



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ/REPERFÜZYON

HASARINDA KARVAKROLÜN ETKİLERİNİN

ARAŞTIRILMASI

DR. OSMAN ÜNAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

2022

BOLU



T.C.

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA ALT EKSTREMİTE İSKEMİ/REPERFÜZYON

HASARINDA KARVAKROLÜN ETKİLERİNİN

ARAŞTIRILMASI

DR. OSMAN ÜNAL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR. YUSUF VELİOĞLU

DR.ÖĞR.ÜYESİ UFUK TURAN KÜRŞAT KORKMAZ

2022 - BOLU

Bu tez Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince 2021.08.15.1512 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik ilkelere uyulduğuna ilişkin beyan

Tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum **Ratlarda Alt Ekstremité İskemi/Reperfüzyon Hasarında Karvakrolün Etkilerinin Araştırılması** başlıklı çalışmanın yazılmasında bilimsel ve etik kurallara uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda atıfta bulunduğumu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin tamamının ya da bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Dr. Osman ÜNAL

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemde etkisi olan Öğretmenim Yaşar TEMİZ'e, derslerime giren tüm Ordu Atatürk İlköğretim Okulu ve Ordu Fen Lisesi öğretmenlerime, tıp eğitimim boyunca bana bildiklerini öğreten tüm Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi hocalarıma,

Öncelikle Tez Danışmanlarım Doç .Dr. Yusuf VELİOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Ufuk Turan Kürşat KORKMAZ olmak üzere uzmanlık eğitimim boyunca bana bildiklerini öğreten hocalarım Prof. Dr. Kemalettin ERDEM'e, Doç. Dr. Ahmet YÜKSEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Ferhat BORULU'ya, Uzm.Dr. Erhan Renan UÇAROĞLU'na,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a, Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA'ya, Doç. Dr. Murat ALIŞIK'a Dr. Öğr. Üyesi Selma ERDOĞAN DÜZCÜ'ye,

Sevgili asistan arkadaşım Dr. Sarper SEYMEN'e, birlikte çalıştığımız tüm hemşirelerimize personellerimize ve sekreterlerimize,

Beni kendi oğulları gibi gören ve desteklerini hiç esirgemeyen Lalehan Döndü PAMUK ve Halit PAMUK'a

Hayatımın her anında her zaman yanımda olan annem Gönül ÜNAL'a, babam Hayri ÜNAL'a, ve abim Tolga ÜNAL'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca zamanlarından çaldığım ailem, desteğini hiç kesmeyen, bana dayanma gücü veren ve bu yolda beni motive eden biricik eşim Ayşe Nur ÜNAL'a, eve geldiğimde tüm stresimi alan canım oğlum Emir Alp ÜNAL ve canım kızım Nehir ÜNAL'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. HÜCRE	5
2.2. HÜCRE HASARI	5
2.3. İSKEMİ	7
2.4. REPERFÜZYON.....	10
2.5. REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALARI.....	11
2.5.1 NÖTROFİLLER(PMNL)	12
2.5.2 ENDOTEL.....	13
2.5.3 KOMPLEMAN SİSTEMİ.....	13
2.5.4 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ(SOR).....	14
2.5.5. ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR	18
2.6. TOTAL OKSİDAN DURUM (TOTAL OKSİDAN STATUS) (TOS)	20
2.7. TOTAL ANTİOKSİDAN DURUM (TOTAL ANTİOKSİDAN STATUS) (TAS)	20
2.8. OKSİDATİF STRESS İNDEKSİ (OSİ)	21
2.9. THIOL/DİSÜLFİD HOMEOSTAZI (TDH).....	21
2.10. KARVAKROL	22
2.10.1 KARVAKROLÜN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ	25

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1 Deney ve Cerrahi	27
3.2 Deney Grupları	29
3.3. Biyokimyasal İşlemler	31
3.3.1. TİYOL-DİSÜLFİT DENGESİ PARAMETRELERİ ÖLÇÜMÜ	31
3.3.2. Total antioksidan durum (total antioxidant status (TAS)).....	32
3.3.3. Total oksidan durum (total oksidant status (TOS)).....	32
3.4. Histopatolojik İnceleme	33
3.5 İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. Biyokimyasal Bulgular	35
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	37
4.3 Kas dokusunun histopatolojik görüntüleri	40
5.TARTIŞMA	41
SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR	47

TABLÖLAR

Tablo 1. İskeminin Hücresel Etkileri.....	10
Tablo 2.Radikal olan ve radikal olmayan reaktif bileşikler	16
Tablo 3.Serbest radikallerin kaynakları.....	16
Tablo 4. Serbest oksijen radikallerinin zararları	17
Tablo 5.Enzim olan endojen antioksidanlar.....	18
Tablo 6. Enzim olan endojen antioksidanlar.....	19
Tablo 7. Vitamin olan antioksidanlar	19
Tablo 8. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar	20
Tablo 9. Karvakrol ile yapılmış in vivo ve in vitro çalışmalar ve biyolojik etkileri.....	24
Tablo 10. Biyokimyasal parametreleri istatistiksel analizi	35
Tablo 11. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Değerleri.....	38

ŞEKİLLER

Şekil 1. Reverzibl ve İrreverzibl Zedelenme	5
Şekil 2. Stres ve hasar verici uyaranlar karşısında hücre yanıtının evreleri	6
Şekil 3. Hücre Hasarında sitozoldeki kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları	7
Şekil 4. Hücre hasarında başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar bölgeleri	8
Şekil 5. Miyokart Hücrelerinin Hücre Hasarı ve Yanıtı	9
Şekil 6. İskemi reperfüzyon sırasında salgılanan mediatörler	11
Şekil 7. İskemi reperfüzyon hasarında lökosit – endotel etkileşimi	12
Şekil 8. Haber-weiss Reaksiyonu ile moleküler oksijenin tek değerlikli indirgenmesi sonucu SOR oluşması	14
Şekil 9. Reaktif oksijen türevlerinin hücre hasarında üretilmesi, uzaklaştırılması ve rolü	14
Şekil 10. Reaktif oksijen türevlerinin üretim yolları	15
Şekil 11. Albüminin yapısı ve bağlanma bölgeleri	21
Şekil 12. Karvakrolün moleküler yapısı ve etkileri	23
Şekil 13. Karvakrole ait IR spektrumu	25
Şekil 14. Karvakrole ait H-NMR spektrumu	26
Şekil 15. Ratların sol arka bacaklarının hazırlanması	28
Şekil 16. Ratlardan İntrakardiyak Kan Alınması	29
Şekil 17. Kas Dokusunun Histopatolojik görüntüleri	40

KISALTMALAR

ABTS :	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
DMSO:	Dimetil sülfoksit
ET :	Endotelin
FIR :	Femoral iskemi/reperfüzyon
cGMP :	Siklik Guanilat mono fosfat
GSHPx :	Glutatyon Peroksidaz
GST :	Glutatyon S-Transferaz
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit radikali
H-NMR :	Proton nuclear magnetic resonance
ICAM-1:	Hücrelerarası adezyon molekülü-1
IL :	İnterlökin
IR spektrumu :	infrared spektrumu
I/R :	İskemi/reperfüzyon
MCP-1 :	Monosit kemoatraktan protein-1
MDA :	Malondialdehit
NAC :	N-Asetilsistein

NO	:	Nitrik oksit
OH ⁻	:	Hidroksil radikali
OSİ	:	Oksidatif Stress İndeksi
O ₂ ⁻	:	Süperoksit radikali
PAF	:	Platelet aktive edici faktör
PECAM-1:		Platelet endotelyal hücre adezyon molekülü-1
PMNL:		Polimorfonüveli lökositler
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
TAS	:	Total Antioksidan Seviye
TDH	:	Tiyol Disülfid Homeostazı
TNF- α	:	Tümör nekroz faktör alfa
TOS	:	Total Oksidan Seviye
VCAM-1:		Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi/Reperfüzyon Hasarında Karvakrolün

Etkilerinin Araştırılması

Amaç:

Akut ekstremitte iskemisi ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan klinik bir problemdir. Yapılan çalışmalar karvakrolün antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, spazmolitik ve vazorelaksan dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda femoral iskemi reperfüzyon hasarında karvakrolün Total Oksidan Seviye(TOS), Total Antioksidan Seviye(TAS), ve Tiyoil Disülfid Homeostazı (TDH) üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:

Çalışmada toplam 36 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı ve her grupta 6 hayvan olmak üzere 6 grup (Kontrol, İskemi-reperfüzyon, Karvakrol, DMSO, Heparin ve Heparin+karvakrol) oluşturuldu. Kontrol grubu hariç hayvanlar 90/10 mg/kg ketamine/ksilazine im uygulama ile anesteziye alındıktan sonra lastik teyp ile 60 dk. sol femoral iskemi oluşturuldu. Reperfüzyon için 60 dk. bekletildi. Reperfüzyon aşamasında karvakrol verilen gruplara 0,01mL (5mg/kg) ip karvakrol heparin verilen gruplara ise 0,1mg/kg enoxaparin sc verildi. Reperfüzyon sonrası intrakardiyak 5ml alınan kanda ELİSA ile TAS, TOS, Tiyoil Disülfid Seviyelerine, FİR yapılan alp ekstremitte caput femoris hizasından ekarte edilerek hematoksilen eozine boyama ile hücre apoptozisi, kas liflerinin düzensizliği, hemoraji ve inflamatuvar hücre artışı yönünden değerlendirildi.

Bulgular:

Çalışmamızda biyokimyasal ve histopatolojik olarak bakıldığında TAS, TOS, Tiyo Disülfid Seviyesi artmış, dejenerasyon, hücrelerde ayrışma, inflamasyon ve konjesyon bulguları azalmış olarak verilerimiz anlamlı çıkmış olup literatür bulguları ile uyuşmaktadır.

Disorganizasyon, hemoraji ve nekroz bulguları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Sonuç:

Çalışmamızda karvakrolün iskemi reperfüzyon hasarında olumlu yönde etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır. Bu bulgularımızın tüm etkilerinin ortaya çıkartılması ve pratikte de uygulanabilmesi için daha fazla deneysel ve klinik araştırmaya gereksinim vardır.

Anahtar Sözcükler: Karvakrol, Total Oksidan Seviye, Total Antioksidan seviye, Tiyo Disülfid Homeostazi, İskemi Reperfüzyon Hasarı

ABSTRACT

Research of Carvacrols Effects on Lower Extremity Ischemia/Reperfusion Injury on Rats

Aim:

Acute extremity ischemia is a clinical problem that causes high morbidity and mortality. Studies show that carvacrol has various biological and pharmacological properties, including antioxidant, antibacterial, antifungal, anticancer, anti-inflammatory, hepatoprotective, spasmolytic and vasorelaxant. In our study, it was aimed to investigate the effects of carvacrol on Total Oxidant Status (TOS), Total Antioxidant Status (TAS), and Thiol Disulfide Homeostasis (TDH) in femoral ischemia-reperfusion injury.

Materials and Methods:

36 Sprague Dawley male rats were used in the study and 6 groups (Control, Ischemia-reperfusion, Carvacrol, DMSO, Heparin and Heparin+carvacrol) were formed, with 6 animals in each group. Except for the control group, the animals were anesthetized with 90/10 mg/kg ketamine/xylazine IM application, and then they were treated with rubber tape for 60 minutes. left femoral ischemia was created. Waited 60 min for reperfusion. During the reperfusion phase, the groups given carvacrol were given 0.01mL (5mg/kg) ip of carvacrol, and the groups given carvacrol heparin were given 0.1mg/kg enoxaparin sc. TAS, TOS, Thiol Disulfite Levels were evaluated by ELISA in 5 ml intracardiac blood taken after reperfusion, and FIR was evaluated in terms of cell apoptosis, irregularity of muscle fibers, hemorrhage and inflammatory cell increase by hematoxylin-eosin coloring by excluding the lower extremity from the caput femoris level.

Findings:

In our study, biochemically and histopathologically, TAS, TOS, Thiol Disulfide Levels were increased, degeneration, cell separation, inflammation and congestion findings were found to be significant, and our data were consistent with the literature findings. The findings of disorganization, hemorrhage and necrosis were found to be statistically insignificant.

Results:

In our study, it was concluded that carvacrol has positive effects on ischemia-reperfusion injury. More experimental and clinical studies are needed to reveal the full implications of our findings and to apply them in practice.

Keywords:

Carvacrol, Total Oxidant Status, Total Antioxidant Status, Thiol Disulfide Homeostasis, Ischemia Reperfusion Injury

1.GİRİŞ

Hücre zedelenmesinin birçok nedeni olsa da klinik tıp açısından hücre zedelenmesinin en sık görülen nedeni iskemidir. İskemi, herhangi bir sebeple arteriyel kan akımının ve ya venöz dönüşün azalması nedeniyle hücre ve dokuda kanlanmanın azalması veya kesilmesidir. Hipoksi ise herhangi bir sebeple hücreye gelen oksijenin azalmasıdır. Hipoksinin en sık ve önemli nedeni iskemi olmakla birlikte pnömoni, CO zehirlenmesi gibi başka nedenleri de vardır¹.

Hücre zedelenmesi reverzibl ise akımının düzelmesi ile hücre de eski haline dönebilir. Fakat bazı durumlarda kan akımının düzelmesi hücre zedelenmesini daha da kötüye götürür. Buna da reperfüzyon hasarı denir².

