna göre %7 oranında azalmıştır ($p>0.05$). Bu grupta GSH düzeyi kontrole göre %1 oranında artarken CAT seviyesi %6 oranında azalmıştır. 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda TAC kontrole oranla %1'lik bir artış göstermiştir.

150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki kreatinin seviyesi kontrole göre %22 oranında azalmıştır ($p>0.05$). MDA, TOS ve OSİ değerleri kontrol grubuna göre sırasıyla %20, %39 ve %47 oranlarında artmıştır ($p<0.001$). 150+5 mg/kg CP+Car uygulanan deney grubundaki GSH, SOD ve CAT seviyeleri kontrol grubuna göre sırasıyla %8, %49 ve %1 oranlarında azalmıştır. 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda TAC değeri kontrol grubuna göre %5 oranında artmıştır.

Tablo 4.1.5. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	MDA (nmol/g protein)	<i>p</i>	GSH (µg/m g protein)	<i>p</i>	SOD (U/mg protein)	<i>p</i>	CAT (U/g protein)	<i>p</i>	Kreatinin (mg/dL)	<i>p</i>
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
VII. GRUP 50+5 mg/kg CP+Car	402,429±13,113	***	54,171±2,633	***	0,357±0,0227	0	55,286±2,104	***	0,4±0	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
VIII. GRUP 100+5 mg/kg CP+Car	427,143±19,386	***	50,843±0,981	0	0,25±0,00831	***	46,986±0,937	***	0,286±0,0378	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
IX. GRUP 150+5 mg/kg CP+Car	456,857±10,9	***	45,7±2,296	***	0,181±0,00534	***	33,186±1,317	***	0,3±0	0

0 : $p > 0,05$, fark yok

** : $p < 0,01$, önemli fark var

* : $p < 0,05$, fark var

*** : $p < 0,001$, ileri derecede önemli fark var

Tablo 4.1.6. 50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSI ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	<i>p</i>	TAC ($\mu\text{mol Trolox equivalent/L}$)	<i>p</i>	OSİ (TOS/TAC)	<i>p</i>
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	**	4,715 $\pm$ 0,0769	***
VII. GRUP 50+5 mg/kg CP+Car	4,546 $\pm$ 0,162		179,429 $\pm$ 11,414		3,947 $\pm$ 0,203	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
VIII. GRUP 100+5 mg/kg CP+Car	4,417 $\pm$ 0,107		255 $\pm$ 6,831		5,775 $\pm$ 0,213	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
IX. GRUP 150+5 mg/kg CP+Car	4,137 $\pm$ 0,0716		286,571 $\pm$ 5,159		6,93 $\pm$ 0,233	

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

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

50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car uygulanan deney gruplarının ve sf verilen kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS ve OSİ ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması Tablo 4.1.7 ve 4.1.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1.7 ve 4.1.8’de de görüldüğü gibi, 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki MDA, TOS ve OSİ değerleri kontrol grubuna göre sırasıyla %6, %10 ve %39 oranlarında azalmıştır. Bu grupta kreatinin seviyesi kontrol grubuna göre %18 oranında artmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.05$). 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda GSH ve CAT düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla %1 ve %57 oranlarında artış göstermiştir. Bu grupta SOD seviyesi ise kontrole göre %3 oranında azalmıştır. TAC, 50+10 mg/kg CP+Car verilen grupta kontrole göre %47 oranında artmıştır ($p<0.001$).

100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu MDA ve kreatinin seviyeleri bakımından kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p<0.05$), TOS’un %25 oranında arttığı OSİ’nin ise kontrole göre %4 oranında azaldığı tespit edilmiştir. GSH düzeyi 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kontrole oranla %1 oranında artış göstermiştir ($p<0.05$). Bu gruplar arasında, SOD seviyesi 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kontrole göre %6 oranında azalırken CAT ve TAC değerleri sırasıyla %17 ve %29 oranında artış göstermiştir.

150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu MDA, kreatinin ve CAT seviyeleri bakımından kontrolle kıyaslandığında MDA, TOS ve OSİ değerleri kontrole göre sırasıyla %10, %30 ve %18 oranlarında artarken, kreatinin ve CAT seviyesi kontrolle farklı bulunmamıştır ($p<0.05$). Bu grupta GSH SOD ve TAC değerleri kontrol grubuna göre sırasıyla %8, %27 ve %1 oranlarında artmıştır.

Tablo 4.1.7. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA, GSH, SOD, CAT ve kreatinin ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	MDA (nmol/g protein)	P	GSH (µg/m g protein)	p	SOD (U/mg protein)	p	CAT (U/g protein)	p	Kreatinin (mg/dL)	p
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
X. GRUP 50+10 mg/kg CP+Car	359,714±16,66	***	52,571±1,303	***	0,34±0,00705	***	78,771±2,296	***	0,457±0,0535	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
XI. GRUP 100+10 mg/kg CP+Car	390,286±8,118	0	49,957±2,831	0	0,33±0,00327	***	58,586±2,175	***	0,486±0,069	0
KONTROL	383,571±8,696		49,571±3,259		0,35±0,00607		50,071±1,943		0,386±0,0378	
XII. GRUP 150+10 mg/kg CP+Car	422,714±8,139	***	45,429±1,263	***	0,256±0,00554	***	49,829±2,274	0	0,386±0,069	0

0 : $p > 0.05$, fark yok

** : $p < 0.01$, önemli fark var

* : $p < 0.05$, fark var

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

Tablo 4.1.8. 50+10, 100+10, 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları ve bunların kontrol gruplarının TOS, TAC ve OSI ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

GRUPLAR (n=7)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L)	<i>p</i>	TAC ($\mu\text{mol Trolox}$ equivalent/L)	<i>p</i>	OSİ (TOS/TAC)	<i>p</i>
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	**	4,715 $\pm$ 0,0769	***
X. GRUP 50+10 mg/kg CP+Car	6,439 $\pm$ 0,201		185,143 $\pm$ 6,517		2,877 $\pm$ 0,126	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
XI. GRUP 100+10 mg/kg CP+Car	5,649 $\pm$ 0,146		257,143 $\pm$ 5,521		4,554 $\pm$ 0,118	
KONTROL	4,369 $\pm$ 0,0291	***	206 $\pm$ 3,651	***	4,715 $\pm$ 0,0769	***
XII. GRUP 150+10 mg/kg CP+Car	4,617 $\pm$ 0,089		268 $\pm$ 13,266		5,552 $\pm$ 0,444	

0 : $p > 0.05$, fark yok * : $p < 0.05$, fark var

** : $p < 0.01$, önemli fark var *** : $p < 0.001$, ileri derecede önemli fark var

50, 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney grupları kendi aralarında kıyaslandığında özellikle MDA, TOS ve OSİ seviyesinde doz artışına paralel olarak artan toksisite çok belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır (Tablo 4.1.1 ve Tablo 4.1.2).

50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100 mg/kg CP verilen deney grubu MDA, TOS ve OSİ bakımından karşılaştırıldığında; 100 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA seviyesi 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %21, TOS %43 ve OSİ %50 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$). Kreatinin seviyesi 100 mg/kg CP verilen deney grubunda 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %13 oranında artmıştır ($p>0.05$). 100 mg/kg CP verilen deney grubundaki GSH, SOD ve CAT seviyeleri 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre sırasıyla %10, %46 ve %23 oranlarında azalmış ve bu azalma istatistiksel olarak ileri derecede önemli olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). TAC, 100 mg/kg CP verilen deney grubunda %8 oranında azalmıştır.

50 ve 150 mg/kg CP verilen deney grupları MDA, TOS ve OSİ değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında 150 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA seviyesi 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %44, TOS ve OSİ seviyeleri ise sırasıyla %101 ve %246 gibi önemli derecede bir artış göstermiştir ($p<0.001$). 150 mg/kg CP verilen deney grubunda kreatinin seviyesi de 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %13 oranında artmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 150 mg/kg CP verilen deney grubundaki GSH, SOD, CAT ve TAC değerleri 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre sırasıyla %40, %62, %44 ve %30 oranlarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir azalış göstermiştir ($p<0.001$).

150 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA, TOS ve OSİ değerleri 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre sırasıyla %19, %46 ve %127 oranlarında bir artış göstermiştir ($p<0.001$). Kreatinin düzeyi bakımından bu iki grup arasında fark saptanmamıştır ($p>0.05$). 150 mg/kg CP verilen deney grubundaki GSH, SOD ve CAT seviyeleri 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre sırasıyla %33, %31 ve %29 oranlarında önemli bir azalış göstermiştir ($p<0.001$). 150 mg/kg CP verilen deney grubunda TAC, 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %34 azalmıştır ($p<0.001$).

50+5, 100+5, 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır (Tablo 4.1.5 ve Tablo 4.1.6).

100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki MDA seviyesinin 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0.001$). Bu grupta TOS ve OSİ değerleri 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre sırasıyla %42 ve %46 oranlarında artmıştır ($p<0.001$). 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda kreatinin seviyesi 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre yaklaşık %28 oranında yüksek bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). GSH, SOD, CAT ve TAC değeri 100+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre sırasıyla %6, %30 %15 ve %3 oranlarında azalmıştır.

50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu ile 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubu MDA, TOS ve OSİ değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında, MDA değeri 150+5 mg/kg CP+Car verilen grupta 50+5 mg/kg CP+Car verilen gruba göre %13 oranında artarken TOS ve OSİ değerleri sırasıyla %60 ve %75 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$). Kreatinin seviyesi bakımından bu iki grup kıyaslandığında ise 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki kreatinin düzeyi 50+5 mg/kg CP+Car verilen gruba göre artmış (%25) ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruptaki GSH, SOD CAT ve TAC değerlerinin 50+5 mg/kg CP+Car verilen gruba göre sırasıyla %16, %49, %40 ve %9 oranlarında düştüğü saptanmıştır ($p<0.001$).

150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki MDA düzeyi 100+5 mg/kg CP+Car verilen gruba oranla yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Bu iki grup arasında kreatinin miktarı bakımından anlamlı bir fark yokken ($p>0.05$) TOS ve OSİ değerleri 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda 100+5 mg/kg CP+Car verilen gruba göre sırasıyla %12 ve %75 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$). 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruptaki GSH (%10), SOD (%28) CAT (%29) ve TAC (%9) değerleri 100+5 mg/kg CP+Car verilen gruba göre azalmıştır.

