Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi
dergipark.gov.tr/tutad
Araştırma Makalesi / Research Article

Turk J Agric Res
2017, 4(2): 171-175
© TÜTAD
ISSN: 2148-2306
e-ISSN: 2528-858X
doi: 10.19159/tutad.295505

Kekik Bitkisinin Temel Bileşeni Olan Karvakrolün Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Üreme Sistemi Hasarı Üzerine Koruyucu Etkileri

Mustafa CENGİZ[1*], Yasemin TEKİN[2], Behçet İNAL[3], Adnan AYHANCI[2]

[1] *Siirt Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

[2] *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, TÜRKİYE*

[3] *Siirt Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Siirt, TÜRKİYE*

Geliş Tarihi/Received: 28.02.2017 **Kabul Tarihi/Accepted:** 28.05.2017

[*]Sorumlu Yazar/Corresponding Author: mustafacengizogu@gmail.com

Özet: Siklofosfamid (CP) klinikte kanser ve non-malignant hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan alkilleyici bir ilaçtır. Ancak CP kullanımı bir veya birden fazla dokuda sitotoksisiteye neden olmaktadır. Bu çalışmada CP (50 ve 100 mg kg^{-1}) testis toksisitesi üzerine kekik bitkisinin temel bileşeni olan ve antioksidan özellikleri bilinen karvakrol (Car)'ün olası koruyucu etkilerini saptamak amaçlanmıştır. Çalışmada, Sprague-Dawley cinsi 35 adet erkek sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Histolojik ve biyokimyasal bulgulara göre, CP nedenli testis hasarının önlenmesinde Car anlamlı bir koruma sağladığı saptanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre elde edilen veriler, karvakrolün oldukça etkili bir antioksidan ve hücre koruyucu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle Car, kemoterapi protokollerinde antikanser ilaçların yan etkilerinin azaltılmasında etkili bir aday olabilir.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, testis hasarı, karvakrol, hücre koruyucu, sıçan

Protective Effects of Carvacrol, Essential Composition of Thyme Plant, on Cyclophosphamide-induced Reproductive System Damage on Rats

Abstract: Cyclophosphamide (CP) is an alkylating drug widely used clinically for the treatment of cancer and non-malignant diseases. However, the use of CP causes cytotoxicity in one or more tissues. In this study, it was aimed to determine possible protective effects of carvacrol (Car) which is the main component of thyme plant with antioxidant properties on CP (50 and 100 mg kg^{-1}) testis toxicity. In the study, 35 male Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups as 7 animals in each group. According to histological and biochemical findings, Car was found to provide meaningful protection in the prevention of testicular damage caused by CP. According to the results of the research, carvacrol is a highly effective antioxidant and cell protector. For this reason, Car may be an effective candidate for reducing side effects of anticancer drugs in chemotherapy protocols.

Keywords: Cyclophosphamide, testis damage, carvacrol, cell protector, rat

1. Giriş

Kemoterapi, kanser tedavisinde neoplastik hastalığın sürecini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla antineoplastik ilaç uygulanmasıdır. Antineoplastik ilaçların en fazla kanserojenik olanları alkilleyici tipte olanlarıdır (Kayaalp, 1998; Katzung ve ark., 2009). Alkilleyici ilaçların kemoterapide dozunu kısıtlayan en önemli etkisi ise çoklu organ toksisitelerine neden olmalarıdır. Bu durum bu ilaçların güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanmasını engeller (Pool ve ark., 1988; Çetik ve ark., 2015). Siklofosfamid (CP), kanser tedavisinde çok yaygın olarak kullanılan güçlü bir alkilleyici ilaçtır. CP; akut ve kronik lösemi, meme kanseri,

multiplemyeloma, lenfoma, romatoidartrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde sıkça kullanılır (Senthilkumar ve ark., 2006; Mahmoud ve ark., 2016). CP'nin başlıca yan etkileri hematopoietik depresyon, hemorajik sistit, renaltoksisite ve testiküler toksisitedir (Fraiser ve ark., 1991; Kumar ve Kuttan, 2004; Büyüknacar ve ark., 2008).