Reperfüzyon hasarının bütün nedenleri ve mekanizmaları açık değildir. Kan akımının yeniden yüksek seviyelere çıkması ile birlikte Ca^{+2} iyonları da yüksek seviyede hücreye ulaşır. Sitoplazmada Ca^{+2} miktarının artması ATPaz, Fosfolipaz, Proteaz ve Endonükleaz enzimlerini aktive ederek hücreyi öldürmektedir².

İskemik hücrelerin yeniden yüksek kan akımına kavuşması iltihabi hücrelerin iskemik bölgeye gelmesine neden olur. Bu hücreler, hücre zarı hasarı ile birlikte mitokondrial permeabilityyi artıran serbest oksijen radikallerini serbest bırakır³. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre zedelenmesinde birçok mekanizma vardır. Membranların lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması, proteinlerin çapraz bağlanması bu mekanizmaların en önemli üç tanesidir².

İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı patolojik durumlara sebebiyet verir. Doku, organ ve sistemlerde bozulmalara yol açar. Fonksiyonların kalıcı ve ya geçici kaybına yol açar. Uzun kaybı hatta ölümle de sonuçlanabilir^{4,5}.

Akut iskemilere geç müdahalede bulunulması mortalite ve morbiditelere neden olabilir^{4,5}.

I/R hasarında ilgili bölgeye ilk ulaşanlar trombositlerdir. Polimorfonüveli lökositler(PMNL) ve endotel aktivasyonu nedeniyle oluşan mediatörler trombositlerden sonra gelir^{6,7}.

Lökositlerden üretilen endotelin, platelet aktive edici faktör (PAF), nitrik oksit (NO) ve sitokinler, serbest oksijen radikalleri(SOR) oluşmasına, onlarda endotelyal zedelenmeye, hücre şişmesine ve hücrenin ölümüne sebebiyet verir^{6,7}.

Akut ekstremitte iskemisi ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan klinik bir problemdir. Akut iskemik duruma yol açan neden ortadan kaldırılıp reperfüzyon sağlandığında da morbidite ve mortalite riski devam etmektedir. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm dokularda gözlenebilir⁸.

İskelet kasında iskemi ve reperfüzyon (I / R) hasarı birçok vasküler ve muskuler travmalarda, çeşitli hastalıklarda ve üst veya alt ekstremitte ameliyatlarında kaçınılmazdır².

İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşarak, oksidatif strese neden olur^{9,10}.

İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipit peroksidasyonuna yol açarak hasarı arttırmaktadırlar^{9,10}.

Bu oksidatif parametrelerin en önemlileri Total Antioksidan Seviye (TAS), Total Oksidatif Seviye (TOS) ve Thioldisülfittir.

TAS Erel ve ark. tarafından geliştirilen serbest oksijen radikallerine karşı canlının total antioksidan kapasitesini ölçen tam otomatik yöntemdir¹¹.

TOS Erel ve ark. tarafından geliştirilen ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona oksitleyen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir¹².

Tiyol kavramı sülfür hidrojen grubu içeren bileşikler için kullanılmaktadır. Biyolojik ve fizyolojik olaylarda önemli rol oynarlar. Prooksidan veya antioksidan etki gösterirler. Tiyol bulunduran antioksidanlar; pridoksin, metiyonin, S adenzimetiyonin, N-Asetilsistein (NAC), alfa-lipoik asit, kaptopril, taurin, homosisteindir. Plazma tiyolları arasında en çok bulunanlar sırasıyla sistein, homosistein ve redükte glutatyondur^{13,14}.

Thiol/disulfit homeostazının (TDH) önemli roller üstlendiği aktivitelerin bazıları hücre büyümesi ve apoptozu, antioksidan korunma, detoksifikasyondur^{13,14}. In vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar, karvakrolün antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, spazmolitik ve vazorelaksan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir¹⁵.

Karvakrol Labiatae (ballıbabagiller) ailesinden elde edilir. Ülkemizde kekik olarak isimlendirilen bu cinsler güçlü antioksidan etkili bir bitkidir¹⁶.

Ancak karvakrolün femoral iskemi/reperfüzyon (FIR) üzerine yapılan bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmamızda ratlarda sol bacak femoral arter ve ven bağlanması sonrası iskelet kasında oluşan Total antioksidan seviye, total oksidan seviye ve tiyoldisülfid hemostazı üzerine karvakrolün histopatolojik etkisi değerlendirilmiştir.



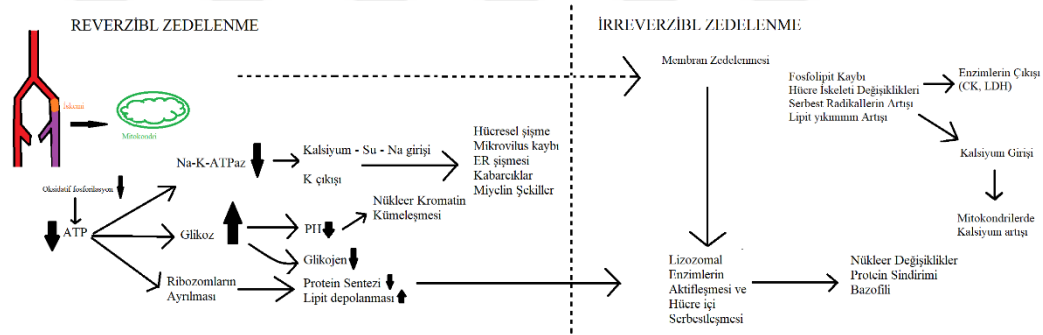
2.GENEL BİLGİLER

2.1. HÜCRE

Prokaryot ve ökaryot olmak üzere iki farklı türü olan hücre canlı organizmaların en küçük yapı birimidir. Prokaryot hücre tipi sadece bakterilerde bulunmasına karşın ökaryot hücre tipi, amip protozoa , tüm bitkiler ve hayvansal organizmalarda bulunur¹⁷.

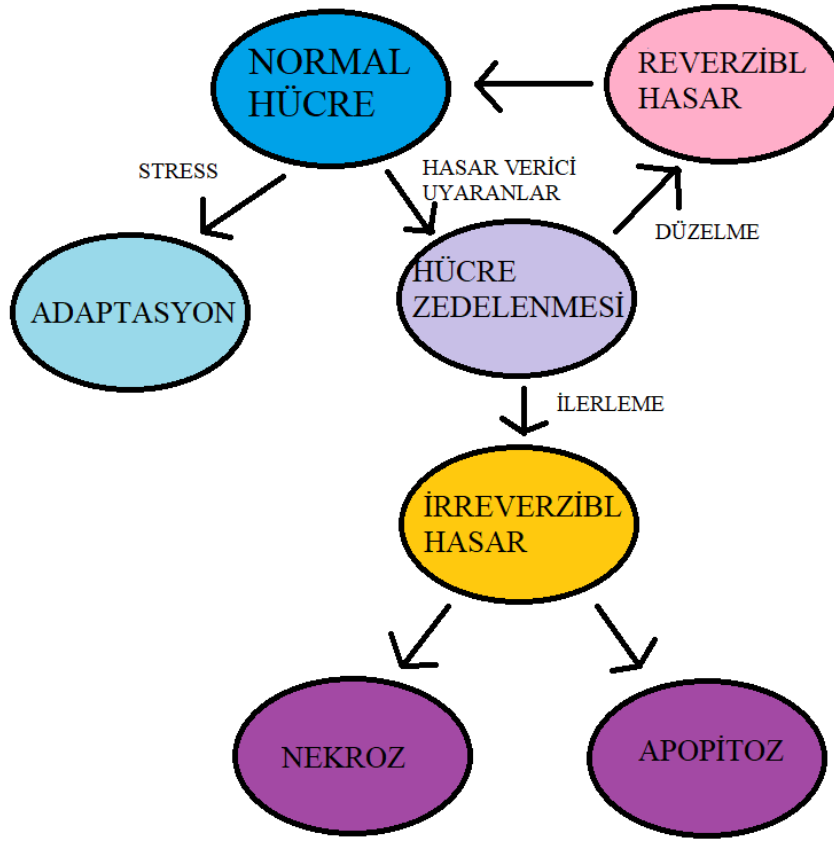
İnsan organizması zigot ve oosit denen hücrelerin birleşmesiyle tek bir hücreden üreyen yaklaşık 200 farklı hücre türünden ve 100 trilyon civarında hücreden oluşmaktadır¹⁸.

2.2. HÜCRE HASARI



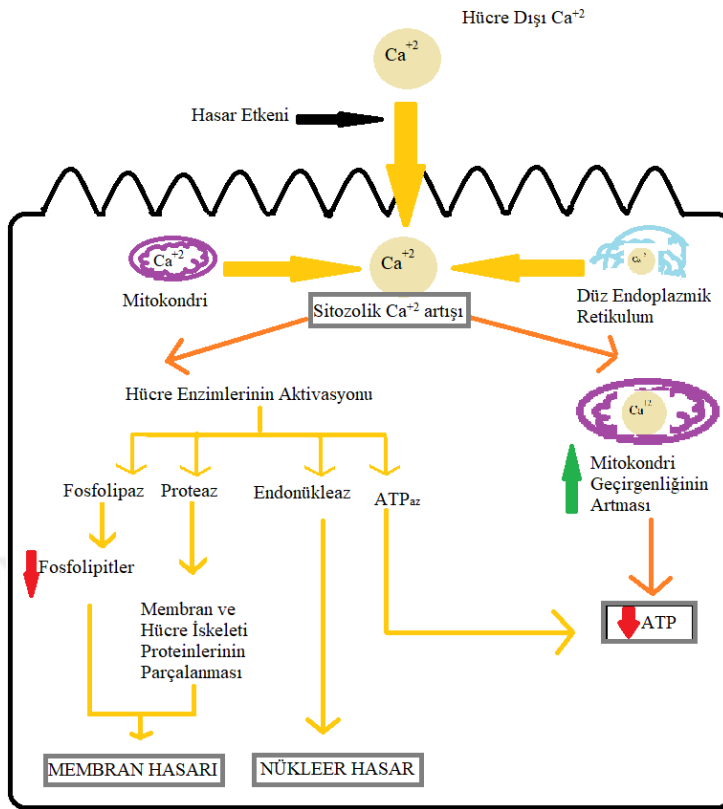
Şekil 1. Reverzibl ve İrreverzibl Zedelenme²

Hücreler adaptasyon yeteneklerini kullanarak homeostazı sürdürmeye çalışırlar. Adaptasyon yeteneklerinden bazıları atrofi, hipertrofi, hiperplazi ve metaplazidir. Bu adaptasyon mekanizmaları çalışmaz ve ya aşılsa hücre hasarı meydana gelir. Hücre hasarı dönüşümlü (reversibl) ve ya dönüşümsüz (irreversibl) olabilir. İrreversibl etkilenen hücreler nekroz ya da apoptozis yoluyla ölürler².



Şekil 2. Stres ve hasar verici uyarılar karşısında hücre yanıtının evreleri ²

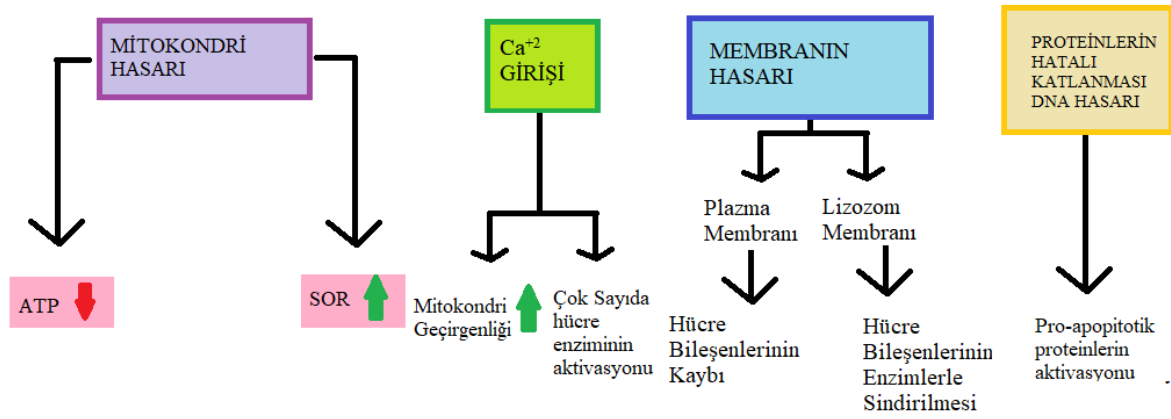
Hücre hasarı oluşturan belli başlı etmenler; oksijen yokluğu, kimyasal etkenler, enfeksiyöz etkenler, immünolojik reaksiyonlar genetik bozukluklar, beslenme dengesizlikleri, fiziksel etkenler (travma, ısı, elektrik, radyasyon, atmosfer basınç değişiklikleri vb.), yaşlanma sayılabilir².