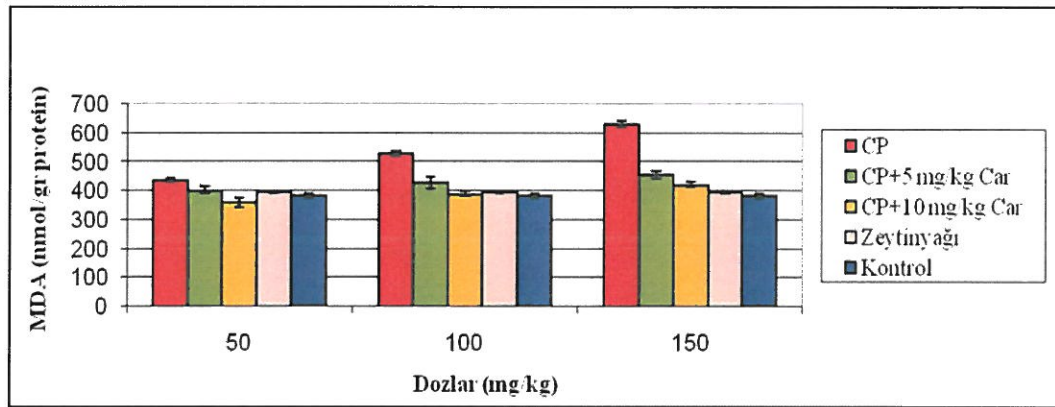
50+10 mg/kg CP+Car, 100+10 mg/kg CP+Car ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.1.7 ve Tablo 4.1.8).

50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu ile 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubu MDA düzeyi bakımından karşılaştırıldıklarında 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda MDA seviyesindeki artış istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir fark olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). TOS ve OSİ değerleri 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre sırasıyla %39 ve %58 oranlarında artmıştır ($p<0.001$). Kreatinin seviyesi bakımından bu iki grup arasında farka rastlanmamıştır ($p>0.05$). 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki GSH, SOD, CAT ve TAC değerleri 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre sırasıyla %5, %3, %26 ve %12 oranlarında azalmıştır.

150+10 mg/kg CP+Car verilen grupta GSH, SOD, CAT ve TAC değerlerinin 50+10 mg/kg CP+Car verilen gruba göre sırasıyla %14, %25, %37 ve %29 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki MDA düzeyi 50+10 mg/kg CP+Car verilen gruba göre %17, TOS ve OSİ değerleri ise sırasıyla %45 ve %93 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$). Kreatinin seviyesi 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda 50+10 mg/kg CP+Car verilen gruba göre %16 oranında azalmış ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki MDA düzeyi 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu gruplar arasında TOS %1, OSİ ise %22 oranlarında artış göstermiştir. Kreatinin seviyesi 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubunda %21 oranında azalmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0.05$). 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki GSH, SOD, CAT ve TAC miktarları 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grubuna göre sırasıyla %9, %23, %15 ve %18 oranında azalmıştır.

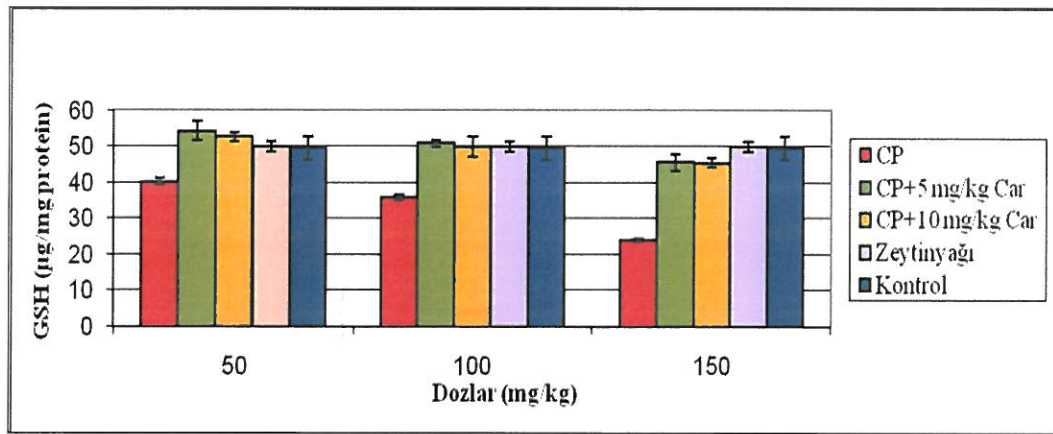
Bütün deney grupları MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS ve OSİ değerleri bakımından ayrı ayrı karşılaştırılmış; MDA, GSH, SOD, CAT, kreatinin, TAC, TOS ve OSİ değerleri ayrıca grafiksel olarak da gösterilmiştir.



Şekil 4.1.1. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının MDA seviyeleri.

Şekil 4.1.1’de de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları MDA değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün 5 ve 10 mg/kg’lık dozları MDA seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları MDA değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde MDA değeri kontrol grubuna göre ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar

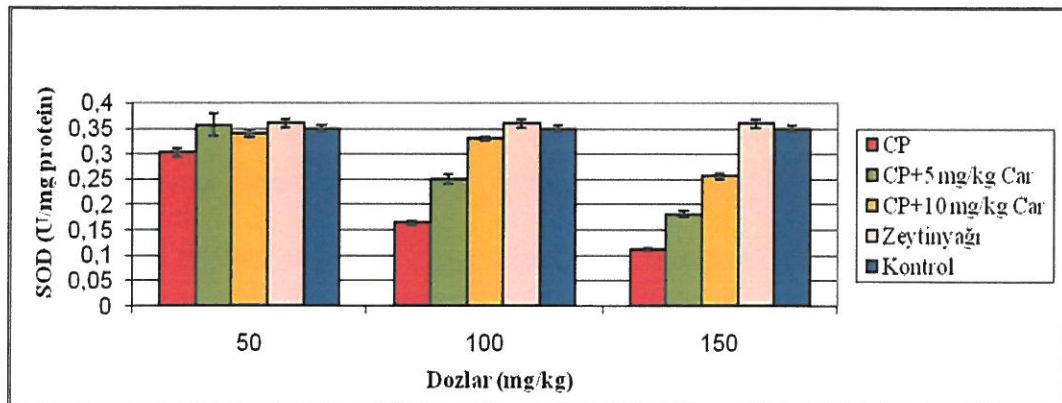
ve kontrol grupları MDA değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde, kontrol grubuna göre MDA değeri bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). Şekil 4.1.1’de görüldüğü gibi, CP nedenli doz artışına paralel olarak artan toksisite Car’ün 5 mg/kg’lık dozunda artarken 10 mg/kg Car dozu MDA seviyesini kontrole yaklaştırmıştır.



Şekil 4.1.2. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının GSH seviyeleri.

Şekil 4.1.2’de de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları GSH değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre GSH düzeyi bakımından ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün 5 ve 10 mg/kg’lık dozları GSH seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır. 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve

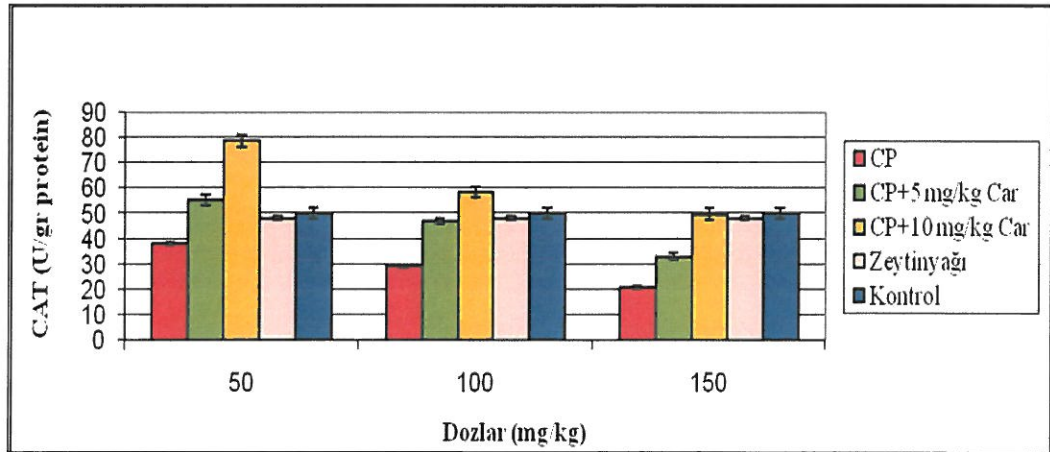
kontrol grupları GSH değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre GSH değeri bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün her iki dozunda da GSH kontrol seviyesindedir. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları GSH değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde, kontrol grubuna göre GSH değeri bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). Şekil 4.1.2'de görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 5 ve 10 mg/kg'lık dozları GSH seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır.



Şekil 4.1.3. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının SOD seviyeleri.

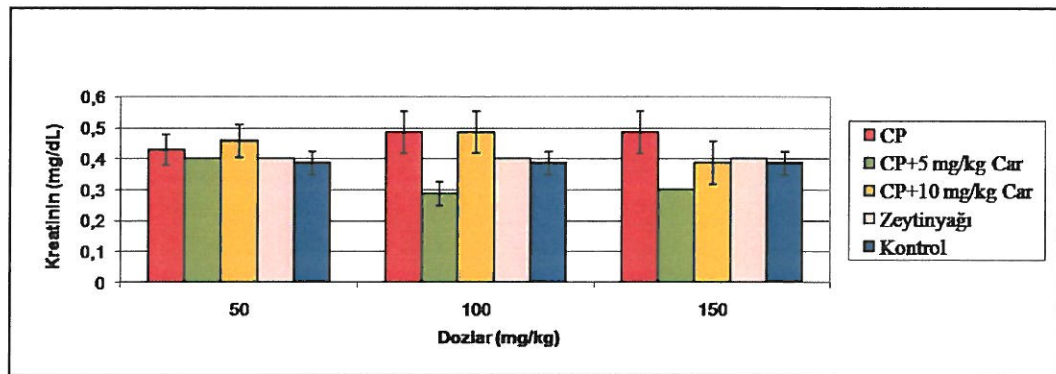
Şekil 4.1.3'te de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları SOD değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan

ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 5 ve 10 mg/kg'lık dozları SOD seviyesini kontrol düzeyine yaklaştırmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları SOD değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre SOD düzeyi bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozu 5 mg/kg'lık doza göre daha etkili olmuş, SOD seviyesini kontrole yaklaştırmıştır. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları SOD değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.1.3'te görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün her iki dozunda da SOD seviyesi artarken 150 mg/kg CP ile birlikte uygulanan 10 mg/kg Car, SOD seviyesini artırmada daha etkili olmuştur.



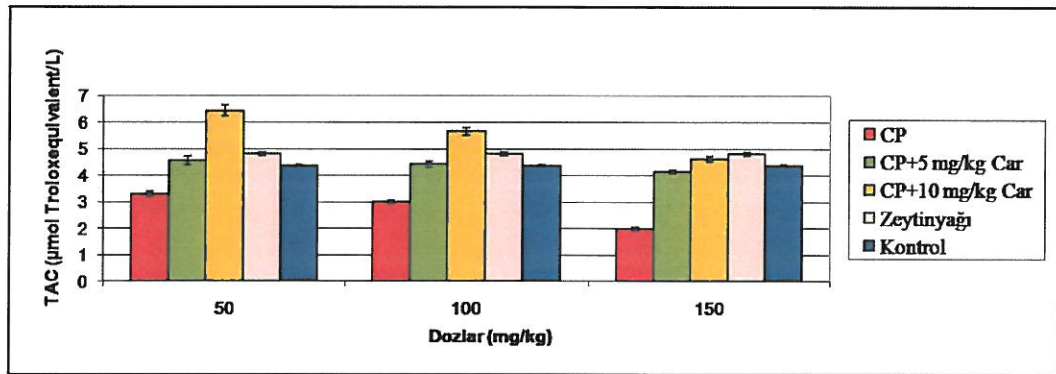
Şekil 4.1.4. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının CAT seviyeleri.