Kekik yağının ve kekik suyunun ana bileşeni olan karvakrol (Car)'ün çeşitli sentetik antioksidanlardan çok daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Uçucu bir monoterpen olan bu bileşik; antimikrobiyal, antifungal, doğal gıda koruyucu ve memelilerde yaşlanmayı geciktirici özelliklere sahiptir. Ayrıca karvakrolün güçlü bir antimutajenik ve antitümör etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (İpek ve ark., 2005).

Bu çalışmada; deneysel olarak oluşturulmuş CP nedenli testiküler toksisiteye karşı Car'in olası koruyucu etkilerini histolojik ve biyokimyasal açıdan [Serum malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) seviyelerini ölçerek] belirlenmeye çalışılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kimyasal maddeler ve gruplar

Bütün deney hayvanları; T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilerek, normal musluk suyu ve pellet yemle standart bir çevre yaşamında beslenmiştir. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba (0.5 mL serum fizyolojik (SF) kontrol, 50 ve 100 mg kg^{-1} CP, 10+50 ve 10+100 mg kg^{-1} CP+Car) ayrılmıştır (Tablo 1). CP Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)'dan (CyclophosphamideMonohydrate Katalog No: C0768); Car ise, % 98 saflıktaki (10 mg kg^{-1}) Sigma (Sigma-Aldrich, Germany)'dan (Carvacrol Katalog No: 282197-% 98) temin edilmiştir.

Deney hayvanlarına enjeksiyonlar intraperitonal (i.p.) yolla yapılmıştır. Deney bittiğinde, tüm sıçanların etik kurallarına uygun olarak, ketamin/rompun anestezisi altında testis ve kanları alınmıştır. Bu çalışma, ESOGÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 17.11.2011 tarihli ve 236-1/2011 no'lu kararı ile kabul edilmiştir. CP dozları önceki çalışmalara göre (50 ve 100 mg kg^{-1}) düzenlenmiştir (Ayhancı ve ark., 2008).

2.2. Biyokimyasal ve histolojik değerlendirme

Biyokimyasal ve histolojik değerlendirmeler daha önce yapılmış benzer çalışmalardaki yöntemlere göre (Howell ve Shalet, 1998; Erel, 2005) yapılmıştır.

2.3. İstatistiksel değerlendirmeler

Tüm veri analizleri SPSS 20.0 ve SigmaStat 3.5 (SPSS Science, Chicago, IL) paket programları ile yapılmıştır. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli verilere, OneWayAnovaile (Quinn ve Keough, 2002) analiz edilmiş olup; normal dağılım göstermeyen skor değişkenlerinden oluşan verilerin grup sayıları ise Kruskal-Wallis testi (Sokal ve Rohlf, 1995) ile analiz edilmiştir. Kullanılmış olan her iki testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey Method ve Student Newman Keuls Metodlarından yararlanılmıştır. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $P<0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir (Sokal ve Rohlf, 1995).

3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, Car'ın CP nedenli testis hasarının gelişimini önleyip önleyemediği araştırılmıştır. Biyokimyasal sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde; 50 ve 100 mg kg^{-1} CP uygulanan gruplarda MDA, GSH, SOD ve CAT seviyelerinde artış görülürken, TAS, TOS ve OSİ değerlerinde ise azalma görülmüştür *(P<0.001)*. Car ile birlikte CP verilen gruplarda ise MDA, TOS ve OSI düzeylerinde anlamlı bir azalma; GSH, SOD, CAT ve TAC düzeylerinde ise sadece

Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan kimyasalların dozları

Gruplar Günler	Kontrol	CP (50 mg kg^{-1})	CP (100 mg kg^{-1})	Car+CP (10+50 mg kg^{-1})	Car+CP (10+100 mg kg^{-1})
1.	SF	SF	SF	Car	Car
2.	SF	SF	SF	Car	Car
3.	SF	SF	SF	Car	Car
4.	SF	CP	CP	Car+CP	Car+CP
5.	SF	SF	SF	Car	Car
6.	SF	SF	SF	Car	Car
7.	Kesim	Kesim	Kesim	Kesim	Kesim