Şekil 3. Hücre Hasarında sitozoldeki kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları²

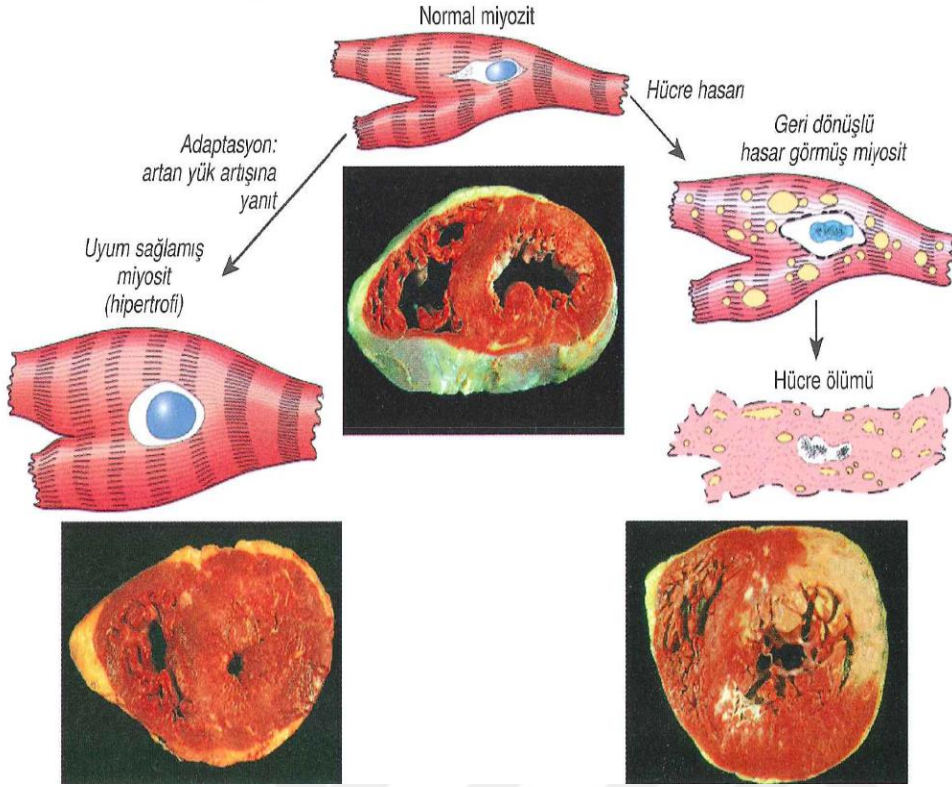
2.3. İSKEMİ

Bir hücre, doku ve ya organa yeterli maddeleri sağlayan kan akımının gitmemesi iskemi olarak tanımlanabilir. İskemi hücre hasarının en sık görülen tipidir. Hipoksinin en sık nedeni iskemidir^{19,20}.



Şekil 4. Hücre hasarında başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar bölgeleri

İskemide anaerobik etkinliğin fazla olması nedeniyle laktik asit ve zararlı yan ürünler oluşur. pH asidik yöne kayar ve asidoz oluşur. Enerji üretiminin azalması hücre membranının şişmesine Na/Ca iyon dengesi bozulmasına neden olmaktadır. pH'ın düşmesi protein sentezini azaltarak çekirdeği harap eder²¹.



Şekil 5. Miyokart Hücrelerinin Hücre Hasarı ve Yanıtı²

İskemi akut miyokard enfarktüsü gibi ani gelişen ya da kronik periferik vasküler hastalıklar gibi zamanla ortaya çıkan şekillerde karşımıza çıkabilir²².

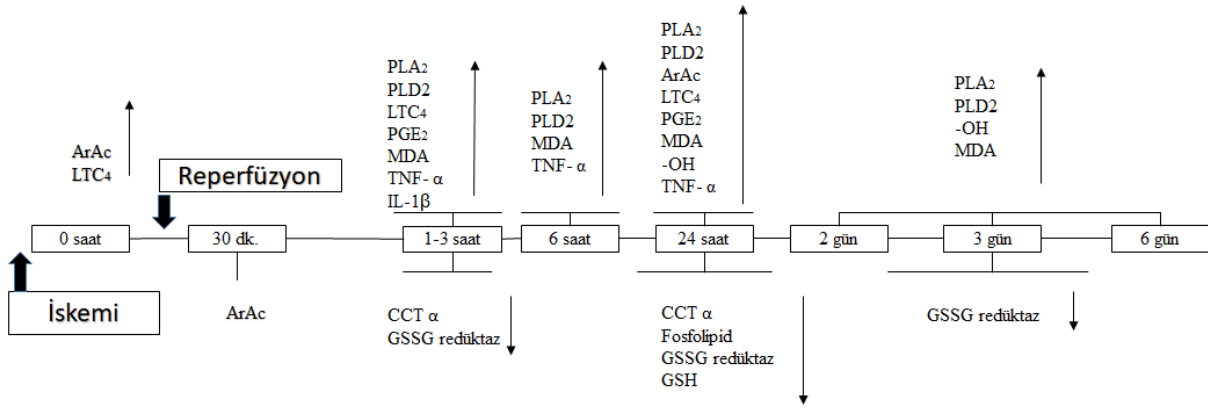
Tablo 1. İskeminin Hücresel Etkileri²³

İSKEMİNİN HÜCRESEL ETKİLERİ
ATP Azalması
Hücre Membran Potansiyelinde Bozulma
Hücresel İyon Dağılımında Bozulma
Hücresel Şişme
Hücre İskeletinde Bozulma
Hücresel Asidoz
Fosfokeratin azalması
Glutasyon azalması
Lökosit Adezyon Moleküllerinde Artış
Hipoksantin Artışı

2.4. REPERFÜZYON

Bir hücre, doku ve ya organa kan akımının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denir. Reperfüzyon iskemi sonrası dokular için gerekli olmakla birlikte daha da zararlı bir duruma da neden olabilir. Bu zararlı duruma reperfüzyon hasarı denir. Reperfüzyon hasarının boyutu iskemik kalınan sürenin artmasıyla daha da artar²⁴.

Reperfüzyon, iskemi nedeniyle dokuda biriken toksik ürünlerin genel dolaşıma katılmasına neden olur. Genel dolaşıma katılan toksik ürünler diğer organ ve dokulara ulaşarak hasar meydana getirir. Bu hasar iskemik hasardan daha fazla olabilir^{25,26}.



Şekil 6. İskemi reperfüzyon sırasında salgılanan mediatörler²⁷

Zedelenen hücreler reperfüzyon sırasında iyonik düzenlerini sağlayamadan yüksek miktarda kalsiyuma maruz kalır. Sitoplazmik kalsiyum artışı ATPaz, fosfolipaz, proteaz ve endonükleazı aktive ederek hücre bütünlüğünü bozar²⁸⁻³⁰.

2.5. REPERFÜZYON HASARI MEKANİZMALARI

İskemi sonucu reversibl oluşan hasarlar reperfüzyon sonrası iyileşebilirler. Bazı durumlarda ise reperfüzyon hasarı artırır ve irreversibl hasara dönüştürür. Buna İskemi/reperfüzyon hasarı(I/R) denir.

I/R hasarında etkili olan faktörlerden bazıları şunlardır;

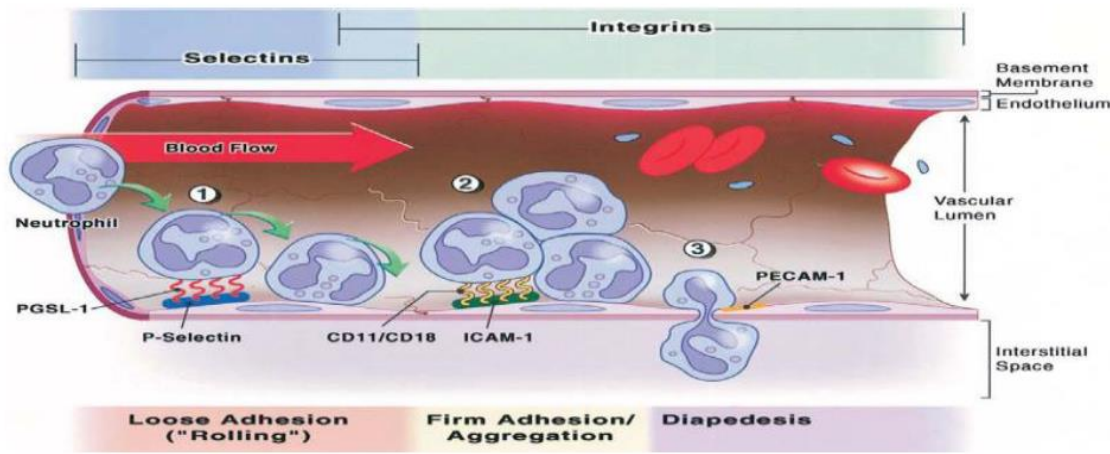
1. Nötrofiller
2. Endotel hücreleri
3. Kompleman sistemi
4. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)
5. Antioksidan mekanizmaların çalışmaması

I/R hasarında en önemli faktör serbest oksijen radikalleridir³¹.

2.5.1 NÖTROFİLLER(PMNL)

I/R hasarında aktif olan ilk hücreler olup vasküler permeabiliteden sorumludur. I/R hasarı süresince lökosit ve endotel hücreleri adezyon molekülleri sayısını artırır. Bu durum lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit diapedezine neden olur³².

PMNL aktifleşmesi ve göç etmesini sağlayan adezyon molekülleri E-selectin, P-selektin ve L-selektindir³³.



Şekil 7. İskemi reperfüzyon hasarında lökosit – endotel etkileşimi ²

Lökosit göçü kılcal venöz damarlardan olur. Kemotaksisin sağlanması lökotrien B4, C5a ve IL-8 ile sağlanır. TNF- α , IL-1 β , PAF ve kompleman sistemi kemotaksise yardım eder³⁴.

PMNL doku hasarını elastaz salgılayarak, serbest oksijen radikalleri oluşturarak, mikrosirkülasyonu bozarak artırır. Kısır döngü gibi devamlı birbirini izleyen bu olaylar no-reflow fenomeni olarak isimlendirilir³⁵⁻³⁷.

I/R hasarında erken dönem PMNL olaya hakim olsalar da ömürlerinin kısa oluşu nedeniyle bu hakimiyet monositlere geçer².

2.5.2 ENDOTEL

Endotel hücreleri seçici geçirgen bir bariyerdir ve bu özelliği sayesinde kan ve dokular arasında madde alışverişini sağlar³⁸.

Endotel hücreleri hem SOR oluşturlar hem de onların hedefindeki hücrelerdir. Homeostazdan sorumlu endotelin(ET) ve nitrik oksit(NO) ana kaynağıdır. ET bilinen en güçlü vazokonstriktördür. NO cGMP yoluyla damar düz kaslarında relaksasyona neden olur. SOR ile reaksiyona girerek doku harabiyeti yapar³⁹⁻⁴²

Aktif nötrofillerde ve endotel hücrelerinde ksantin oksidaz da oluşmaktadır. SOR en büyük kaynağı ksantin oksidazdır. Ksantin deoksijenaz enziminin ksantin oksidaza dönüşmesi her dokuda farklı sürelerde gerçekleşir. Bu da değişik dokularda I/R hasarının farklı boyutlarda olmasını anlaşılır kılmaktadır^{43,44}.

2.5.3 KOMPLEMAN SİSTEMİ

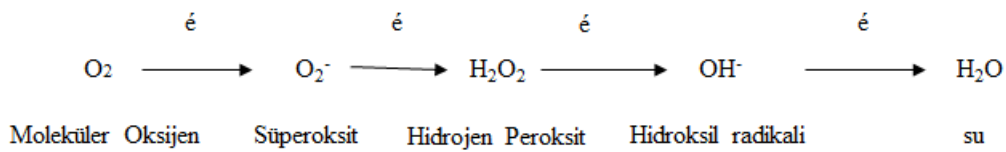
Kompleman sistemi konak savunmasını opsonizasyon, kemotaksis, lökosit aktivasyonu ve hücre ölümü yaparak sağlayan plazmada bulunan otuzdan fazla protein ve proteinlerin reseptörlerini içerir⁴⁵.

Normalde inaktif olan bu sistem reperfüzyon sırasında oluşan SOR ile klasik, alternatif ve lektin yolu olmak üzere üç şekilde etkinleşebilir. Anaflatoksinler olan C3a ile C5a sitokin yapımını artırarak, membran atak kompleksi olan C3b9 vasküler tonusu düzenleyerek kan akımını ve dolayısıyla iskemik bölgeye lökosit adezyonunu artırarak reperfüzyon hasarında en etkili olan sistem elemanlarıdır⁴⁶.

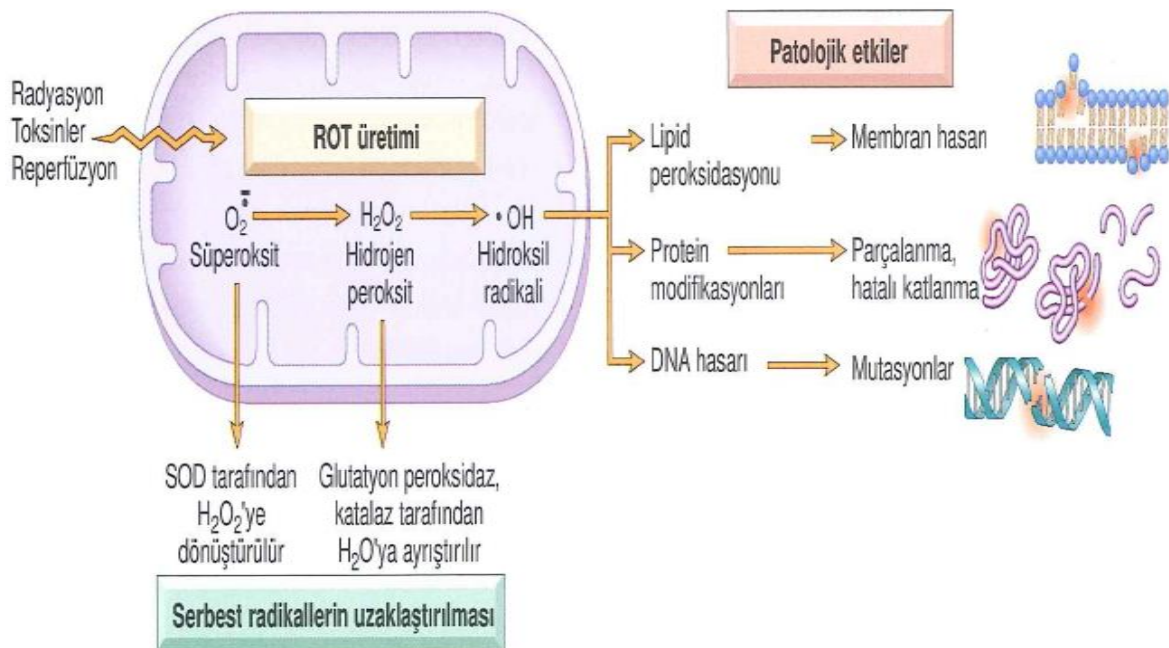
Kompleman sistemi tarafından VCAM-1, ICAM-1, E-selektin ve P-selectin uyarılarak lökosit adezyonu artırılır. C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1'i artırarak lökosit kemotaksisi ve aktivasyonunu sağlar. Endotelde ise vasküler tonusu cGMP'yi azaltarak bozar⁴⁷.