Şekil 4.1.4'te de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları CAT değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 5 ve 10 mg/kg'lık dozları CAT seviyesini kontrol grubunun bile üzerine çıkarmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları CAT değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozunda CAT düzeyi kontrolden yüksek bulunurken, 5 mg/kg'lık doz da CAT seviyesini kontrole yaklaştırmıştır. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları CAT değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.1.4'te görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün her iki dozunda da CAT seviyesi artarken 150 mg/kg CP ile birlikte uygulanan 10 mg/kg Car'de CAT seviyesi kontrol düzeyindedir.



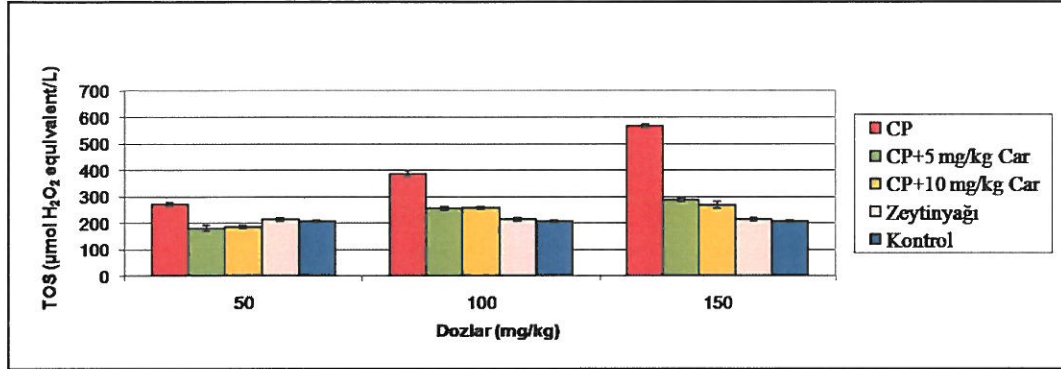
Şekil 4.1.5. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının kreatinin seviyeleri.

Şekil 4.1.5'te de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları kreatinin değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan fark görülmemiştir ($p>0.05$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozları kreatinin seviyesini kontrol grubunun bile üzerine çıkarmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları kreatinin değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozunda kreatinin düzeyi kontrolden yüksek bulunurken 5 mg/kg'lık dozda kontrole göre düşük bulunmuştur. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları kreatinin değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.1.5'te görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozunda kreatinin seviyesi kontrol düzeyinde iken, 5 mg/kg'lık Car dozunda kreatinin düzeyi kontrolün altına düşmüştür.



Şekil 4.1.6. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen gruplar, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının TAC değerleri.

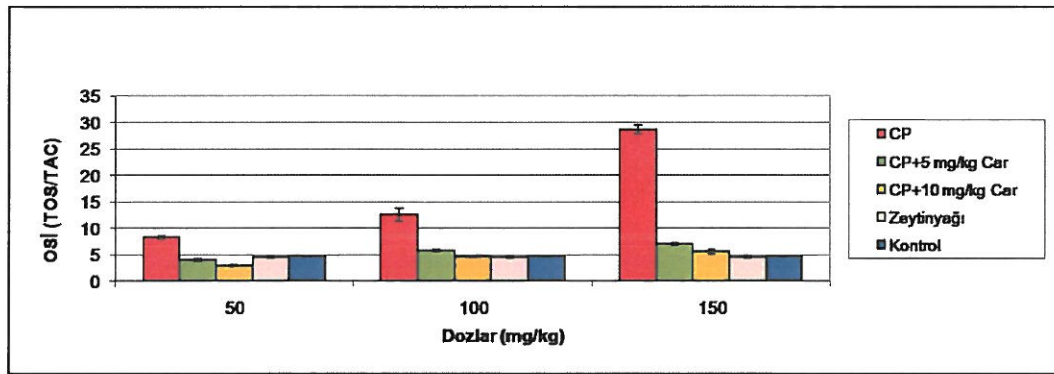
Şekil 4.1.6'da da görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları TAC değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre TAC bakımından ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozlarında TAC kontrol grubunun bile üzerine çıkarmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları TAC değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 100+5 mg/kg CP+Car grubu dışında bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre TAC değeri bakımından ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün 10 mg/kg'lık dozunda TAC değeri kontrole göre oldukça yüksek bulunurken 5 mg/kg'lık doz da kontrol seviyesine yaklaşmıştır. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları TAC değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.1.6'da görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car'ün her iki dozunda da TAC değeri kontrole oldukça yaklaşmıştır.



Şekil 4.1.7. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen grupları, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının TOS değerleri.

Şekil 4.1.7’de de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları TOS değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsi kontrol grubuna göre TOS bakımından ileri derecede önemli bir fark göstermiştir ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün 5 ve 10 mg/kg’lık her iki dozunda da TOS kontrole göre azalmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları TOS değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre TOS bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün her iki dozunda da TOS değeri kontrolden biraz yüksek çıkmıştır. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları TOS değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur. ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde, kontrol grubuna göre TOS değeri bakımından

ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). Şekil 4.1.7’de görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün her iki dozunda da TOS değeri kontrol seviyesinin biraz üstüne çıkmış ancak toksisite önemli ölçüde azaltılmıştır ($p<0.001$).



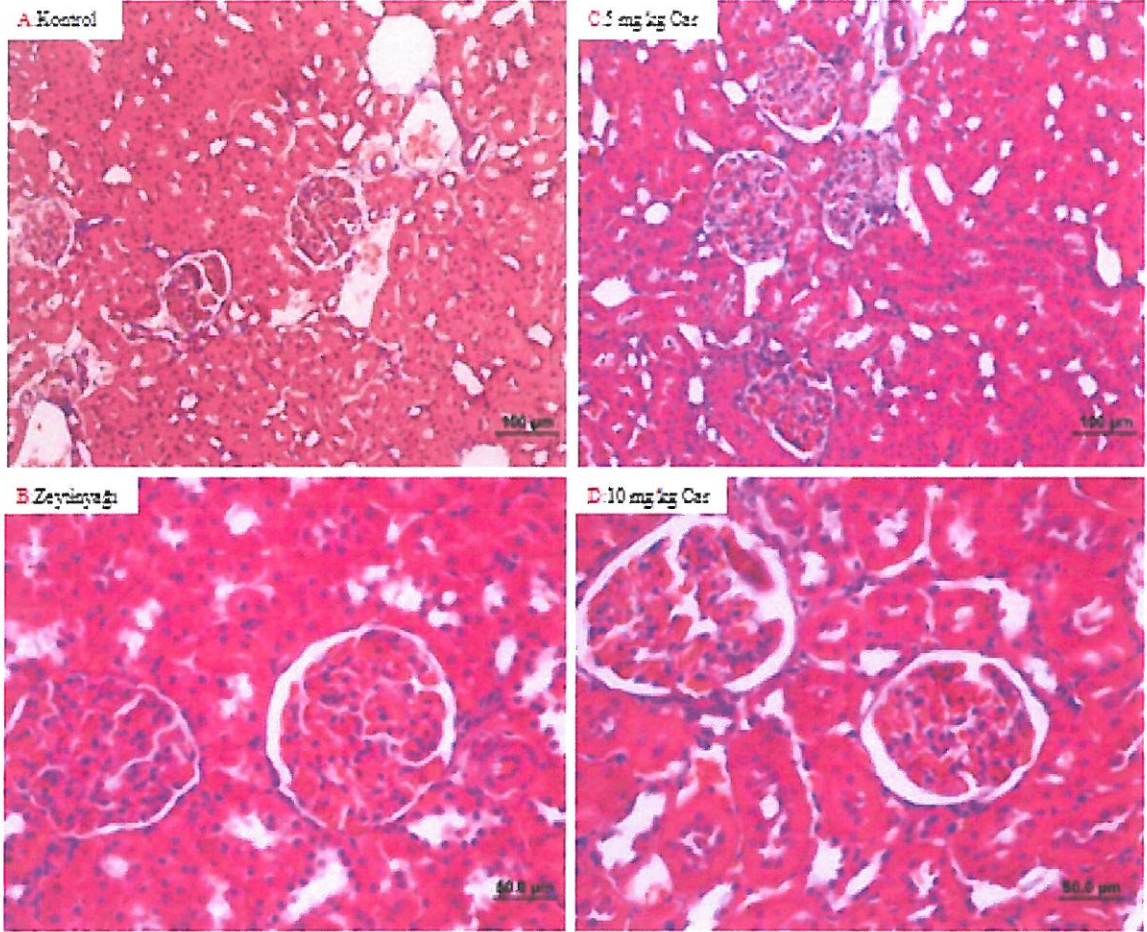
Şekil 4.1.8. 50-100-150 mg/kg CP verilen deney grupları, 50+5, 100+5 ve 150+5 mg/kg CP+Car verilen grupları, 50+10, 100+10 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen deney grupları ve 0.5 mL sf verilen kontrol gruplarının OSİ değerleri.