Tablo 2. Deney gruplarının MDA (nmol/gr protein), GSH (µg/mg protein), SOD (U/mg protein) ve CAT (U/gr protein), TOS (µmolTroloxequivalent/L), TAS (µmol H_2O_2 equivalent/L) ve OSI değerleri bakımından kontrol grubuna göre ortalama değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

Gruplar (n=7)	MDA	GSH	SOD	CAT	TOS	TAS	OSI (TOS/TAS)
Kontrol	384±9	50±3	0.4±0	50±2	206±4	4.3±0	4.7±0
50 mg kg^{-1} CP	438±6[a]	40±1[a]	0.3±0[a]	38±1[a]	270±6[a]	3.2±0[a]	8±0[a]
100 mg kg^{-1} CP	530±7[a]	36±1[a]	0.2±0[a]	29±1[a]	286±11[a]	3±0[a]	12.5±1[a]
10+50 mg kg^{-1} Car+CP	359.7±16.6[a]	52.5±1.3[ns]	0.34±0[b]	78.8±2.2[a]	185±6.5[b]	6.4±0.2[a]	2.8±0.1[b]
10+100 mg kg^{-1} Car+CP	390±8[b]	50±2.8[ns]	0.33±0[b]	58.5±2.1[b]	257±5.5[a]	5.6±0.1[b]	4.5±0.1[ns]

MDA: Malondialdehit, GSH: Glutatyon: SOD: Superoksitdismutaz, CAT: Katalaz, TOS: Total oksidan miktarı, TAS: Total antioksidan miktarı, OSI: Oksidatifstres indeksi, [a]*P<0.001* istatistiksel olarak ileri derecede fark, [b]*P<0.05* istatistiksel olarak anlamlı derecede fark, [ns]*P>0.05* istatistiksel olarak anlamlı fark yok

CP uygulanan gruba göre önemli bir artış olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen verilere benzer olarak; Güneş ve ark. (2017) çalışmalarında, CP (100 mg kg^{-1}) verilen deney gruplarında MDA, TOS ve OSI düzeylerinde artma, GSH, SOD, CAT ve TAC düzeylerinde ise kontrol grubuna göre azalma olduğunu saptanmışlardır. Aynı çalışmada CP ile birlikte 10 mg kg^{-1} Car verilen deney grubunda CP verilen gruba göre MDA, TOS ve OSI düzeylerinde azalma, GSH, SOD, CAT ve TAC düzeylerinde ise artma olduğu belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise 20 mg kg^{-1} methotrexate ile oluşturulan testis hasarını 10 mg kg^{-1} Car'ın önemli oranda iyileştirdiği ve methotrexate uygulanan grup ile karşılaştırıldığında MDA, TOS ve OSI miktarında azalma ve TAS miktarında artış olduğu vurgulanmıştır (Daggulli ve ark., 2014).

Diğer taraftan histolojik değerlendirmemizde ise, CP (50 ve 100 mg kg^{-1})'nin uygulandığı deney gruplarına ait testis dokusundan alınan kesitler incelendiğinde seminifertübül hasarı, seminifertübül duvarındaki spermatojenik hücrelerin ayrılıp lümene dökülmesi, hücre sayısının azalması, tübül bazal membranının kıvrıntılı hal alması gibi değişimler gözlenmiştir. Car ile birlikte CP verilen gruplara ait değerler, sadece CP verilen gruplar ile karşılaştırıldığında Car'ın oluşan hasarı koruduğu görülmüştür (Tablo 2 ve Şekil 1). Nitekim bu bulgularımız yapılan çalışmaları desteklemektedir. Mahmoud ve ark. (2016) çalışmalarında CP uygulaması, seminifertübüller arasında geniş interstisyel kanama, spermatogenik hücrelerin farklı evreleri arasındaki tam ayrım, spermatojenik hücrelerdeki vakuoller ve spermatojenik hücrelerin dağınıklığı da dâhil olmak üzere histopatolojik değişikliklerle ispatlanmış ciddi testis hasarına neden olmuştur. Aksu ve ark. (2016) da yaptıkları çalışmada, Cisplatin (100 mg kg^{-1}) ile oluşturulan üreme sistemi hasarında Car'in hasarı düzelttiği ve aynı zamanda Cisplatin verilen gruba göre denejenerasyon ve apoptoz miktarını da azalttığı vurgulanmıştır. Bizim çalışma sonuçlarımız, Car ile birlikte CP verilen gruplara ait biyokimyasal ve histolojik sonuçlar Car'ın oluşan doku hasarını önemli ölçüde tedavi edebildiğini göstermiştir (Tablo 2 ve Şekil 1).