2.5.4 SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ(SOR)

Serbest oksijen radikalleri son yörüngelerinde çiftleşmemiş bir elektron bulunan molekülerdir. Ömürleri kısa sürelidir. Sağlıklı hücrelerde hemen inaktif duruma getirilirler²³.

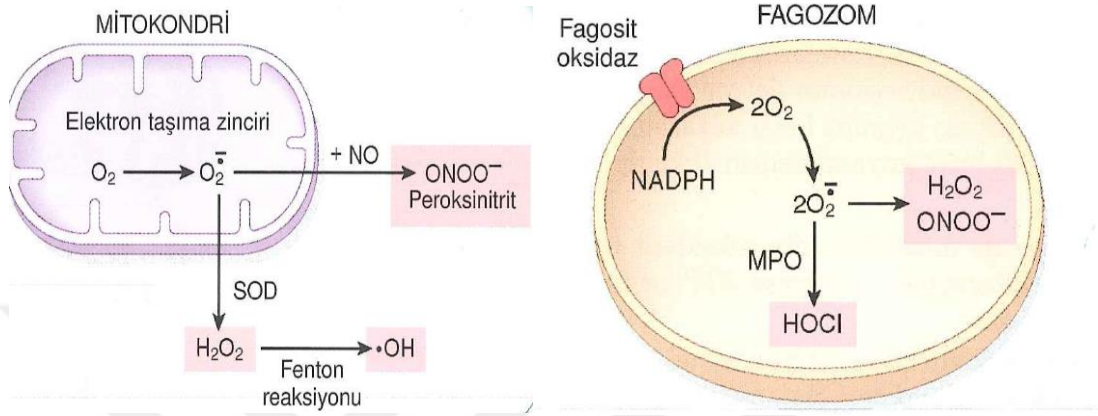


Şekil 8. Haber-weiss Reaksiyonu ile moleküler oksijenin tek değerlikli indirgenmesi sonucu SOR oluşması⁴⁸



Şekil 9. Reaktif oksijen türevlerinin hücre hasarında üretilmesi, uzaklaştırılması ve rolü²

O_2^- ve OH^- en önemli serbest oksijen radikallerinden olup glutatyon ve katalaz gibi enzimlerle inaktif hale getirilirler. Böylece hücre hasarından korunulur⁴⁹.



Şekil 10. Reaktif oksijen türevlerinin üretim yolları ²

İskemi sırasında artan Ca^{+2} proteazları aktifleyerek ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Azalan ATP ve artan AMP hipoksantini artırır. Hipoksantin ksantin dehidrogenaz ile yıkılır ve serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Hücre için asidoza kayması demirin transferrinden ayrılmasına neden olur. Bu durum Fenton Reaksiyonu ile OH^- oluşturur⁵⁰.

Tablo 2.Radikal olan ve radikal olmayan reaktif bileşikler ⁵¹

RADİKALLER	RADİKALOLMAYANLAR	
Süperoksit radikal (O_2^-)	Hidrojen Peroksit(H_2O_2)	Singlet Oksijen
Hidroksil radikal (OH^-)	Hipoklorik asit ($HOCL$)	
Peroksil radikal (LOO^-)	Lipid Hidroperoksit ($LOOH$)	
Alkoksil radikal (LO^-)		

Tablo 3.Serbest radikallerin kaynakları⁵²

SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI
Normal biyolojik faaliyetler (Oksijenli solunum – Anabolik ve Katabolik faaliyetler)
İskemi – hemoraji – travma – radyoaktivite – intoksikasyon – ksenobiyotik maddeler gibi oksidatif stress yapıcı durumlar
Oksidan Enzimler (Ksantin oksidaz – İndolamin dioksijenaz – Triptofan dioksijenaz – Galaktoz oksidaz – Siklooksijenaz – Lipooksijenaz – Mono amino oksidaz
Stress ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
Nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler gibi fagositik inflamatuvar hücrelerden salgılanma
Kronik Metabolik Hastalıklar
Yaşlanma
Güneş Işını, sigara, sıcak maruziyeti

2.5.4.1. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN HASAR MEKANİZMALARI

Lipit peroksidasyonu; yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile oksidasyona uğraması ile olur. Lipit zinciri bitene kadar ya da anti oksidan mekanizmalar dereye girene kadar bu peroksidasyon devam eder. Bu peroksidasyonlar sonucu son ürün olarak malondialdehit(MDA) oraya çıkar⁵³.

Tablo 4. Serbest oksijen radikallerinin zararları⁵¹

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN ZARARLARI
Hücre membranı ve organellerindeki protein ve lipid yapısını bozarlar
Hücre içi yararlı enzimlerin etkisizleştirirler
DNA harabiyeti yaparlar
Mitokorilerdeki aerobik solunumu bozarlar
Elastas, fosfolipaz, proteaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, indolamin dioksijenaz, ksantin oksidaz, galaktoz oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi litik enzimleri aktive ederler.
Potasyum kaybını artırırılar.
Trombosit agregasyonunu artırırılar.
Fagositlerin toplamasını kolaylaştırırılar.
Hücre dışı kollajen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.

DNA parçalanması: Timin ve sitozin hidroksil gibi serbest radikallerin etkisine en duyarlı nükleotidlerdir. Bu noktalardan DNA zinciri kırılması ve nükleik asit bazlarının modifikasyonu görülür. DNA polimerazın inhibe edilmesi de ayrıca DNA sentezini engeller. Mitokondriyal DNA'da nükleer DNA'ya göre tamir işlemleri zayıf olduğundan etkilenme oranı daha fazladır^{54,55}.

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Aminoasitlerin serbest radikaller ile hasarlanmasıyla proteinleri yapılarında değişiklik olur. Sistin, sistein, histidin, metiyonin triptofan ve tirozin gibi sülfür içeren moleküller radikallere daha duyarlıdır. Na-K-ATP_{az} ve Ca-ATP_{az} pompaları, tiyol gruplarının serbest oksijen radikalleri ile oksidasyonları sonucu işlevlerini kaybederler. Sonuç olarak hücre içi ve dışı arasında iyon dengesi bozulur. Bu da hücre hasarına neden olur⁵⁶⁻⁵⁹.

Karbonhidratlar oksidasyonu: glukoz ve diğer bazik monosakkaritler oksidasyona uğrayarak dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturabilir⁵⁹.

2.5.5. ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR

Oksidanlara karşı beş önemli mekanizma vardır¹.

- 1- Toksik radikallerin metal iyonu bağlanarak engellenmesi
- 2- Oluşan medikallerin toplanması ve bastırılması
- 3- Radikal zincir reaksiyonlarının kırılması
- 4- Hedef moleküllerin tamiri ve ya tamir edilemeyenlerin uzaklaştırılması
- 5- Antioksidan kapasitenin artırılması

2.5.5.1. ANTİOKSİDANLAR

2.5.5.1.1. ENZİM YAPIDA OLAN ANTİOKSİDANLAR

Süperoksit dismutaz(SOD) : O_2^- radikalinin H_2O_2 'ye dismutasyonunun katalizörlüğünü yapar⁶⁰.

Tablo 5.Enzim olan endojen antioksidanlar⁶¹

ENZİM OLAN ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR
Süperoksit dismutaz (SOD)
Glutasyon S-Transferaz (GST)
Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)
Katalaz
Hidroperoksidaz
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi

Glutasyon Peroksidaz : Yapısında selenyum bulunur. Süperoksit dismutazın katalizör görevi yaptığı reaksiyon sonucu ortaya çıkan H_2O_2 nin peroksidasyonunda katalizör görevi yapar. H_2O ve glutasyon oluşur⁶².

Katalaz : Peroksizomlarda üretilen hidrojen peroksiti su ve oksijene yıkılmasında etkilidir⁶³.

2.5.5.1.2. ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR

Mannitol, salisilik asit, allopürinol, oksipürinol, kalsiyum kanal blokörleri (verapamil, nifedipin), ibuprofen, deferroksamin, siklosporin, metoprolol, karvedilol ve amiodaron gibi ilaçların antioksidan özellikleri olduğu belirtilmektedir¹.

Tablo 6. Enzim olan endojen antioksidanlar⁶¹

ENZİM OLMAYAN ANTİOKSİDANLAR		
Bilirubin	Transferrin	Seruloplazmin
Melatonin	Ferritin	Laktoferrin
Hemoglobin	Sistein	Glutasyon
Miyoglobin	Albümin	Metiyonin

Ferritin, transferrin, haptoglobin, hemopeksin, seruloplazmin, albümin doğal antioksidanlardır⁶⁴.

Tablo 7. Vitamin olan antioksidanlar⁶¹

VİTAMİN OLAN ANTİOKSİDANLAR
α -tokoferol (vitamin E)
β -karoten
Askorbik asit (vitamin C)
Folik asit (folat)

Tablo 8. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar ⁶¹

İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR
Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (asetilsistein, ebselen)
Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol)
NADPH Oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler)
Rekombinant süperoksit dismutaz
Trolox-C (vitamin E analogu)
Barbitüratlar
Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)
Demir şelatörleri
Nötrofil adezyon inhibitörleri
Sitokinler (TNF, IL-1)

2.5.5.1.3. ZİNCİR KIRAN ANTİOKSİDANLAR

Askorbik asit, tiyoller, tokoferol, ürik asit, bilirübin, beta karoten, ubikinol ve flavonoidler örnek verilebilir. Hem hücrenin içinde hem de dışında bulunabilirler⁶³.

2.6. TOTAL OKSİDAN DURUM (TOTAL OKSİDAN STATUS) (TOS)

Kalorimetrik ve tam otomatik bir yöntemdir. Ferröz iyon-o-dianisidin kompleksinin oksidanlar tarafından ferrik iyonla oksitlenirler. Gliserol ile tepkime üç katına kadar hızlanır. Asidik ortamda xilenol orange ile ferrik iyonların birleşmesi renkli bir kompleks oluşur. Spektrofotometrik olarak kompleksin rengi ölçülür. Bu durum oksidanların seviyesiyle ilgilidir¹².

2.7. TOTAL ANTİOKSİDAN DURUM (TOTAL ANTİOKSİDAN STATUS) (TAS)

Tam otomatik bir yöntem olup vücudun radikallere karşı antioksidan kapasitesini ölçer. Mavi-yeşil olan 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgenmesiyle olur¹¹.

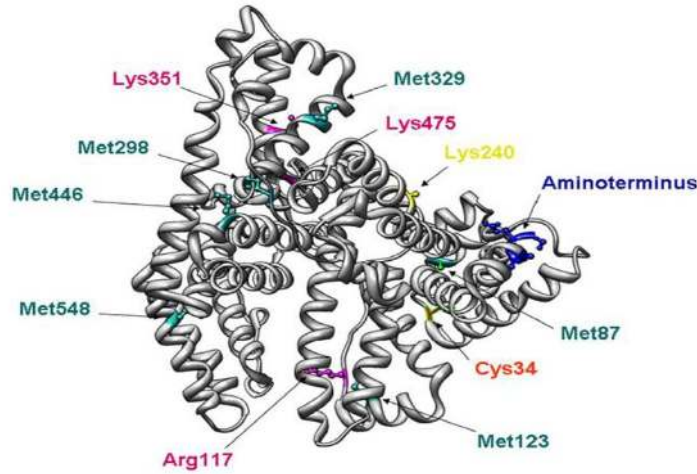
Oksidatif stresin belirlenmesinin total olarak yapılması ayrı ayrı hesaplanmasına göre hem zaman hem de ekonomik olarak daha avantajlıdır. Antioksidanlar sinerjistik etkileşirler. Çok sayıda antioksidan molekül olsa da total antioksidan duruma en fazla katkı albümin, ürik asit ve askorbik asitten gelir. Antioksidanların bazılarının seviyesinin azalmasını diğer antioksidanlar kompanse edebilir. Bundan dolayı total ölçüm daha kıymetli veriler sağlar^{65,66}.

2.8. OKSİDATİF STRESS İNDEKSİ (OSİ)

100xTOS/TAS şeklinde hesaplanır. Birimi Trolox equivalent/L'dir.

2.9. THIOL/DİSÜLFİD HOMEOSTAZİ (TDH)

Sülfür(S) ve hidrojen(H) atomlarının oluşturduğu sülfidril(-SH) gurubunun karbon(C) atomuna bağlanmasıyla tiyoller oluşur. Cıvaya da bağlandıkları için merkaptanlar olarak da geçerler. Albümin, protein ve düşük molekül ağırlıklı olan sistein, sisteinil lisin, glutatyon, homosistein, gama glutamil sistein plazmadaki asıl tiyollerdir^{67,68}.