Şekil 4.1.8’de de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu ile 50+5 ve 50+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve 0.5 mL sf verilen kontrol grupları OSİ değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). 50 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün 5 ve 10 mg/kg’lık her iki dozunda da OSİ değeri kontrol düzeyinin altındadır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP verilen deney grubu ile 100+5 ve 100+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları OSİ değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Bu deney gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre OSİ bakımından ileri derecede önemli bir fark saptanmıştır ($p<0.001$). 100 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün 5 mg/kg’lık dozunda OSİ değeri kontrol seviyesinin biraz üstüne

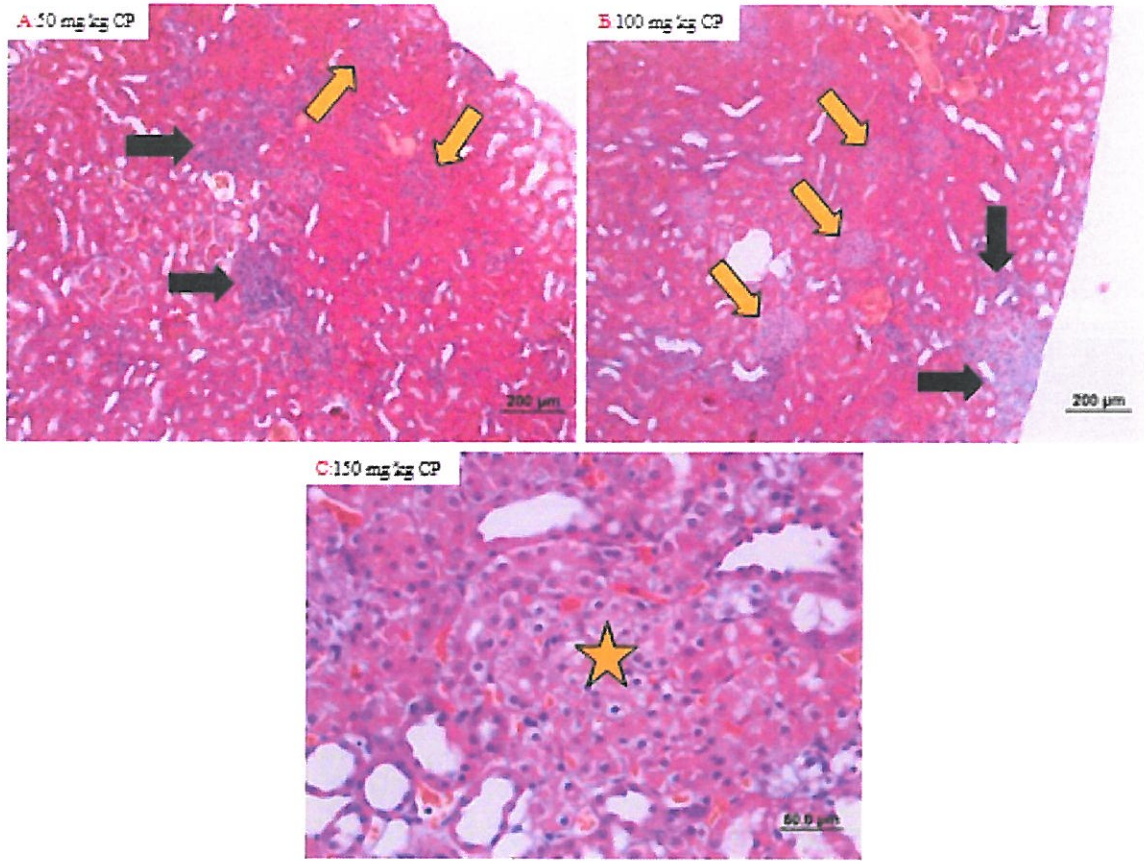
çıkmuştur. 150 mg/kg CP verilen deney grubu ile 150+5 ve 150+10 mg/kg CP+Car verilen deney grupları, 0.5 mL zeytinyağı verilen gruplar ve kontrol grupları OSİ değerleri bakımından karşılaştırıldıklarında istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.1.8’de de görüldüğü gibi, 150 mg/kg CP ile birlikte verilen Car’ün her iki dozunda da OSİ değeri kontrolün biraz üstüne çıkmış ancak toksisite önemli ölçüde azaltılmıştır ($p<0.001$).

4.2. Histolojik Bulgular

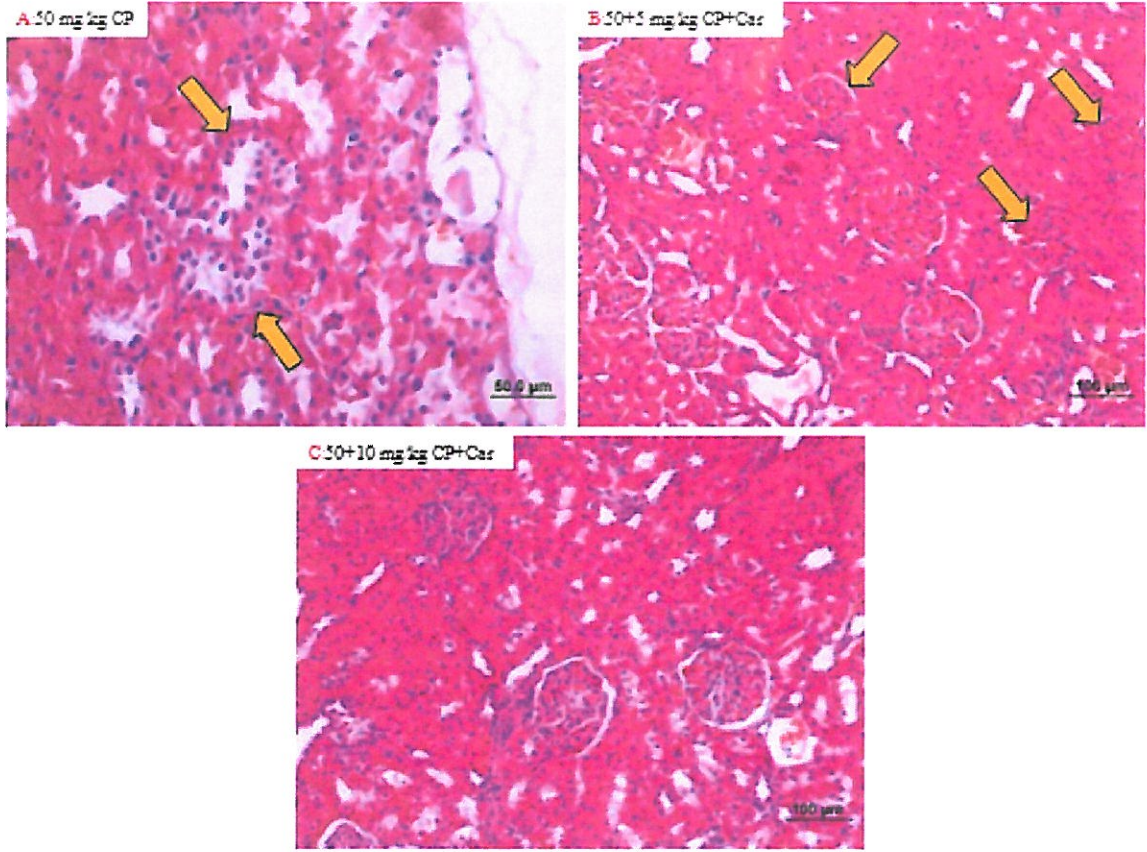
Histolojik inceleme sonuçlarına göre; verilen CP dozu arttıkça böbreklerde hasarın (tübüler nekroz, inflamasyon gibi) arttığı, ancak 100 ve 150 mg/kg CP dozları arasında hasar bakımından belirgin bir fark olmadığı saptandı. Aynı dozda verilen CP grupları kıyaslandığında; 50 mg/kg CP gruplarında ek olarak 5 mg/kg Car verildiğinde belirgin bir düzelme görülmesi de 10 mg/kg Car verildiğinde hasarın azaldığı dikkati çekti. 100 mg/kg CP gruplarında da 50 mg/kg CP gruplarına benzer bir durum görüldü. Ancak, 150 mg/kg CP gruplarında 5 mg/kg Car ve 10 mg/kg Car eklenmesinin hasar durumunu çok az değiştirdiği saptandı.



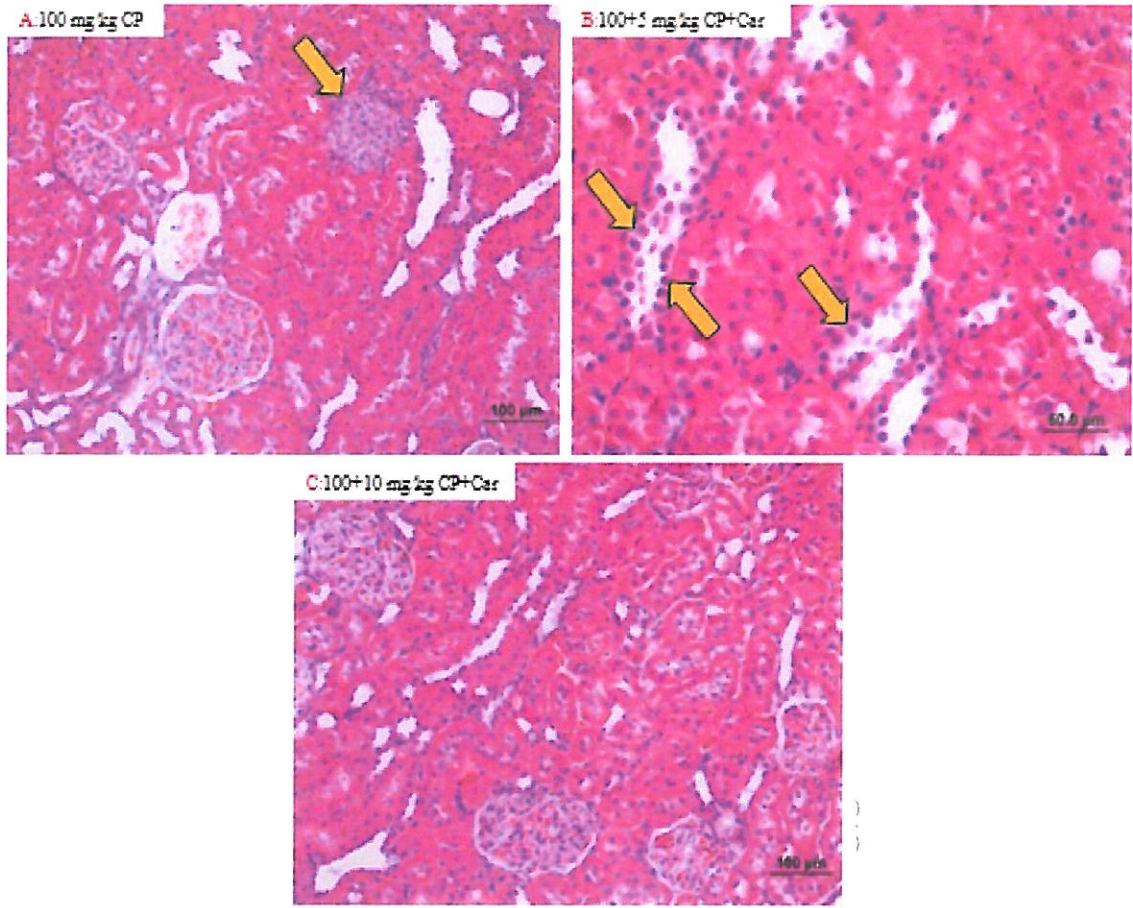
Şekil 4.2.1. Kontrol gruplarına ait böbrek kesitleri, H+E. **A:** Sadece serum fizyolojik verilen grupta, **B:** 0.5 mL zeytinyağı verilen grupta, **C:** Sadece 5 mg/kg Car verilen grupta, **D:** Sadece 10 mg/kg Car verilen grupta normal histolojiye sahip böbrek kesitleri izlenmektedir.