4. Sonuçlar

Çalışmamızın sonuçlarına göre Car'ın, CP'nin sahip olduğu toksik etkilerini önleyebileceği ve özellikle kemoterapi alımından sonra ve esnasında oluşan hasarın korunmasında katkı sunabileceği fikrini kuvvetlendirmektedir.

Kaynaklar

Ayhancı, A., Uyar, R., Aral, E., Kabadere, S., Appak, S., 2008. Protective effect of zinc on cyclophosphamide-induced hematoxicity and urotoxicity. *Biological Trace Element Research*, 126(3): 186-193.

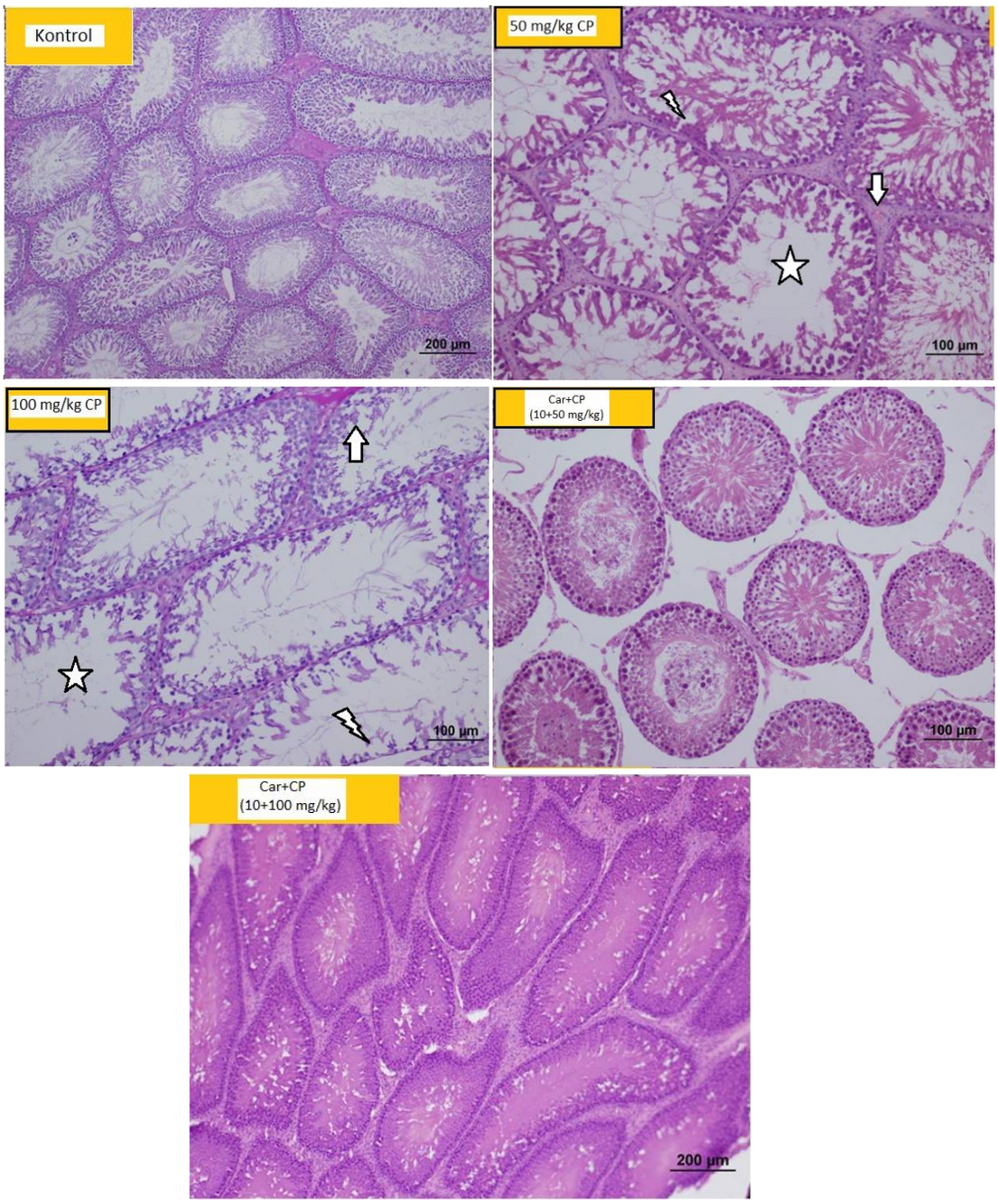
Aksu, E.H., Kandemir, F.M., Altun, S., Küçükler, S., Çomaklı, S., Ömür, A.D., 2016. Ameliorative effect of carvacrol on cisplatin-induced reproductive damage in malerats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30(10): 513-520.