Şekil 11. Albüminin yapısı ve bağlanma bölgeleri ⁶⁹

Oksidatif stres sonrası meydana gelen oksidanlar tiyoller tarafından etkisizleştirilirler. Bu etkisizleştirme reaksiyonunda disülfid(-S-S) bağları ortaya çıkar. Serbest olan bu disülfid bağları hidrojen ile birleşerek tekrar nativ tiyol oluşur. Bu döngüye tiyol disülfid homeostazı denir^{70,71}.

Yeni geliştirilen ölçüm yöntemleriyle nativ tiyol(-SH), dinamik disülfid(-S-S-), ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Geliştirilen bu yöntemin tam otomatik olması dolayısıyla çok pratik ,ucuzdur. Aynı zamanda manuel olarak da kullanılabilen spektrofotometrik bir tetkik olup plazma TDH'yi göstermiştir¹³.

2.10. KARVAKROL

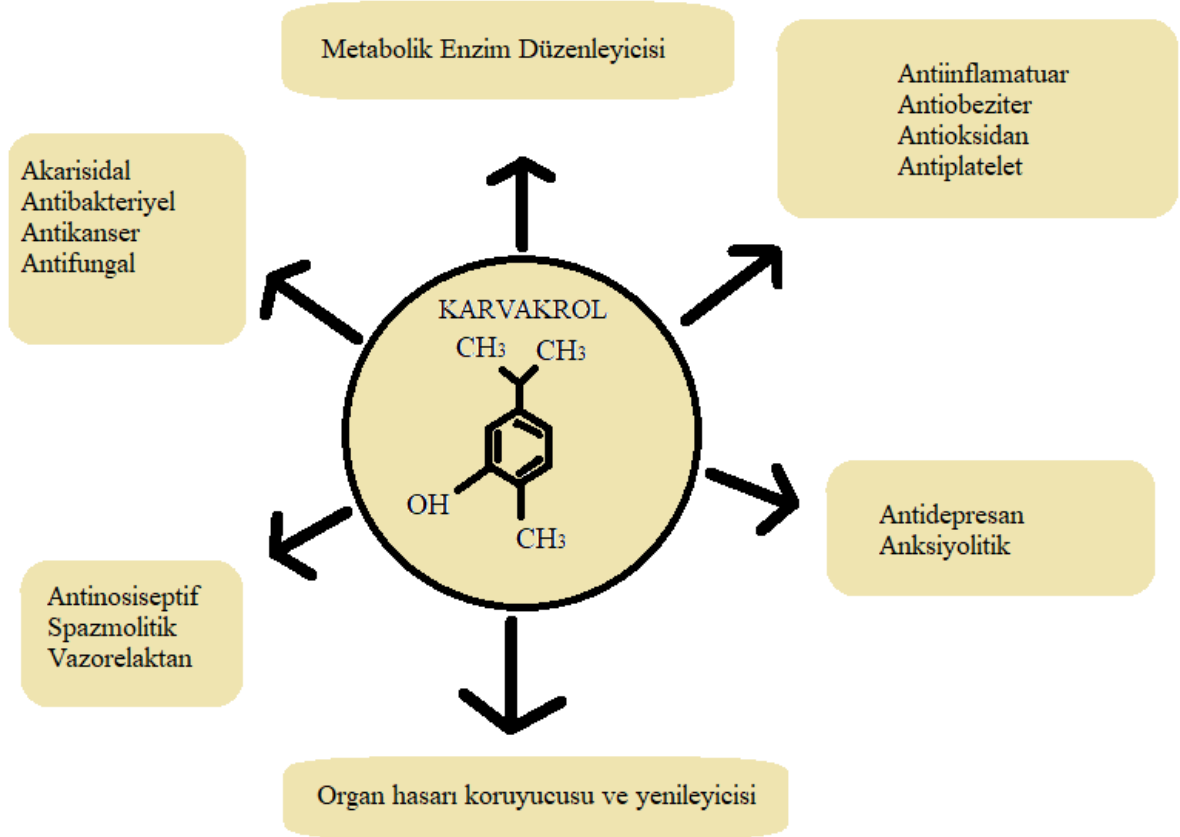
Karvakrol Labiatae (ballıbabagiller) ailesinden elde edilir. Ülkemizde kekik olarak isimlendirilen bu cinsler güçlü antioksidan etkili bir bitkidir¹⁶.

Türkiye’de kullanılan kekiklerin hepsi ballıbabagiller ailesine dahil Origanum, Thymbra, Coridothymus, Satureja ve thymusdur. Karvakrol 2-metil-5-(1- metiletil) –fenol bileşik kimyasal ismiyle bilinen, Labiatae familyasından elde edilen, Origanum, Stureja, Thymbra, Thymus gibi bitkilerde çok bulunan esansiyel yağların ana bileşeni olan monoterpetik fenol türevidir⁷²⁻⁷⁴.

Bitkilerden elde edilen kimyasal maddelere fitokimyasallar denir. Yakın tarihlerde birçok hastalık ve durumlarda kullanılmaktadır. Birçok çeşitli bitkilerden elde edilen fitokimyasallar kanser hücrelerini apoptozise yönlendirebilir, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak bu radikallerin sebep olduğu olumsuz etkileri yavaşlatabilir^{75,76}.

Karvakrolün antibakteriyel, antifungal, akarisidal, antikanser, antioksidan, antiplatelet, antiinflamatuvar, antinosiseptif, antiobeziter, antidepresan, antianksiyolitik, organ koruyucu ve

yenileyici, metabolik enzim düzenleyici, spazmolitik, vazorelaktan ve membran hasarı yapma etkilerinin olduğu birçok makale yayınlanmıştır¹⁵.



Şekil 12. Karvakrolün moleküler yapısı ve etkileri¹⁵

Karvakrolün membran hasarı yapması patojenlere karşı savunmanın aslını oluşturur. Hücre membranının protonlara olan geçirgenliğin artması, hücre içi ATP miktarında azalma meydana getirir. Bu mekanizma patojenlere karşı savunma sağlar⁷⁷.

Karvakrol, hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu doza bağımlı olarak arttırdığı, kalsiyum homeostazisinde önemli rolü olduğu, hücresel göçü ve invazyonu da azalttığı gözlemlenmiştir^{78,79}.

Karvakrol, güçlü antioksidan olarak bilinen askorbik asit ve E vitamini gibi özellikleri sayesinde serbest oksijen radikallerinin etkilerini azaltmaktadır⁸⁰.

Çeşitli çalışmalarda indüklenmiş DNA hasarına karşı karvakrolün antigenotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir⁸¹⁻⁸⁴.

Tablo 9. Karvakrol ile yapılmış in vivo ve in vitro çalışmalar ve biyolojik etkileri ¹⁵

Biological purpose	Significant carvacrol finding(s)	Reference(s)
Antibacterial	- Inhibits <i>E. coli</i> and <i>L. monocytogenes</i> biofilms - Inhibits biofilm formation and reduces preformed biofilms of <i>S. typhimurium</i> and <i>S. aureus</i> - Susceptibility of Verocytotoxigenic <i>E. coli</i> increases with decreasing temperature, water activity, and pH - Active against <i>S. enterica</i> on celery and oysters - Active against <i>V. cholerae</i> in carrot juice - Eradicates preformed <i>S. aureus</i> and <i>S. epidermidis</i> biofilms - Effective against <i>M. avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i> - Effective against resistant <i>C. jejuni</i> - Effective against <i>E. sakazakii</i> - Effective against resistant <i>P. aeruginosa</i> - Effective against <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i>, and <i>L. sakei</i> - Influences long chain unsaturated fatty acids of <i>S. typhimurium</i> and <i>B. thermosphacta</i>	(Perez-Conesa et al., 2011) (Rivas et al., 2010) (Ravishankar et al., 2010) (Rattanachaiunsopon and Phumkhachorn, 2010) (Nostro et al., 2009) (Wong et al., 2008) (Ravishankar et al., 2008) (Lee and Jin, 2008) (Cox and Markham, 2007) (Gill and Holley, 2006) (Di Pasqua et al., 2006) (Knowles et al., 2005)
Antifungal	- Inhibition of ergosterol biosynthesis and the disruption of membrane integrity - Eradicates <i>Candida</i> biofilms - Exerted an anticandidal effect in oral candidiasis model - Exerted an anticandidal effect in vaginal candidiasis model	(Ahmad et al., 2011) (Dalleau et al., 2008) (Chami et al., 2005) (Chami et al., 2004)
Acaricidal	- Activity against <i>A. craccivora</i> and <i>L. separata</i> - Activity against <i>C. quinquefasciatus</i> larvae and <i>M. domestica</i> - Activity against the two-spotted spider mite (<i>T. urticae</i> Koch)	(Tang et al., 2011) (Pavela, 2011) (Cavalcanti et al., 2010)
Anticancer	- Anticarcinogenic properties against MDA-MB 231 breast cancer cell lines - Anticarcinogenic and antiproliferative properties against Leiomyosarcoma - Anticarcinogenic properties against A549 lung cancer cell lines	(Arunasree, 2010) (Karkabounas et al., 2006) (Koparal and Zeytinoglu, 2003)
Antioxidant	- Prevents diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats - Antioxidant effect against Galactosamine-induced hepatotoxicity - Protects against DNA damage	(Jayakumar et al., 2011) (Aristatle et al., 2009b; Aristatle et al., 2011) (Slamenova et al., 2007; Slamenova et al., 2008; Slamenova et al., 2011)
Antiplatelet	- Induces a reduction in thromboxane A2 production	(Karkabounas et al., 2006)
Anti-inflammatory	- Inhibition of inducible cyclooxygenase-2	(Landa et al., 2009; Hotta et al., 2010)
Antinociceptive	- Reduces pain in mice	(Guimaraes et al., 2010)
Anti-obesity	- Prevents high-fat diet induced obesity	(Cho et al., 2011)
Antidepressant/Anxiolytic	- Contains antidepressant-like and anxiolytic properties on mice	(Melo et al., 2010; Melo et al., 2011)
Organ protection & regeneration	- Increases rat liver regeneration rate after partial hepatectomy - Induces collagen production - Protects the liver against ischemia and reperfusion injury	(Uyanoglu et al., 2008) (Lee et al., 2008) (Canbek et al., 2008)
Metabolic enzyme modulations	- Inhibits UDP-glucuronosyltransferases metabolizing enzymes - Increases the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes	(Dong et al., 2011) (Sasaki et al., 2005)
Spasmolytic	- Contains inhibitory effects on muscarinic receptors on guinea pig trachea - Contains strong acetylcholinesterase inhibitory properties <i>in vitro</i>	(Boskabady et al., 2011) (Jukic et al., 2007)
Vasorelaxant	- Induces relaxation in rat isolated aorta - Induces arterial relaxation	(Peixoto-Neves et al., 2010) (Earley et al., 2010)
Microcapsule encapsulation for Antibiotic delivery	- Encapsulation in flexible films inhibits <i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i>, <i>L. innocua</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, and <i>Aspergillus niger</i> - Encapsulation in liposomes improves stability and loading - Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles show antimicrobial activity against <i>S. aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>, and <i>E. coli</i> - Encapsulation in calcium-alginate hydrogels inhibits <i>E. coli</i> - Encapsulation in surfactant micelles inhibits <i>E. coli</i> and <i>L. monocytogenes</i>	(Guarda et al., 2011) (Coimbra et al., 2011) (Chen et al., 2009; Keawchaoon and Yoksan, 2011) (Wang et al., 2009) (Gaysinsky et al., 2005; Perez-Conesa et al., 2006)

Karvakrolün antiinflamatuvar, antioksidan ve sitoprotektif etkilerinin bilateral renal iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu böbrek hasarını azaltabileceğini düşündürmektedir⁸⁵.

Retinada patolojik anjiyogenez, VEGF, TNF- α düzeylerini önemli seviyede azalttığı gösterilmiştir⁸⁶.

Karvakrol uygulanan sıçanlarda katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon bağımlı antioksidan enzimlerin hem seviyelerinin hem etkilerinin arttığı gösterilmiştir⁸⁷.

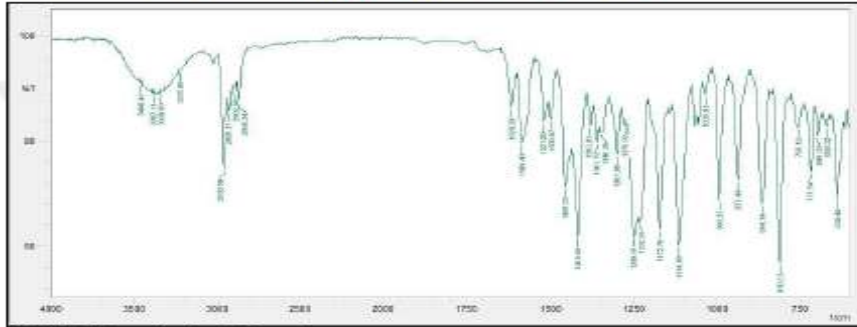
2.10.1 KARVAKROLÜN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Yüksek düzeyde uçucu yağ içermeleri ve bunun esas bileşenlerinin timol ve karvakrol olması ihracatı yapılan çinslerin ortak özelliğidir. Karvakrol ve timol kekiğe koku veren ve anti etkinlikler veren fenolik bileşiklerdir. Uçucu yağların %78-82sini oluştururlar⁸⁸.