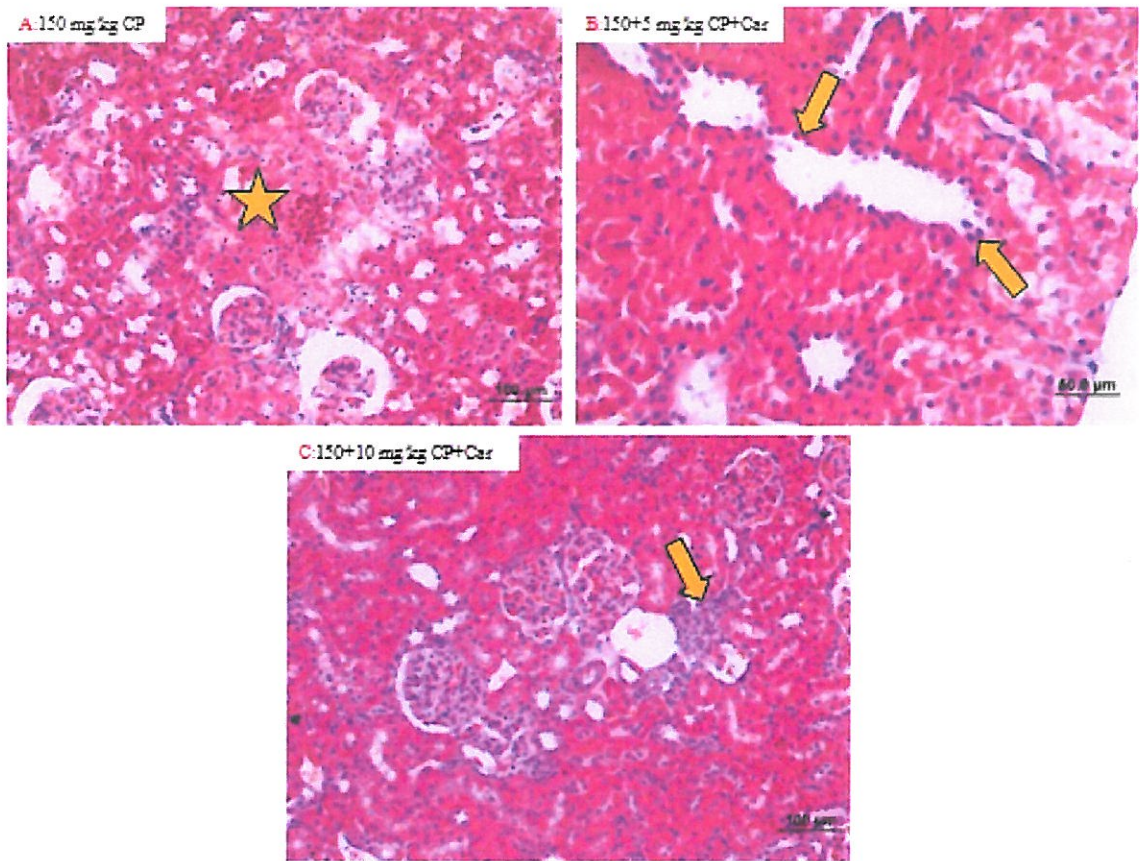
Şekil 4.2.2. Farklı dozlarda CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri, H+E. **A:** 50 mg/kg CP grubunda mononükleer hücre infiltrasyon bölgeleri (→), Bowman kapsül aralığında daralma (⇨) ve tübüler hücrelerde değişik derecelerde hasarlanma, **B:** 100 mg/kg CP grubunda benzer bulgular, **C:** 150 mg/kg CP grubunda tübüler epitel hücrelerinin sitoplazmalarında vakuolleşme, çekirdeklerinde küçülme ve koyulaşma görülen tübüller (★) izlenmektedir.



Şekil 4.2.3. 50 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri, H+E. **A:** Tek başına 50 mg/kg CP verilen grupta bazı tübüllere ait hücrelerde sitoplazma ve çekirdek hasarları (➡), **B:** 5 mg/kg Car eklenen grupta Bowman kapsül aralığında daralma (➡), **C:** 10 mg/kg Car eklenen grupta böbrek cisimleri ve tübüllerde normale yakın bir görünüm izlenmektedir.



Şekil 4.2.4. 100 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri, H+E. **A:** Tek başına 100 mg/kg CP verilen grupta bazı tübüllerin epitelinde hasarlar ile sağ üst bölgedeki glomerülde küçülme ve hücrelerinde yoğunlaşma (➡), **B:** 5 mg/kg Car eklenen grupta bazı tübüllerin epitel hücrelerinde lümene dökülme (➡), **C:** 10 mg/kg Car eklenen grupta böbrek cisimleri ve tübüllerde genelde normale yakın bir görünüm izlenmektedir.



Şekil 4.2.5. 150 mg/kg CP verilen gruplara ait böbrek kesitleri, H+E. **A:** Tek başına 150 mg/kg CP verilen grupta bazı tübüllerde tamamen dağılma ve inflamasyon (☆), **B:** 5 mg/kg Car eklenen grupta bazı tübüllerin epitel hücrelerinde lümene dökülme (→), **C:** 10 mg/kg Car eklenen grupta inflamasyon bölgesi izlenmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Siklofosfamid (CP) kanser ve malignant olmayan hastalıkların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış geniş klinik kullanımlı alkilleyici kemoterapötik bir ilaçtır. CP'nin antitümoral etkinliği, yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır. Ancak yüksek doz CP'nin klinik yararlanımı ürotoksisite ve nefrotoksisite nedeniyle sınırlıdır [Perini et al., 2007; Sugumar et al., 2007; Abraham and Isaac, 2011]. CP'nin nefrotoksik mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak tübül hücrelerinde oksidatif strese neden olarak serbest radikal (SOR) ve lipid peroksidasyonu oluşumuna yol açtığı öne sürülmektedir [Ghosh et al., 1999; Atessahin et al., 2003; Senthilkumar et al., 2006].

Çalışmamızda CP'nin böbrekteki toksik etkisini ve dolayısı ile koruyucu ajana (Car) bağlı olarak gelişen değişiklikleri belirlemek için oksidatif stresin başlıca belirteci olan malondialdehid (MDA) düzeyleri, böbrekte glomerular fonksiyonun göstergesi olan plazma kreatinin seviyeleri ve oksidatif hasara karşı dokuları koruyan antioksidan (AO) enzimler olan glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) parametreleri ile birlikte böbrek dokusu histolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca antioksidatif ve oksidatif durumu saptamada daha değerli bilgiler verdiği düşünülen toplam AO kapasitesi (TAC), toplam oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) ölçümleri de yapılmıştır. Deneysel nefrotoksisite modellerinde genellikle CP'nin 100 ve 150 mg/kg'lık dozları kullanılmakta ve hayvanlar CP enjeksiyonundan 6-72 saat sonra sakrifiye edilmektedir [Ayhanci et al., 2010; Abraham and Rabi, 2011]. Bizim çalışmamızda ise CP'nin 50, 100 ve 150 mg/kg'lık dozları kullanılarak hayvanlar CP uygulamasından 72 saat sonra sakrifiye edilmiştir.

Oksidatif stres SOR miktarındaki artışla seyreden bir durumdur. Bu artış zarlarda lipid peroksidasyonuna neden olur. SOR'lar aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücre zarı hasarının önemli bir nedenidir, zar geçirgenliğini etkileyerek hücre içinde aşırı kalsiyum (Ca^{+2}) birikimine yol açar. Hücre zarının yapısının bozulması da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır. MDA, lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır. Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması SOR'ların arttığını gösterir. SOR üretiminin artması dokuda MDA birikimine neden olur [Akkuş, 1995; Virag et al., 2003]. CP'nin indüklediği renal

hasarda oksidatif stres sonucu böbrek dokusunda MDA seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir [Ghosh et al., 1999; Senthilkumar et al., 2006; Ayhanci et al., 2010; Abraham and Rabi, 2011]. Bizim çalışmamızda da böbrek dokusunda MDA düzeyi 50, 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarında doz artışına paralel olarak sırasıyla %14, %38 ve %65 oranlarında artış göstermiştir ($p<0.001$). Artan CP dozuna bağlı olarak MDA düzeyinin yükselmesi böbrek dokusunda oluşan CP nedenli oksidatif hasarın göstergesi olabilir.

Ksenobiyotik nedenli böbrek fonksiyon değişimleri idrar volümünün değişmesi, kreatinin klirensi, GSH, SOD ve CAT düzeyi gibi hasar göstergeleri tarafından belirlenir. Oksidatif strese neden olan SOR oluşumu nefrotoksisiteye neden olan kimyasalların bu toksisitenin oluşmasında başlıca patojenik mekanizmalarından biri olarak düşünülmektedir [Atessahin et al., 2003; Ayhanci et al., 2010]. Çalışmamızda sadece CP uygulanması nefrotoksisiteye neden olmuştur; düşük AO aktivitesi (GSH, SOD, CAT azalması) ile birlikte saptadığımız histolojik değişimler de bunu kanıtlamaktadır (Tablo 4.1.1). Nitekim sadece 50, 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarında doz artışına paralel olarak GSH seviyeleri sırasıyla %19, %27 ve %52 oranlarında, SOD seviyeleri %14, %53 ve %58 oranında ve CAT seviyeleri ise sırasıyla %24, %42 ve %58 oranlarında azalmıştır. Bu parametrelerdeki değişiklikler böbreğin CP kemoterapisi sırasında hasarlandığını göstermektedir. 150 mg/kg CP verdiğimiz sıçanlarda 50 ve 100 mg/kg CP verilen gruplara göre ortaya çıkan hasar böbreğin CP varlığında gördüğü zararın doza bağlı olduğu anlamına gelebilir.

Nefrotoksisite serum kreatinin konsantrasyonunun plazmada normal seviyenin üstüne çıkması (≥ 0.5 mg/dl) olarak tanımlanır [Cagler et al., 2002]. Sıçanlarla yapılan bir deneyde CP'nin düşük dozlarda plazma kreatinin seviyesine etki etmediği ve renal hasara neden olmadığı tespit edilmiştir [Sugumar et al., 2007]. Yapılan diğer bir çalışmada ise uzun süreli ve düşük dozlarda uygulanan CP'nin kreatinin seviyesine etki etmediği görülmüş ancak yapılan histolojik incelemelerde lizozomal enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüşe neden olarak renal toksisiteye (glomerular nefrit ve interstisyel ödem) yol açtığı ortaya konmuştur [Abraham and Isaac, 2011]. Bizim çalışmamızda da en düşük doz olarak kullandığımız 50 mg/kg CP plazma kreatinin seviyesinde %11 oranında artışa neden olmuştur ($p>0.05$). Bu dozdaki histolojik incelemelerimiz araştırmacılar tarafından ortaya çıkarılan bulgulara benzemektedir. Abraham ve Rabi

(2011) tarafından yapılan çalışmada ise intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan 150 mg/kg CP'nin plazma kreatinin seviyesinde değişmeye neden olmadığı ancak histolojik incelemelerde renal hasara rastlandığı bildirilmiştir. Bizim deneysel bulgularımızda da böbrek dokusunda kreatinin seviyesindeki artış 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarında %26 civarındadır (Tablo 4.1.1 ve Şekil 4.1.5). Nitekim histolojik inceleme sonuçlarımıza göre; CP dozu arttıkça böbreklerde hasarın (tübüler nekroz, inflamasyon gibi) arttığı, ancak 100 ve 150 mg/kg CP dozları arasında hasar bakımından belirgin bir fark olmadığı saptanmıştır.