Büyüknacar, H.S., Kumcu, E.K., Göçmen, C., Önder, S., 2008. Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 586(1-3): 293-299.

Cetik, S., Ayhancı, A., Şahintürk, V., 2015. Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4): 596-76.

Daggülli, M., Dede, O., Utangaç, M.M., Bodakçi, M.N., Hatipoğlu, N.K., Penbegül, N., Sancaktutar, A.A., Bozkurt, Y., Türkçü, G., Yüksel, H., 2014. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *International Journal of Clinical Experimental Medicine*, 7(12): 5511-5516.

Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method form easuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12): 1103-1111.



Şekil 1. Tüm gruplara ait testis dokusunun ışık mikroskobundaki görüntüleri

Normal histolojik görünümlü kontrol grubu, CP verilen gruplarda seminifer tübüller arası yoğun hemoraj (ok), spermatojenik hücrelerin ayrılması (şimşek), spermatojenik hücrelerde boşluklar ve dağınıklık (yıldız), Car ile birlikte CP verilen gruplarda kontrol grubuna yakın görünüm. (H&E, bar: 100 ve 200 µm)

Fraiser, L.H., Kanekal, S., Kehrer, J.P., 1991. Cyclophosphamide toxicity. *Drugs*, 42(5): 781-795.

Güneş, S., Ayhanci, A., Şahintürk, V., Altay, D.U., Uyar, R., 2017. Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney. (doi: 10.1139/cjpp-2016-0450).

Howell, S., Shalet, S., 1998. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinology Metabolism Clinical of North America*, 27(4): 927-943.

İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, B.A., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by ames Salmanella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(3): 551-556.

Katzung, B., Masters, S., Trevor, A., 2009. Basic & clinical pharmacology. McGrawill Medical, New York.

Kayaalp, S.O., 1998. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1(8): 1007-1072.

Kumar, K.B.H., Kuttan, R., 2004. Chemoprotective activity of an extract of phyllanthus amarus against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Phytmedicine*, 12(6-7): 494-500.

Mahmoud, A.M., Soilman, H.A., Abd El-Hameed, A.M., Abdel-Reheim, E.S., 2016. Wheat germ oil attenuates cyclophosphamide induced testicular injury in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5): 40-52.

Pool, B.L., Bos, R.P., Niemeyer, U., Theuws, J.L.G., Schmahl, D., 1988. In vitro/in vivo effect of mesna on the genotoxicity ans oxicity of cyclophosphamide: A study aimed at clarifying the mechanism of mesnas anticarsinogenic activity. *Toxicology Letters*, 41(1): 49-56.

Quinn, G., Keough, M. 2002. Experimental designand data analysis for biologists. Cambridge University Press, New York, USA.

Senthilkumar, S., Devaki, T., Manohar, B.M., Babu, M.S., 2006. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clinica Chimitica Acta*, 364(1-2): 335-42.

Sokal, R., Rohlf, J., 1995. Biometry. W. H. Freeman & Co, New York, USA. Third Edition, 887.