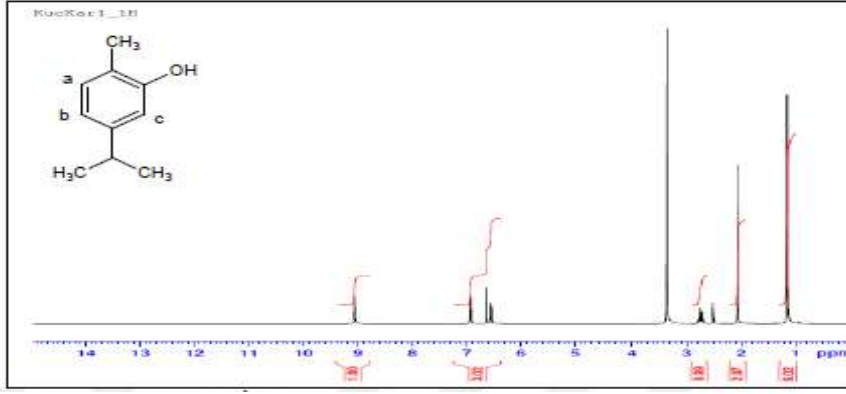
Spektral Bulgular

IR spektrumu:

$\tilde{\nu}_{maks.}$ (cm⁻¹): 3460 (O-H g.b.), 3338, 3220 (aromatik C-H g.b.), 2958, 2926 ve 2808 (alifatik C-H g.b.), 1620 ve 1590 (C=C g.b.), 1458, 1417 ve 1380 (alifatik C-H e.b.), 1172 (C-O-C g.b.), 864 ve 810 (trisüstitüe benzene ait C-H e.b.).



Şekil 13. Karvakrole ait IR spektrumu⁸⁸



Şekil 14. Karvakrole ait H-NMR spektrumu⁸⁸

Kimyasal ismi: 2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol

CAS kayıt no: 499-75-2

Kapalı formülü: C₁₀H₁₄O

Molekül ağırlığı: 150,22 g/mol

Erime sıcaklığı: 0°C

Kaynama sıcaklığı: 236-237°C

Yoğunluğu: 0,976 g/cm³

Suda çözünürlüğü: 1,25 g/l (25°C)

Fiziksel hali: Sıvı

Renk: Açık sarı

Safılık düzeyi: % 98⁸⁹.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'nun 03.03.2021 tarih ve 2020/08 numaralı karar alındıktan sonra Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

Çalışmada 3-4 aylık 300-400g ağırlıkları arasında 36 adet Spraque – Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Tüm ratlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) standart palet sıçan yemi (210 kcal/100 gr/gün) ile beslendi, musluk suyu verildi. Deneyden 12 saat önce, su hariç beslenmeleri durduruldu. Deney yeterli hava sirkülasyonu ve çevre ısısının sağlandığı odalarda gerçekleştirildi. Deneyde kullanılacak tüm ratlar yapılacak işlemler öncesinde tartılarak vücut ağırlıkları not edildi.

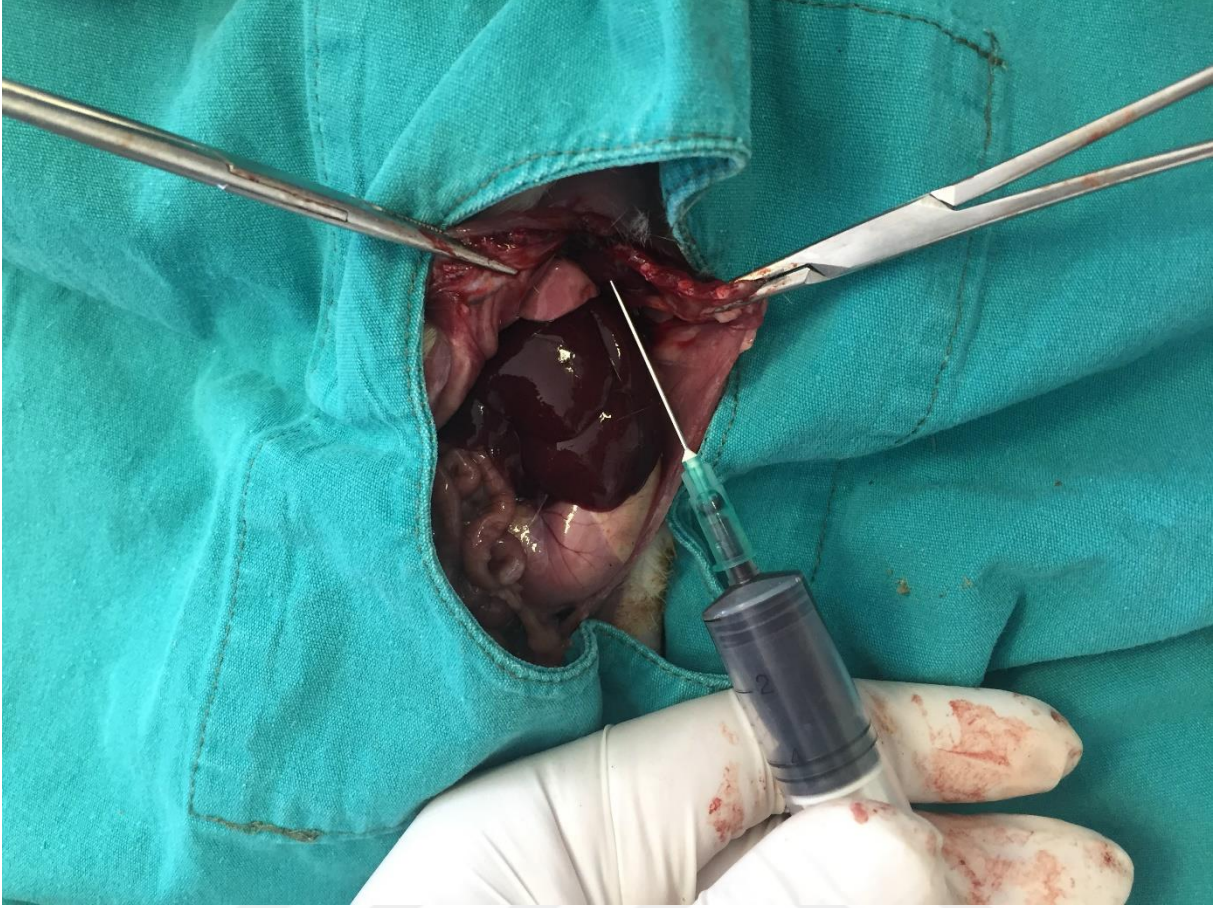
3.1 Deney ve Cerrahi

Tüm ratlar 12 saat açlık sonrası 90/10 mg/kg Ketamin/ksilazin i.m. ile anestezi uygulandı. Deney süresince gereklilik durumunda Ketamin ek doz uygulandı. Ratların spontan solunumları devam ettirildi.



Şekil 15. Ratların sol arka bacaklarının hazırlanması

Ratların sol arka bacak cildi aseptik hazırlandıktan sonra cilt cilt altı doku açıldı femoral arter ve ven bulunup serbestleştirildi, lastik teyp ile bağlanarak 60 dk iskemi oluşturuldu. 60 dk sonra lastik teyp kaldırıldı. Ratlara gruplarına göre heparin, karvakrol, heparin+karvakrol, DMSO uygulandı. 60 dk sonra femoral iskemi değerlendirildi. Sol arka bacakta soluklaşma, iskemik renk değişiklikleri ve distal nabızların olmaması iskemi olarak değerlendirildi. Sol arka bacak renginin normale dönmesi ve distal nabız varlığı revaskülarizasyon olarak değerlendirildi.



Şekil 16. Ratlardan İntrakardiyak Kan Alınması

3.2 Deney Grupları

Toplam 36 adet rat, 6'şarlı 6 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Sham kontrol) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestleştirildi. Damarlara herhangi bir işlem yapılmadı. Femoral Bölge 4/0 ipek sütur ile kapatıldı. İskemi/reperfüzyon süresi olan toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve TiyoI disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

Grup 2 (İskemi-reperfüzyon) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestlenerek lastik teyp ile bağlandı. 60 dk sonra lastik teyp açıldı. Herhangi bir ilaç

verilmedi. Distal perfüzyon 60 dk gözlemlendi. Toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve tiyol disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

Grup 3 (Karvakrol) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestlenerek lastik teyp ile bağlandı. 60 dk sonra lastik teyp açıldı. 5mg/kg karvakrol ip olarak reperfüzyon sürecinde verildi. Distal perfüzyon 60 dk gözlemlendi. Toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve Tiyol disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

Grup 4 (DMSO) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestlenerek lastik teyp ile bağlandı. 60 dk sonra lastik teyp açıldı. 20mg/kg DMSO ip olarak reperfüzyon sürecinde verildi. Distal perfüzyon 60 dk gözlemlendi. Toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve Tiyol disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

Grup 5 (heparin) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestlenerek lastik teyp ile bağlandı. 60 dk sonra lastik teyp açıldı. 0,1mg/kg heparin im olarak reperfüzyon sürecinde verildi. Distal perfüzyon 60 dk gözlemlendi. Toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve Thiol disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

Grup 6 (heparin + karvakrol) (n=6) : Femoral bölge açıldı. Arter ve ven serbestlenerek lastik teyp ile bağlandı. 60 dk sonra lastik teyp açıldı. 0,1mg/kg heparin im ve 5mg/kg karvakrol olarak reperfüzyon sürecinde verildi. Distal perfüzyon 60 dk gözlemlendi. Toplam 120 dk sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek sol arka bacakları eksize edildi. Kan örnekleri alındı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme amaçlı patoloji bölümüne, kan örnekleri TAS, TOS ve Tiol disülfid seviyesi değerlendirilmeleri için biyokimya bölümüne gönderildi.

3.3. Biyokimyasal İşlemler

İntrakardiyak, biyokimya tüplerine alınan örnekler oda sıcaklığında pıhtılaşma süreci bitene dek bekletildi. Pıhtılaşma süreci tamamlanınca 1500 devirde, 15 dakika, +4 °C’de soğutmalı santrifüj ile santrifüj edilerek serum ayrıldı. Serum örnekleri eppendorf tüplerine alınarak -80° C’de çalışma gününe kadar donduruldu. Çalışma günü örnekler çözündürülerek TAS, TOS ve tiol-disülfid dengesi parametreleri çalışıldı.

3.3.1. TİYOL-DİSÜLFİT DENGESİ PARAMETRELERİ ÖLÇÜMÜ

Örneklerin tiyol-disülfid dengesi parametreleri düzeyleri ticari olarak mümkün olan Nativ Tiyol ve total tiyol ölçüm kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Bu kitlerin prensibi Erel ve Neşelioğlu tarafından tarif edilmiş yöntemde dayanmaktadır. SH-SS dengesi parametreleri belirlenmesinde iki paralel ölçme işlemi yapıldı. İlk olarak serumda hâlihazırda bulunan SH düzeyi Nativ Tiyol ölçüm kiti kullanılarak belirlendi. Sonrasında total tiyol kiti kullanılarak serumda bulunan SS’ler de SH’lara indirgendikten sonra tekrar ölçüm yapıldı. Bu ikinci ölçümden elde edilen değer, hâlihazırda bulunan SH ve SS’lerin indirgenmesinden gelen SH düzeylerini içerdiği için total tiyol (TT) olarak ifade edilmektedir. TT ile SH değerleri arasındaki farkın yarısı SS düzeyleri olarak hesaplandı. TT, SH ve SS düzeyleri $\mu\text{mol/L}$ birimi ile verildi. SS/SH yüzde oranı hesaplandı¹¹⁻

3.3.2. Total antioksidan durum (total antioxidant status (TAS))

TAS düzeyleri ticari olarak mümkün olan total antioxidant status ölçüm kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Bu kitte kullanılan yöntem, Erel (2) tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur. Bu yöntemin çalışma prensibi; örnekteki antioksidanların koyu mavi yeşil renkteki 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna çevirmesine dayanır. Örneğin antioksidan seviyesiyle orantılı olarak meydana gelen Absorbans değişikliği 660 nm ölçülür. Sonuçlar litrede milimol troloks equivalent olarak verildi.

3.3.3. Total oksidan durum (total oksidant status (TOS))

TOS düzeyleri ticari olarak mümkün olan total oksidant status ölçüm kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak çalışıldı. Bu kitte kullanılan yöntem, tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda "xylenol orange" ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri/L) olarak verildi¹².

3.4. Histopatolojik İnceleme

Histomorfolojik inceleme için ratlardan elde edilen kas dokuları %10'luk formalin içinde fikse edilmiştir. Kas dokularından orta hattan transvers ve longitudinal kesitler yapılarak doku takibine alınmıştır. Doku takibi sonrasında parafine gömülmüştür. Hazırlanan parafin bloklardan 3 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoxilen-eozin boyası ile boyanmıştır. Kesitler LEICA DM 2000 LED marka ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. INFINITY 3 ANALYZE Release 6.5 görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır.

Histopatolojik olarak beş en büyük büyütme alanı (x400) seçilerek bu alanlarda myosit hasarı değerlendirilmiştir. Kas liflerinde dejenerasyon, disorganizasyon, hücreler arası ayrışma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz, konjesyon, hemoraji 0-3 arasında semikantitatif olarak skorlanmıştır.