Abraham ve Isaac (2011) tarafından yapılan bir çalışmada sıçan böbreğinde i.p. olarak uygulanan tek doz CP'nin (150 mg/kg) morfolojik değişikliklere neden olarak (glomerulus bazal zarında incelleme, birçok podositin bozulması, peroksizom artışı, nekroz, ödem ve lizozom azalışı) renal hasara yol açtığı tespit edilmiştir. Yapılan deneysel bir çalışmada erkek sıçanlara i.p olarak tek doz uygulanan CP'nin (222 mg/kg) renal papiller nekroza (RPN) neden olduğu bildirilmiştir. Daha sonraları CP'nin nefrotoksisiteye neden olduğuna dair bir kaç çalışma daha yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde uzun süreli CP kullanımının renal tübüler nekroza, glomerular değişikliklere ve lizozomal enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüşe neden olarak renal hasara yol açtığından bahsedilmiştir [Lavin and Koss, 1971; Abraham et al., 2007]. 10 günlük yüksek doz CP uygulamasının ölümlerle bile sonuçlanabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [Gharib and Burnett, 2002]. Ancak CP'nin akut böbrek hasarına neden olduğuna dair yapılan çalışma sayısı çok azdır. Yapılan bazı çalışmalarda 6, 12, 24 ve 48 saat sonra anestezi edilen sıçanlarda 150 mg/kg CP uygulamasının böbrek dokusundaki hasarı çok fazla artırdığı kaydedilmiştir [Al Salloum, 2003; Senthilkumar et al., 2006; Cayir et al., 2009]. Bizim çalışmamızda da yaptığımız histolojik incelemelerde böbrek dokusunda gözlenen hasarın beklenenden az olması CP toksisitesinin akut olduğu anlamına gelebilir. Nitekim biyokimyasal parametrelerde saptadığımız artmış MDA ve kreatinin düzeyleri ve azalmış AO seviyeleri (GSH, SOD, CAT) böbrek hasarını çok net bir şekilde ortaya koymuştur. Sıçanlar CP uygulamasından 3 gün sonra anestezi edilmiştir. Bu süre içerisinde böbrek dokusu kendisini onarmış olabilir.

CP karaciğerde hidrksillenerek metabolitleri olan fosforamid mustard (PAM) ve akroleine (ACR) dönüşmektedir. CP'nin antineoplastik etkileri PAM ile ilişkilidir.

PAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR'nin böbrekten atılmasıyla yan etkiler ortaya çıkmaktadır. ACR doku AO savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda SOR oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir. ACR idrarda yüksek konsantrasyonlara ulaşır, mesane epiteli ve böbrek tübüllerinde toksik bir maddeye dönüşür ve CP'nin klinik olarak kullanımının sınırlandırılmasına neden olur [Kawabata et al., 1990; Masuda et al., 2006]. Son yapılan çalışmalar CP'nin toksik etkilerinin ortaya çıkması için artmış nitrik oksit (NO) üretimine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir [Kurowski and Wagner, 1997; Korkmaz et al., 2003; Oter et al., 2004]. ACR üroepitelyumu geçerek ve bazı reaktif oksijen türlerini uyararak etkisini gösterdiği gibi nitrik oksit sentaz (NOS) üzerinden NO seviyelerini artırarak da gösterir [Korkmaz et al., 2007]. NO birçok önemli fizyolojik ve fizyopatolojik süreci düzenleyen SOR öncülü bir üründür. L-arjininden NOS yoluyla sentez edilmektedir ve NOS'un 3 tipi vardır. Endotelial NOS (eNOS) endotelial hücrelerden ve fibroblastlardan sentez edilir ve ana olarak vazodilatasyondan sorumludur. Sinir sisteminde üretilen nöronal NOS (nNOS) sinirsel sinyalizasyonda görev alan bir enzimdir. İndüklenebilir NOS (iNOS), lökosit ve makrofajlarda sentezlenir. Genel olarak patolojik durumlarda sentezlenen iNOS'un aktivasyonu ile eNOS aktivasyonundan çok daha fazla NO üretilir [Szabo, 1996]. Ayrıca ACR'nin tetiklediği mekanizmalar sonucunda interlökin- α , TNF- β , platelet aktive edici faktör, COX-2 ve güçlü bir oksidan olan peroksinitrit seviyeleri artmaktadır [Kiuchi et al., 2009; Korkmaz et al., 2005]. Özellikle aşırı miktarlardaki NO ve O₂'nin reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit oksidan strese neden olan ve doku hasarı ile sonuçlanan inflamatuvar süreçle ilgilidir [Szabo, 1996; Förstermann et al., 1991]. SOR'ların inflamatuvar süreç içerisinde aşırı üretimi oksidatif strese neden olur ve bu da hücresel ve DNA hasarlanması, protein denatürasyonu ve zar lipidlerinde peroksidasyonu da içeren mekanizmalar yoluyla nekroza yol açar [Ribeiro et al., 1998]. Bizim çalışmamızda da böbrekte CP dozunun artışına paralel olarak giderek artan oranda inflamasyon, epitel hasarı, kanama ve tübül nekroz saptanması araştırmacılar tarafından ileri sürülen bulguları desteklemektedir. Bu toksisite muhtemelen reaktif nitrojen radikalleri ile ilişkilidir.

SOR'lar; ortaklanmamış elektron içeren, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir. Birçok hastalık, doku yıkımı, SOR'lar ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşur. Organizmada SOR reaksiyonları birçok AO sistemi ile kontrol edilir. AO'lar SOR oluşumunu önleyen veya zincir kıran yapılar olarak iş görürler. SOR'ların oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi bazı endojen AO enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, SOR'lar zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres şeklinde etkilerini gösterirler [Kurt et al., 2005]. Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR'nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda AO'ların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişimini önlediklerini göstermiştir [İşcan ve Çoban 1998].

Böbrekte SOR kaynaklı toksisitelerin azaltılması için yapılan birçok çalışmada sodyumtiyosülfat, mesna ve procainamide gibi sülfür içeren birçok bileşiğin glutatyon düzeyini artırarak böbrekte CP toksisitesini azaltmada etkili olduğu saptanmıştır. Ancak bu bileşikler etkinliklerinin yetersizliği yüzünden geniş klinik kullanımlar için onaylanmamaktadır. Bu bileşikler aynı zamanda tümör dokusunda alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan toksisiteye karşı sitoprotektivitede seçici değildirler [Atessahin et al., 2003; Ayhanci et al., 2010; Senthilkumar et al., 2006]. Bu yüzden tümör koruyucu ve tümör büyümesini uyarıcı özellikler olmaksızın normal dokuları kemoterapi nedenli toksisitelerden koruyabilecek yeni ajanlara ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda doğal fenolik bileşiklerin bedende oynadıkları rolün önemi açısından yapılan birçok deneysel ve klinik çalışmalar, Car gibi bazı fenolik bileşiklerin hücre koruyucu etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kekik yağının ana bileşeni olan Car bir monoterpenik fenoldür. Car'ün lipozom fosfolipitlerinin peroksidasyonunu baskıladığı ve çeşitli sentetik AO'lardan çok daha yüksek bir AO aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda Car açısından zengin esansiyel yağların askorbik asit, butil hidroksil toluen (BHT) ve vitamin E'ye eşdeğer özellikte AO aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [Aeschbach et al., 1994; Mastelic et al., 2008]. Birçok AO

antikarsinojenik etki gösterdiği için [Karkabounas et al., 2002] Car da benzer bir etki gösteriyor olabilir. Car'ün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, A549, kronik myeloid lösemi, K562, murin B16 melanoma, insanda görülen metastatik göğüs kanseri hücre dizisi ve MDA-MB 231 üzerinde antiproliferatif özellikleri gösteriyor olması olasıdır [He et al., 1997; Horvathova et al., 2007; Arunasree, 2010].

Bugüne kadar sıçanlarda CP'nin indüklediği renal hasarı engellemek amacıyla pek çok AO denenmiştir [Ghosh et al., 1999; Abraham et al., 2007; Ayhanci et al., 2010]. Literatür taramalarımızda sıçanlarda CP'nin indüklediği nefrotoksisite modellerinde Car uygulanan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma sıçanlarda CP ile indüklenen renal toksisiteyi önlemede Car ile yapılan ilk çalışmadır.

Birçok deneysel ve klinik çalışmada Car'ün antimikrobiyal, antitümör, antimutajenik, analjezik, antispazmodik, antiinflamatuvar, antiangiogenik, antiparazitik, antiplatelet, antihepatotoksik, antiaging ve hepatoprotektif aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Car ayrıca gıda katkı maddesi olarak gıdaların korunmasında da kullanılmaktadır [Ipek et al., 2005; Baser, 2008]. 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; Sokmen et al., 2004]. *Origanum vulgare*' de yüksek oranda bulunan Car ile timol 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]. Öte yandan Car'ün subakut, kronik toksisitesi ile üreme sağlığı üzerine ve teratojenik etkilerine yönelik veri bulunmamaktadır [De Vincenzi et al., 2004]. Car'ün akciğer kanserinde güçlü antikanserojen etkiye sahip olduğu, sıçanlarla yapılan deneylerde gösterilmişse de bu etki henüz klinik çalışmalarla kanıtlanmış değildir [Baser, 2008]. Mehdi ve ark., (2011) insan servikal kanser hücrelerinde Car'ün sitotoksik etkisini araştırmışlar ve bu bileşiğin kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkiye sahip olabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda sadece CP verilerek toksisite oluşturulan tüm gruplarda GSH, SOD, CAT ve TAC aktivitesinde ileri derecede önemli bir azalma saptanmıştır. Böbrek dokusundaki AO aktivitesindeki bu azalma, oksidatif stresin arttığını gösterir. Böylece CAT aktivite azalışı endojen H₂O₂ artışı ile birlikte olan yüksek derecede oksidatif stresin belirtici olabilir. 50+5 mg/kg CP+Car verilen deney grubundaki TOS seviyesi

%13, OSİ seviyesi ise %16 oranlarında kontrol grubuna göre önemli oranda azalmıştır ($p<0.001$). Bu gruptaki GSH, CAT ve TAC düzeyleri kontrol grubuna göre sırasıyla %1 %10 ve %4 oranlarında artmıştır. Böbrekteki bu koruma büyük olasılıkla ACR' nin neden olduğu SOR artışının ve buna bağlı olarak gelişen böbrek hasarının Car varlığında AO enzim aktivitelerini artırılarak SOR'ların önemli ölçüde yok edilmesiyle açıklanabilir. Diğer taraftan 150+5 mg/kg CP+Car verilen deney gruplarında, 5 mg/kg Car TAC'ı %5' lik bir oranda artırarak koruma sağlamıştır. CP ile birlikte Car'ün her iki dozunun (5 ve 10 mg/kg) uygulandığı tüm gruplarda endojen AO (GSH ve CAT) aktivitesinde belirgin artış saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. SOD enzim seviyesinde de düşme olsa da istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. 10 mg/kg Car ise aynı dozdaki CP toksisitesini 5 mg/kg Car'den daha az korumakla birlikte sadece 50 mg/kg CP alan deney grubundan daha iyi korumuştur. Bu sonuç, düşük doz CP ile birlikte düşük doz Car (5 mg/kg) ve yüksek doz CP ile birlikte ise yüksek doz Car (10 mg/kg)' un daha koruyucu olduğu anlamına gelebilir.