Buna göre;

Patoloji yok ise skor 0

Hafif (fokal) patoloji varlığında skor 1

Orta (multifokal) patoloji varlığında skor 2

Şiddetli (diffüz) patoloji varlığında skor 3 olarak skorlanmıştır.

3.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler öncesinde verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi, normal dağılım gösterenler tek yönlü varyans analizi ve post-hoc test olarak Tukey testi kullanıldı.

Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Kruskal Wallis testi, post-hoc test olarak Mann-Withney U testi kullanıldı. P değeri 0.05'den küçük bulunduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmada 6 grup ve her grupta 6 adet olmak üzere toplam 36 adet rat kullanıldı. Grup 1 'Kontrol', grup 2 'İskemi reperfüzyon', grup 3 'Karvakrol', grup 4, 'DMSO', grup 5 'Heparin', grup 6 'Heparin+Karvakrol' olarak isimlendirildi.

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Kruskal-Wallis testine göre gruplar arasında TAS(p=0.003312), TOS(p=0,0006266), Nativ Thiol(SH)(p=007705), Total Thiol (p=0,009199), Disülfid(SS)(p=0,0155) SS/SH,% (p=0,01847) istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.

Tablo 10. Biyokimyasal parametreleri istatistiksel analizi

n	grup 1 - kontrol	grup 2 - iskemi/reperfüzyon	grup 3 - karvakrol	grup 4 - DMSO	grup 5 - heparin	grup 6 - heparin +karvakrol	p değeri
TAS (Trolox Equiv. /L)	1.175 (a,b)(0.560 - 1.320)	1.310 (a,b) (0.920- 1.540)	1.380 (a) (1.2800 - 1.5200)	1.2750 (a,b) (1.2100 - 1.5800)	1.3550 (a) (1.3000 - 1.4100)	1.1350 (b) (0.9950 - 1,2100)	0.003312
TOS (μmol H2O2 Equiv./L)	5.335 (a) (2.710- 8.250)	11.76(a,b,c) (8.27- 32.87)	17.82(a,b,c) (8.11-27.45)	7.275 (a,b) (4.590 - 10.050)	20,49 (c) (15.45 - 23.77)	14.34 (b,c) (8.66 - 18.26)	0.0006266
Nativ Thiol (SH) (μmol/L)1	233.90 (a,b) (216.29- 246.71)	245.1(a,b,c) (208.4 - 429.9)	244.79 (a) (233.21 - 265.79)	211.1 (a,b,c) (161,1 - 269.5)	222.42(a,b,c) (190.06- 226.36)	201.77(c) (166.96 - 214.28)	0.007705
Total Thiol (μmol/L)2	290.98(a,b) (277.11 - 309.18)	302.3 (a,b) (252.2 - 447.0)	352.7 (a) (305.6 - 432.7)	269.0 (a,b) (220.0 - 325.9)	309.4 (a,b) (275.1 - 343.3)	277.60 (b) (252.57 - 299.09)	0.009199
disülfid (SS) (μmol/L)	30.57 (a,b) (20.97 - 41.41)	27.30 (a,b,c) (8.57 - 49.56)	48.2 (a,c) (29.3 - 99.7)	27.24 (b) (5.54 - 35.52)	48.29 (c) (26.28 - 60.50)	39.16 (c) (32.10 - 51.00)	0.0155
SS/SH, %	12.76 (a) (8.91 - 18.59)	11.02 (a) (1.99 - 20.22)	18.83 (a,b) (11.54 - 42.77)	13.55 (a) (2.05 - 18.29)	23.90 (b) (11.81 - 27.22)	21.09 (b) (14.98 - 30.55)	0.01847

TAS Sonuçları:

TAS değerlerine bakıldığında grup 1 (1.175 (0.560 - 1.320)), grup 2 (1.310 (0.920- 1.540)), grup 3 (1.380 (1.2800 - 1.5200)), grup 4 (1.2750 (1.2100 - 1.5800)) ve grup 5 (1.3550

(1.3000 - 1.4100)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$) Grup 1, grup 2, grup 4 ve grup 6 (1.1350 (0,9950 - 1,2100)) arasında da anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$),. Grup 6, grup 3 ve grup 5'e göre anlamlı fark bulunmuştur($p<0.05$).

TOS Sonuçları:

TOS değerleri, grup 1(5.335 (2.710-8.250), grup 2 (11.76 (8.27-32.87)), grup 3 (17.82 (8.11-27.45)) ve grup 4 (7.275 (4.590 - 10.050)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2, grup 3, grup 5 (20,49 (15.45 - 23.77)) ve grup 6 (14.34 (8.66 - 18.26)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$).

Native Tiyol Değerleri:

Nativ tiyol değerleri, grup 1 (233.90 (216.29-246.71)), grup 2 (245.1 (208.4 - 429.9)), grup 3 (244.79 (233.21 - 265.79)), grup 4 (211.1 (161,1 - 269.5)) ve grup 5 (222.42 (190.06-226.36)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2, grup 4, grup 5 ve grup 6 (201.77 (166.96 - 214.28)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 6, grup 3 ve grup 1 den anlamlı farklı bulunmuştur($p<0.05$).

Total Tiyol Değerleri:

Total tiyol değerleri, grup 1 (290.98 (277.11 - 309.18)), grup 2 (302.3 (252.2 - 447.0)), grup 3 (352.7 (305.6 - 432.7)), grup 4 (269.0 (220.0 - 325.9)) ve grup 5 (309.4 (275.1 - 343.3)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$), grup 1, grup 2, grup 4, grup 5 ve grup 6 (277.60 (252.57 - 299.09)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 6 ve grup 3 birbirinden anlamlı farklı bulunmuştur($p<0.05$).

Tiyol Disülfid Değerleri:

Tiyol disülfid değerleri, grup 1 (30.57 (20.97 - 41.41)), grup 2 (27.30 (8.57 - 49.56)) ve grup 3 (48.2 (29.3 - 99.7)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2, grup 3, grup 5 (48.29 (26.28 - 60.50)) ve grup 6 (39.16 (32.10 - 51.00)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$).

SS/SH % değerleri :

SS/SH % değerleri, grup 1 (12.76 (8.91 - 18.59)), grup 2 (11.02 (1.99 - 20.22)), grup 3 (18.83 (11.54 - 42.77)) ve grup 4 (13.55 (2.05 - 18.29)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 3, grup 5 (23.90 (11.81 - 27.22)) ve grup 6 (21.09 (14.98 - 30.55)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 5 ve grup 6, grup 1 grup 2 ve grup 4'ten anlamlı farklı bulunmuştur($p<0.05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Kruskal-Wallis testine göre gruplar arasında Dejenerasyon($p=0,008803$), Hücrelerde ayrışma ($p=0,001483$), İnflamasyon ($p=0,002552$) ve Konjesyon ($p=0,002442$) bulguları istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.

Tablo 11. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Değerleri

n	grup 1 - kontrol	grup 2 - iskem/reperf üzyon	grup 3 - karvakrol	grup 4 - DMSO	grup 5 - heparin	grup 6 - heparin +karvakrol	p değeri
Dejenerasyon	0.500(a) (0.000 - 1.000)	2.000 (b) (2.000-3.000)	1.000 (a,b)(0.000-3.000)	0.500 (a) (0.000-1.000)	1.000 (a) (0.000-1000)	0.500(a) (0.000-1.000)	0.008803
Disorganizasyon	0.000 (0.000-0.000)	1.000 (0.000-2.000)	0.000(0.000-1.000)	0.000(0.000-0.000)	0.000 (0.000-2.000)	0.000(0.000-1.000)	0.02599
Hücrelerde ayrışma	0.000(a) (0.000-1.000)	2.000(b) (2.000-3.000)	1.000(c) (1000-2000)	1.000(c,d)(0.00-1.000)	1.000(a,c,d) (0.000-2.000)	0.500(a,d) (0.000-1.000)	0.001483
İnflamasyon	0.000(a)(0.00-0.000)	2.000(b) (2.000-3.000)	1.500(b,c,d) (0.000-3.000)	0.500(a,c,d)(0.000-2.000)	1.000(b,c) (0.000-2.000)	0.000(a,d) (0.000-1.000)	0.002552
Nekroz	0.000(0.000-0.000)	0.000 (0.000-1.000)	0.000(0.000-1.000)	0.000(0.000-0.000)	0.000 (0.000-2.000)	0.000(0.000-0.000)	0.6379
Konjesyon	0.000(a)(0.00-1.000)	2.000(b) (2.000-3.000)	1.500(c) (1.000-2.000)	0.000(a,c)(0.00-2.000)	1.000(a,c) (0.000-2.000)	0.000(a) (0.000-1.000)	0.002442
Hemoraji	0.000(0.000-0.000)	2.000 (0.000-3.000)	0.000(0.000-2.000)	0.000(0.000-2.000)	0.000 (0.000-2.000)	0.000 (0.000-0.000)	0.03121

Dejenerasyon değerleri Grup 1 (0.500 (0.000 - 1.000)), grup 3 (1.000(0.000-3.000)), grup 4 (0.500 (0.000-1.000)), grup 5 (1.000 (0.000-1000)) ve grup 6 (0.500 (0.000-1.000)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2 (2.000 (2.000-3.000)) ve grup 3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2, grup 1 grup 4 grup 5 ve grup 6 arasında anlamlı fark bulunmuştur($p<0.05$).

Hücrelerde ayrışma değerleri grup 1 (0.000 (0.000-1.000)), grup 5 (1.000 (0.000-2.000)) ve grup 6 (0.500 (0.000-1.000)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 3 (1.000 (1000-2000)), grup 4 (1.000 (0.000-1.000)) ve grup 5 (1.000 (0.000-2.000)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 6 ve grup 4 arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$).

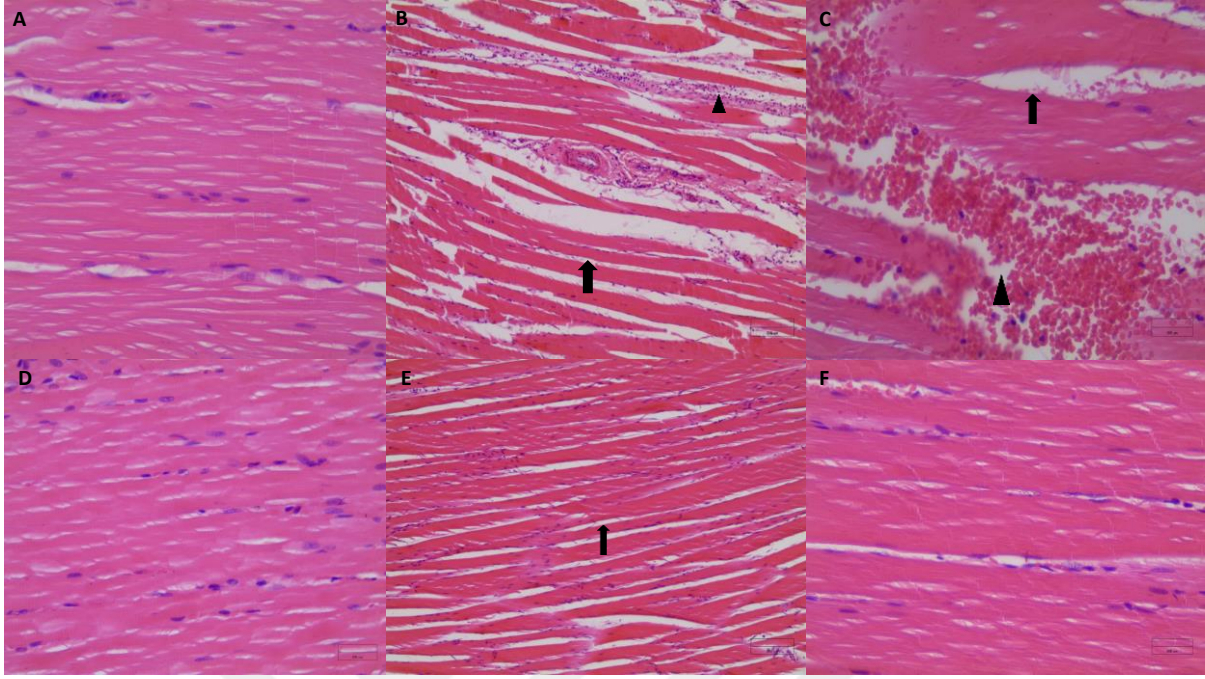
Grup 2 (2.000 (2.000-3.000)), diğer grupların hepsinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur($p<0.05$).

İnflamasyon değerleri Grup1 (0.000(0.000-0.000)), Grup 4 (0.500 (0.000-2.000)) ve Grup 6 (0.000 (0.000-1.000)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2 (2.000 (2.000-3.000)), grup 3 (1.500 (0.000-3.000)) ve grup 5 (1.000 (0.000-2.000)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2, grup 4 ve grup 6 arasında anlamlı fark bulunmuştur($p<0.05$).

Konjesyon değerleri grup 1 (0.000 (0.000-1.000)), grup 4 (0.000 (0.000-2.000)), grup 5 1.000 (0.000-2.000)) ve grup 6 (0.000 (0.000-1.000)))) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 3 (1.500 (1.000-2.000)), grup 4, grup5)) arasında anlamlı fark bulunmamıştır($p>0.05$). Grup 2 (2.000 (2.000-3.000)) diğer grupların hepsinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur($p<0.05$).

Kruskal-wallis testi ve bonferroni testine göre gruplar arasında Disorganizasyon, Nekroz ve Hemoraji bulguları istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır($p>0.05$).