Bizim çalışmamızda oksidatif stresin göstergesi olan TOS, 50-100 ve 150 mg/kg CP uyguladığımız sıçanların böbrek dokularında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (her üçü için $p<0.001$). Yine benzer şekilde böbrek dokusu OSİ düzeyleri kontrol grubuna göre sadece CP uyguladığımız gruplarda daha yüksekti ($p<0.001$). Bu bulgular CP'nin her üç dozunun da oksidatif stresi artırdığı verisini desteklemektedir. AO kapasiteyi yansıtan TAC düzeyleri CP+Car uyguladığımız her üç grupta da sadece CP uyguladığımız gruplara göre yüksek bulundu ($p<0.001$). Yine AO enzimler olan GSH, SOD ve CAT düzeyleri CP ile birlikte Car uyguladığımız gruplarda daha yüksekti. AO kapasite ve AO enzimlerin artışı böbrek hasarı sonrası oluşan oksidatif stresi azaltmak için gelişen yanıt olarak değerlendirildi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, uyguladığımız CP dozları böbrekte lipid peroksidasyonunu artırmış, Car ise AO seviyeyi artırarak CP'ye bağlı böbrek hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir. Hücre zarlarında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna neden olan oksidanların etkisinin Car verilmesi ile azaldığını gösteren bu sonuç Car'ün AO etkisini destekler niteliktedir. Sonuçlarımız literatür bilgilerini doğrulamaktadır ancak bu konuda daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiğine inanıyoruz.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham P, Isaac B (2011) Ultrastructural Changes in the Rat Kidney After Single Dose of Cyclophosphamide-Possible Roles for Peroxisome Proliferation and Lysosomal Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Renal Damage. *Hum. Exp. Toxicol.*, 30: 1924.
- Abraham P, Rabi S (2011) Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stres and renal damage in rats. *Redox Report*, 16 (1).
- Abraham P, Indirani K, Sugumar E (2007) Effect of Cyclophosphamide Treatment on Selected Lysosomal Enzymes in the Kidney of Rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59: 143-149.
- Aebi HE (1987) Catalase. In Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatics Analysis*, 3: 273-285.
- Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 31-36.
- Afzal M, Afzal A, Jones A, Armstrong D (2002) A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. *Methods in Molecular Biology*, 186: 117-122.
- Akçasu A, Banoğlu N, Berkarda Ş (1992) *Farmakoloji, İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar*. Nobel Tıp Kitabevi, S: 822.
- Akkuş İ (1995) Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. *Mimoza yayınları* 134s. Konya.
- Al Salloum AA (2003) Cyclophosphamide Theraphy for Lupus Nephritis: Poor Renal Survival in Arab Children. *Pediatr Nephrol.*, 18: 357-361.
- Anderson ME, Meister A (1998) Glutathione Moesters. *J. Anal. Biochem.*, 183:16-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Arunasree KM (2010) Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*, 17: 581-588.
- Atessahin A, Karahan I, Yilmaz S, Ceribasi AO, Pirincci I (2003) The effect of manganese chloride on gentamicine-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.*, 48: 637-642.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A (2005) Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int.*, 47: 635-639.
- Aydın A, Sayal A, Işimer A (2001) Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi No: 20*, 75s.
- Ayhanci A, Yaman S, Appak S, and Gunes S (2009) Hematoprotective Effect of Seleno-L-Methionine on Cyclophosphamide Toxicity in Rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(4): 424-428.
- Ayhanci A, Gunes S, Sahinturk V, Appak S, Uyar R, Cengiz M, Altuner Y, Yaman S (2010) Seleno L-Methionine Acts on Cyclophosphamide-Induced Kidney Toxicity. *Biol Trace Elem Res.*, 136: 171-179
- Banham S, Dorward A, Hutcheon A, Ahmedzai S (1985) The Role of VP-16 in the Treatment of Small-Cell Lung Cancer Group. *Seminars in Oncology*, 1 (2): 2-6.
- Baser KHC (2008) Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Başer KHC (2001) Her Derde Deva Bir Bitki- Kekik. Bilim ve Teknik. Mayıs 2001; 74-77.
- Baser KHC (2002) Oregano, The genera Origanum and Lippia, The Turkish Origanum species, Agricultural University of Athens, Greece, London and New York. First edition, 277.
- Baydar H, Sagdic O, Özkan G, Karadogan T (2004) Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control, 15: 169-172.
- Bernacki RJ, Bansal SK, Gurtoo HL (1987) Combination of Mesna with Cyclophosphamide or Adriamycin in the Treatment of Mice with Tumors. Cancer Research, 47: 799-802.
- Blum J, Fridovich I (1985) Inactivation of Glutathione Peroxide by Superoxide Radical. Archives of Biochemistry and Biophysics, 240 (2): 500-508.
- Bokser L, Szende B, Schally AV (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 VCH, Mourisden HI, Santaro 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Brock N, Pohl J, Stekar J (1982) Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and its prevention III. Profile of action of sodium 2- mercaptoethane sulfonate (mesna). *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18(12): 1377-87.
- Budavari S (1987) *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, The Merck Index. Elevent Edition Centennial Edition, 1563: 429- 430.
- Burgut R, Tuncer İ (1994) Türkiye'de kanser sıklığı. *Ç.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, 22-24.
- Burk RF (1990) Protection Against Free Radical Injury by Selenoenzymes. *Pharmac. Ther.*, 45: 383-385.
- Caglar K, Kinalp C, Arpacı, İF (2002) Cumulative prior dose of cisplatin as a cause of the nephrotoxicity of high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17: 1931-5.
- Calabresi P, Welch AD (1962) Chemotherapy of Neoplastic Diseases. *Annu. Rev. Med.*, 13; 147-202.
- Carvalho AFU, Melo VMM, Craveiro AA, Machado MIL, Bantim MB, Rabelo EF (2003) Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98(4): 569-571.
- Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F (1986) Comparision of reduced glutathione with 2-mercaptoethane sulfonate to prevent cyclophosphamide induced urotoxicity. *Cancer Letters*, 32: 1-6.
- Cayir K, Karadeniz A, Yildirim A, Kalkan K, Karakoc A, Keles M, Tekin SB (2009) Protective Effect of L-carnitine Against Cisplatin-Induced Liver and Kidney Oxidant Injury in Rats. *Cent. Eur. J. Med.*, 4(2): 184-191.
- Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden J, Bladeren PJ (2001) The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Envorimental Toxicology and Pharmacology*, 10:141-152.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Cros CE, Halliwell B, Borish ET (1997) Oxygen radicals and human disease. *J. Annals Int. Med.*, 107: 526-45.

David ME, Berndt WO (2001) Renal methods for toxicology. In: Wallace Hayes, Editor, *Principles and Methods of Toxicology* (fourth ed.). Taylor and Francis Publisher, Philadelphia, 1189-1214.

De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M (2004) Constituents of Aromatic Plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75, 801-804.

Demirelli FH (2003) Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi, 37; 9-15.

Diplock A (1998) Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.

Erel O (2004) A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J Clinical Biochemistry*, 37: 112-9.

Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, 38: 1103-1111.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations http://apps3.fao.org/jecfa/flav_agents/flavag-r.jsp.

Fillastre JP, Godin M (1998) Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, et al. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York: Oxford University Press, 2645-2657.

Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.*, 24; 42(10): 1849-57.

Gharib MI, Burnett AK (2002) Chemotherapy Induced Cardiotoxicity: Current Practise and Prospects of Prophylaxis. *Eur. J. Heart Fail*, 4: 235-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ghiselli A, M Serafini, F Natella, et al., (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status. Critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.*, 29 (11): 1106-14.
- Ghosh S, Ghosh D, Chattopadhyay S, Debnath J (1999) Effect of ascorbic acid supplementation on liver and kidney toxicity in cyclophosphamide-treated female albino rats. *J. Toxicol. Sci.*, 24: 141-4.
- Glode M, Robinson J, Gould FS (1981) Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone, *The Lancet*, May 23, 1132-1136.
- Golob P, Moss C, Dales M, Fidgen A, Evans J, Gudrups I (1999) The use of species and medicinals as bioactive protectants for grains. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, chapter 5.
- Haan JB, Bladier C, Griffith P, Keiner M, O'shea RD, Kola I (1998) Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Issue of August*, 273(35): 22528-22536.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 186: 1-85.
- Halliwell B (1991) Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, 91: (3C).
- Hamsa TP, Kuttan G (2011) Protective role of *Ipomoea obscura* (L.) on cyclophosphamide-induced uro- and nephrotoxicities by modulating antioxidant status and pro-inflammatory cytokine levels. *Inflammopharmacol*, 19: 155-167.
- He L, Mo H, Hadisusilo S, Qureshi AA, Elson CE (1997) Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *Journal of Nutrition*, 127: 668-674.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Horvathova E, Turcaniova V, Slamenova D (2007) Comparative study of DNA damaging and DNAprotective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. *Neoplasma*, 54: 478-483.
- Hung YC, Huang GS, Lin LW, Hong MY (2007) *Thea sinensis* melanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 1123-1130.
- Hussein AM (1995) Protection Against Cytosine Arabinoside-Induced Alopecia by Minoxidil in a Rat Animal Model, *Int. J. Dermatol.*, 34 (7): 470-473.
- Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Baser KHC (2005) Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93: 551-556.
- İşcan M, Çoban T (1998) Normal ve Neoplastik Meme Dokusunda Antioksidan Enzimler. *Klinik Gelişim*, 11: 392-395.
- Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR (1981) Effect of Renal Insufficiency on the Pharmacokinetics on Cyclophosphamide and some of its Metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 19: 443-451.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Acıkgoz F (2002) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227-235.
- Karkabounas S, Binolis J, Zelovitis J, Kotsis N, Charalabopoulos A, Avdikos A, Zouridakis A, Liasko R, Giannakopoulos X, Charalabopoulos K (2002) Inhibition and modification of benzo[a]pyrene-induced chemical carcinogenesis by ascorbic acid alone or in combination with α -tocopherol in Wistar rats. *Experimental Oncology*, 24: 274-278.
- Kayaalp SO (1998) Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1 (8): 1007-1072.
- Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple, MP (1990) Mechanism of in vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4-Hydroxycyclophosphamide. *Biochemical Pharmacology*, 40 (5): 927- 935.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP (1999) Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82: 171-184.
- Kızılcı S (1999) Kemoterapi Alan Kanseri Hastalar ve Yakınlarının Yaşam Kalitesini Etkileyen Faktörler. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 3 (2).
- Kintzel PE (2001) Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety*, 24: 19-38.
- Kiuchi H, Takao T, Yamamoto K (2009) Sesquiterpene Lactone Parthenolide Ameliorates Bladder Inflammation and Bladder Overactivity in Cyclophosphamide Induced Rat Cystitis Model by Inhibiting Nuclear Factor-kappa B Phosphorylation. *The Journal of Urology*, 181: 2339-2348.
- Korkmaz A, Oter S, Deveci S, Ozgurtas T, Topal T, Sadir S, Bilgic H (2003) Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J. Urol.*, 170: 2498-2502.
- Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H (2005) Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol.*, 173: 1793-1796.
- Korkmaz A, Topal T, Oter S (2007) Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.*, 23(5): 303-12.
- Koyoma H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T (1977) Cyclophosphamide-Induced Ovarian Failure and its Therapeutic Significance in Patients with Breast Cancer. *Cancer*, 39: 1403-1409.
- Kulisic T, Radonic A, Catalinic V, Milos M (2004) Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85: 633-640.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kumar KBH, Kuttan R (2004) Chemoprotective activity of an extract of *phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine*, 12: 494-500.
- Kurowski V, Wagner T (1997) Urinary excretion of ifosfamide, 4-hydroxyfosfamide, 3- and 2-dechloroethylifosfamide, mesna, and dimesna in patients on fractionated intravenous ifosfamide and concomitant mesna therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39(5): 431-439.
- Kurt H., Başaran A, Aral E (2005) Sıçanlarda Karbon Tetrakloritin (CCl₄) Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ve Likopen ile Önlenmesi, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kwon HC, Borch RF, Engel J, Niemeyer U (1987) Activation Mechanism of Mafosfamide and The Role of Thiols in Cyclophosphamide Metabolism. *J. Medchem.*, 30: 395-399.
- Lavin P, Koss LC (1971) Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. IV. Electron microscopic study of the renal tubules. *Am. J. Pathol.*, 62: 169-180.
- Lerza R (1998) Studies on Hemotoxicity of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis-Diamminodichloroplatinum Combined with Sodium-2-Mercaptoethane Sulfonate. *Tumori*, 74: 333-337.
- Mastelic J, Jerkovic I, Blazevic I, Poljak-Blazi M, Borovic S, Ivancic-Bace I, Smrecki V, Zarkovic N, Brcic-Kostic K, Vikic-Topic D, Muller N (2008) Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3989-3996.
- Masuda H, Chancellor MB, Kihara K, Yoshimura N (2006) 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 attenuates development of cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Urology*, 67: 435.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- McCord J (1993) Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem., 26: 351-357.
- McEvoy GK, Bethesda Maryland (2004) AHFS. Drug Information. American Society of Health-System. Pharmacists, 929-952; Repchinsky C. Compendium of Pharmaceuticals and Specialties, 1610-1613.
- Mehdi SJ, Ahmad A, Irshad M, Manzoor N, Rizvi MMA (2011) Cytotoxic effect of Carvacrol on human cervical cancer cells. Biology and Medicine, 3(2): 307-312.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. Annu. Rev. Biochem., 52: 711-760.
- Meister A (1994) Glutathione ascorbate and cellcycle regulation. FEBBS letters, 1-4.
- Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J, Campillo JE (1991) Erythrocyte Free Radical Scavenger Enzymes in Bicycle Professional Racers, Adaptation to Training. Int. J. Sports Med., 12 (6): 563-566.
- Miller LJ, Chandler SW, Ippoliti CM (1994) Treatment of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis with prostaglandins. Ann Pharmacother, 28: 590-594.
- Mitchell MS (1989) Low-Dose Cyclophosphamide and IL-2 in the Treatment of Advanced Melanoma Division of Medical Oncology. Compr. Cancer Center, University of Southern, California, 85-89.
- MSDS, (Material Safety Data Sheets) [http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/ME/2_methyl-5-\(1-methylethyl\)phenol.html](http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/ME/2_methyl-5-(1-methylethyl)phenol.html) Safety (MSDS) data for 2-methyl-5-(1-methylethyl)phenol.
- Oter S, Korkmaz A, Oztas E, Yildirim I, Topal T, Bilgic H (2004) Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. Urol. Res., 32(3): 185-189.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Ozyazgan Y, Yurdakul S, Yazıcı S, Tuzun B (1992) Low Dose Cylosporin A Versus Pulsed Cyclophosphamide in Behçet's Syndrome: a Single Masked Trial. *British Journal of Ophthalmology*, 76 (4): 241-243.
- Özkan A, Fışkın K (2004) Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14:52-60.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, and Gallo P (2007) The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opin Drug Saf.*, 6:183-190.
- Pool BL, Bos RP, Niemeyer U, Theuws JLG, Schmahl D (1988) In vitro/ In vivo Effect of Mesna on the Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide A Study Aimed at Clarifying the Mechanism of Mesna' s Anticarsinogenic Activity. *Toxicology Letters*, 41: 49-56.
- Porter NA (1984) Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105: 273-283.
- Ribeiro RA, Souza Fiho MVP, Santos CC (1998) Involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *International Cancer Congress, Italy, Proceedings*, 227-231.
- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Agar G, Ozer 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.
- Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS (2006) Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin. Chim. Acta.*, 364: 335-42.
- Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N (1998) Larenks kanserli olgularda lipid peroksidasyon ve antioksidan statü göstergelerinin dokuda incelenmesi. *Türk ORL Arşivi*, 36: 33-6.
- Slattery JJ, Sanders JE, Buckner CD, Schaffer RL (1995) Graft-Rejection and Toxicity Following Bone Marrow Transplantation in Relation to Busulfan Pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant.*, 16 (1): 31-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

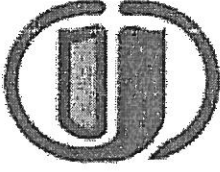
- Smith EL, Hill RL, Lehmal R (1983) Principle of biochemistry. 7th cd- McBraw Hill, inc., 382-383.
- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Sahin F (2004) The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control, 15: 627-634.
- Southorn PA, Powis G (1998) Free Radicals in Medicine. 1. Chemical Nature and Biologic Reactions. Mayo Clin. Proc., 63: 381-389.
- Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, Wright A (1999) Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food and Chemical Toxicology, 37: 813-823.
- Süleymanlar G (1996) Akut Böbrek Yetmezliği. Temel İç Hastalıkları 1. Cilt, (Derleyenler) İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G: Ankara, Güneş Kitabevi, s.757-769.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem., 34: 497.
- Sugumar E, Kanakasabapathy I, Abraham P (2007) Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. Clin Chim Acta., 376: 244-5.
- Szabo C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. Shock, 6: 79.
- Thatcher N, Smihth DB, Lind MJ, Anderson H, Barclay J, Chopra MP, Fitzgerald MD (1988) Double Alkylating Agent Therapy with Ifosfamide and Cyclophosphamide for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer from the Manchester Lung Tumour Group. Cancer, 61: 14-18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Uchida S, Suziki K, Akıyama S, Miyamoto M, Juji T, Fujiwara M (1994) Suppressive Effect of Cyclophosphamide on the Progression of Lethal Graft-Versus-Host Disease in Mice: A Therapeutic Model of Fatal Post-Transfusion GVHD. *Ther. Immunol.*, 1 (6): 313-318.
- Uchiyama M, Mihara M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86: 271-278.
- Uyar R, Bayçu C, Gürer F, Erol K, Cingi Mİ, Özdemir M ve Alpan RS (1990) Metotreksat' in Kemik İliğindeki Toksisitesini Verapamil İle Önlenmesi. *Anadolu Tıp Dergisi*, 12 (2): 27-39.
- Viale SB, Minetti Ottone MA (2003) Preclinical in vitro evaluation of hematotoxicity of the cisplatin-procaine complex DPR. *Anticancer Drugs*, 14: 163-166.
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.*, 11; 140-141: 113-24.
- Weinberg JM (1993) The cellüler basis of nephrotoxicity. *Disease of the kidney: Boston*, 1031-1037.
- West NJ (1997) Prevention and treatment of hemorrhagic cystitis. *Pharmacotherapy*, 17(4): 696-706.
- Yagoda A, Mukherji B, Young C, Etcubanas E, Lamonte C, Smith JR, Tan CT, Krakoff IH (1972) Bleomycin an antitumor antibiotic. Clinical experience in 274 patients. *Ann Intern Med.*, 77(6): 861-870.
- Yao JK, R Reddy LG, McElhinny, et al., (1998) Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res.*, 32 (1): 1-8.

7.EKLER

EK 1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ VE CERRAHİ DENEYSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ
(TİCAM)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 26. 04. 2011
TOPLANTI SAYISI	: 36
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 213
KARAR NUMARASI	: 213
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Adnan AYHANCI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Hüsnü Can BAŞER Prof.Dr. Ruhi UYAR Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK Sibel GÜNEŞ (Doktora Öğrencisi)
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (erkek)

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji/Genel Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Doç. Dr. Adnan AYHANCI** 'nın araştırma yürütücüsü olduğu 213/2011 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Renal Toksikite Üzerine Karvakrol' ün Koruyucu Etkileri" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde düzeltilmesine karar verilmiştir.

Prof. Dr. Keyser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Doç. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Doç. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

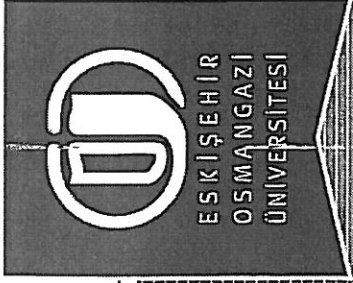
Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sünni DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

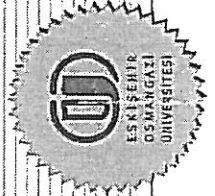
Belge No :06-08

Sayın, Sibel GÜNEŞ,

15 - 26 Eylül 2008 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Kullanımı İle İlgili Eğitim Programı"
teorik ve pratik uygulamalarına katılarak başarıyla
tamamlanmıştır.

Prof. Dr. Kevser EROL
Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

Prof. Dr. Fazıl TEKİN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Rektörü



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sibel GÜNEŞ
Uyruğu : T.C.
Yabancı Dil : İngilizce
Uzmanlık Alanı : Genel Biyoloji
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 1979

Eğitimi

2002-2007 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu.

2007-2009 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalı’nda “Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Renal Toksisitede Selenyum’un Koruyucu Etkisi” isimli yüksek lisans tezi ile mezun oldu.

2009- : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Bilim Dalı’nda Doktora öğrenimine başladı.

2012- : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Fizyoloji Yüksek Lisans’ına başladı.