4.3 Kas dokusunun histopatolojik görüntüleri



Şekil 17. Kas Dokusunun Histopatolojik görüntüleri

Resim A: Kontrol grubu HEX400, Düzenli kas lifleri ve kaslarda çizgilenme mevcut, inflamasyon yok

Resim B: İskemi reperfüzyon grubu HEX100: Kas liflerinde ayrışma, dejenerasyon (ok) ve belirgin inflamasyon (ok başı) mevcut

Resim C: İskemi reperfüzyon grubu HEX400: Kas liflerinde belirgin ayrışma (ok) ve kas lifleri arasında hemoraji (ok başı) mevcut.

Resim D: Heparin+Karvakrol grubu HEX400: Kas liflerinde ayrışma yok, inflamasyon ve hemoraji mevcut değil

Resim E: Heparin grubu HEX100: Kas liflerinde hafif dejenerasyon mevcut (ok), ancak inflamasyon ve hemoraji yok

Resim F: Karvakrol HEX400: Kas lifleri arasında belirgin ayrışma izlenmemektedir. Hemoraji ve inflamasyon mevcut değil.

5.TARTIŞMA

Hayvansal organizmalar yaklaşık iki yüz farklı, toplam yüz trilyon ökaryot hücreden oluşur^{17,18}. Hücreler adaptasyon mekanizmalarını kullanarak homeostazı sürdürmeye çalışırlar. Adaptif mekanizmaların eşiği aşılsa hücre zedelenmesi oluşur. Reversibl ve irreversibl olabilen hücre hasarı eğer irreversibl olursa hücreler apoptozis ya da nekroza uğrarlar².

Hücre hasarı oluşturan en önemli etken oksijen azlığı olmakla birlikte kimyasal etkenler, enfeksiyöz etkenler, immünolojik reaksiyonlar genetik bozukluklar, beslenme dengesizlikleri, fiziksel etkenler (travma, ısı, elektrik, radyasyon, atmosfer basınç değişiklikleri vb.), yaşlanma sayılabilir².

Hücre hasarının en sık görülen tipi iskemidir. İskemi hipoksinin en sık nedenidir. İskemide anaerobik metabolizmanın etkili olması laktik asit ve zararlı yan ürünleri oluşturur. Tüm bunlar asidoza neden olur, hücre membranı zarar görür, protein sentezi azalır ve hücre çekirdeği zarar görür¹⁹⁻²¹.

İskemi sonrası tekrar reperfüzyonun sağlanması gerekli olmakla birlikte iskemik dokuda biriken zararlı ürünlerin dolaşıma katılmasıyla daha büyük bir hasara da neden olabilir. Reperfüzyon hasarının büyüklüğü iskemik kalınan süre ile doğru orantılıdır²⁴⁻²⁶.

İskemi reperfüzyon hasarında etkili olan faktörler, nötrofiller, endotel hücreleri, kompleman sistemi, serbest oksijen radikalleri ve antioksidan mekanizmaların çalışmamasıdır. Bunlar arasında en önemli faktör ise serbest oksijen radikalleridir³¹.

İskemi reperfüzyon hasarında ilk harekete geçen hücreler nötrofillerdir. Damar geçirgenliğinden sorumludurlar. Ömürlerinin kısa oluşu nedeniyle hakimiyet monositlere geçer^{2,32}.

Endotel seçici geçirgen bir bariyerdir, madde alışverişini sağlar. Bilinen en güçlü vazokonstriktördür olan endotelini salgılar, NO'nun ana kaynağıdır. Ksantin Oksidaz da oluştururlar. SOR 'un en önemli kaynağı ksantin oksidazdır³⁵⁻⁴¹.

Kompleman sistemi normalde inaktiftir fakat SOR ile klasik, alternatif ve lektin yolu olmak üzere üç yol da etkinleşir. İskemik bölgeye lökosit adezyonunu artırır. Böylece reperfüzyon hasarında en etkili sistemdir^{45,46}.

SOR sağlıklı hücrede inaktif duruma getirilirler. Fakat iskemik durumlarda aktifleşerek hücre hasarına neden olurlar²³.

SOR hasar mekanizmaları, lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması, proteinlerin oksidatif modifikasyonu, karbonhidratların oksidasyonudur. Antioksidan mekanizmalar ise toksik radikallerin metal iyonu bağlanarak engellenmesi, oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hedef moleküllerin tamiri ve ya tamir edilemeyenlerin uzaklaştırılması, antioksidan kapasitenin artırılmasıdır^{1,53-59}.

Antioksidanlar enzim olanlar, enzim olmayalar ve zincir kıran antioksidanlar olarak ayrılırlar. Enzim olanlar, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, katalaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz vb. enzim olmayanlar, Ferritin, transferrin, haptogloblin, hemopeksin, seruloplazmin, albümin, melatonin, sistein, metiyonin, hemoglobin, laktoferrin, glutatyon, mannitol, salisilik asit, allopürinol, oksipürinol, kalsiyum kanal blokörleri (verapamil, nifedipin), ibuprofen, deferroksamin , siklosporin, metoprolol, karvedilol, amiodaron vb. Zincir kıran antioksidanlar, Askorbik asit, tiyoller, tokoferol, ürik asit, bilirübin, beta karoten, ubikinol ve flavonoidler örnek verilebilir^{1,63,64}.

TOS, Kalorimetrik ve tam otomatik bir yöntemdir. Ferröz iyon-o-dianisidin kompleksi oksidanlar tarafından ferrik iyonla oksitlenir. Gliserol ile tepkime üç katına kadar hızlanır.

Asidik ortamda xylenol orange ile ferrik iyonların birleşmesi renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak kompleksin rengi ölçülür. Bu durum oksidanların seviyesiyle ilgilidir¹².

TAS, Tam otomatik bir yöntem olup vücudun radikallere karşı antioksidan kapasitesini ölçer. Mavi-yeşil olan 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgenmesiyle olur¹¹.

Oksidatif stresin belirlenmesinin total olarak yapılması ayrı ayrı hesaplanmasına göre hem zaman hem de ekonomik olarak daha avantajlıdır. Antioksidanlar sinerjistik etkileşirler. Çok sayıda antioksidan molekül olsa da total antioksidan duruma en fazla katkı albümin, ürik asit ve askorbik asitten gelir. Antioksidanların bazılarının seviyesinin azalmasını diğer antioksidanlar kompanse edebilir. Bundan dolayı total ölçüm daha kıymetli veriler sağlar^{65,66}.

Albümin, protein ve düşük molekül ağırlıklı olan sistein, sisteinil lisin, glutatyon, homosistein, gama glutamil sistein plazmadaki asıl tiyollerdir^{67,68}. Yeni geliştirilen ölçüm yöntemleriyle nativ tiyol(-SH), dinamik disülfid(-S-S-), ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Geliştirilen bu yöntemin tam otomatik olması dolayısıyla çok pratik, ucuzdur. Aynı zamanda manuel olarak da kullanılabilen spektrofotometrik bir tetkiktir¹³.

Karvakrol labiatae (ballıbabagiller) ailesinden elde edilir. Ülkemizde kekik olarak isimlendirilen bu cinsler güçlü antioksidan etkili bir bitkidir. Türkiye’de kullanılan kekiklerin hepsi ballıbabagiller ailesine dâhil Origanum, Thymbra, Coridothymus, Satureja ve thymusdur. Yüksek düzeyde uçucu yağ içermeleri ve bunun esas bileşenlerinin timol ve karvakrol olması ihracatı yapılan çinslerin ortak özelliğidir. Karvakrol ve timol kekiğe koku veren ve anti etkinlikler veren fenolik bileşiklerdir^{16,83}.

Karvakrolün antibakteriyel, antifungal, akarisidal, antikanser, antioksidan, antiplatelet, antiinflamatuvar, antinosiseptif, antiobeziter, antidepresan, antianksiyolitik, organ koruyucu ve yenileyici, metabolik enzim düzenleyici, spazmolitik, vazorelaktan ve membran hasarı yapma etkilerinin olduğu birçok makale yayınlanmıştır¹⁵.

Karvakrolün membran hasarı yapması patojenlere karşı savunmanın aslını oluşturur. Hücre membranının protonlara olan geçirgenliğinin artması, hücre içi ATP miktarında azalma meydana getirir. Bu mekanizma patojenlere karşı savunma sağlar. Karvakrol, hücre içi kalsiyum mobilizasyonunu doza bağımlı olarak arttırdığı, kalsiyum homeostazisinde önemli rolü olduğu, hücresel göçü ve invazyonu da azalttığı gözlemlenmiştir. Karvakrol, güçlü antioksidan olarak bilinen askorbik asit ve E vitamini gibi özellikleri sayesinde serbest oksijen radikallerinin etkilerini azaltmaktadır. Çeşitli çalışmalarda indüklenmiş DNA hasarına karşı karvakrolün antigenotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir⁷⁷⁻⁷⁸. Retinada patolojik anjiyogenez, VEGF, TNF- α düzeylerini önemli seviyede azalttığı gösterilmiştir⁸⁶.

Suo ve ark. 2014 yılında iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan rat karaciğerinde yaptıkları çalışmaya göre karvakrol, serum ALT, AST seviyelerini ve karaciğer hücrelerinin apoptozunu azaltarak, iskemi reperfüzyon kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruma sağladıklarını göstermişlerdir. Biz de bu çalışmamızda alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına karşı karvakrolün koruma sağladığıyla ilgili benzer sonuçlara ulaştık. Aynı çalışmada karvakrolün Malondialdehit içeriğini önemli ölçüde azaltarak, SOD aktivitesini, katalaz ve glutatyon içeriğini artırarak, antioksidan etkili olduğu da gösterilmiştir⁹⁰.

Öztürk ve ark. 2017 de iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan rat böbreklerinde yaptıkları çalışmaya göre karvakrol, serum BUN ve kreatinin seviyelerini azalttığı, doku MDA, miyeloperoksidaz değerlerini azalttığı ve epitel hücreleri ve tübüler epitelde rejenerasyon gözlemlenmiştir⁹¹. Bizim çalışmamızda biyokimyasal markerlar spesifik değil total

hesaplandığından dolayı fark bulunmamış olsa da histopatolojik olarak çalışmamızı desteklemektedir.

Guan ve ark. 2019 da yaptıkları araştırmaya göre karvakrol glutatyon peroksidaz ekspresyonunu artırarak iskemi/reperfüzyon yapılan hipokampal nöronları koruduğu, SOD proteininin ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığı, Oksidatif stresin demir iyonu seviyesini artırması ve demir yüklenmesinin serbest radikaller üretmesi sonucu nöronlarda ölüme neden olabileceğini, karvakrolün ferroptozu önleyerek bu ölümleri engelleyebileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada karvakrolün İskemi reperfüzyon hasarına karşı nöronları koruması bizim çalışmamızı desteklemektedir⁹².

Çetinkaya A. ve Çamsarı Ç.'nin 2020 yılında yaptıkları araştırmaya göre karvakrol uygulamasının spinal iskemi modellerinde motor fonksiyonun geliştiğini göstermiştir. Yapılan bu çalışma karvakrolün sadece femoral iskemilerde değil diğer iskemilerde de etkili olduğunu göstermektedir⁹³.

SONUÇLAR

Bu çalışmamızda femoral arter-ven klemplenmesi sonrası TAS, TOS THDS ve iskelet kasında histopatolojik değişiklikler üzerine karvakrolün etkisi araştırıldı.

Karvakrolün femoral iskemi reperfüzyon hasarında hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak olumlu etkilerinin olduğu gözlenmektedir. Karvakrolün hem FIR hem de diğer iskemi reperfüzyon modellemelerinde etkilerinin hücre düzeyinde mekanizmalarının daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyokimyasal olarak TAS, TOS, tiyol disülfitin bazı gruplar arasında anlamlı fark bulunamasa da başka çalışmalarda biyokimyasal markerların spesifik incelenmesi bizim çalışmamızda ise total duruma bakılması literatür ile çalışmamız arasında fark olmasına neden olmuş olabilir.

Histopatolojik olarak Dejenerasyon, Hücrelerde ayrışma, İnflamasyon ve Konjesyon bulguları istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Çalışmamız bu konularda literatür ile uyumludur. Gruplar arasında Disorganizasyon, Nekroz ve Hemoraji bulguları istatistiksel olarak anlamsız çıkmıştır.

Çalışmamızda karvakrolün genel olarak I/R hasarında olumlu yönde etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır. Bu bulgularımızın tüm etkilerinin ortaya çıkartılması ve pratikte de uygulanabilmesi için daha fazla deneysel ve klinik araştırmaya gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Duran E (Editör) Kalp ve damar cerrahisi Birinci baskı İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi. *Kalp ET. damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı.*; 2004.
2. Kumar V, Abbas AK, Aster jC. Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U editors: NTK. *Hücre Hasarı, Hücre Ölümü ve Adaptasyon İnflamasyon ve Onarım.*; 2014.
3. Saba D, Yavuz H, Şenkaya I, Ağrıç M, Özer Z, Özkan H EA. The Effects Of Calcium Dobesilate On Skeletal Muscle Ischemia. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Derg.* 2000;8(4):797–801.
4. Hinder RA SH. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg.* 1991;125(1):104–105.
5. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D HH. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991;78(6):651–655. doi:10.1002
6. Xu Y, Huo Y, Toufektsian M-C, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD et al. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2006;290(2):692–699.
7. Krötz F, Sohn H-Y PU. Reactive oxygen species players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):1988–1996.
8. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Karchevsky E, Graf E, Vidne BA. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species? *J Trauma.* 1999 Oct;47(4):691-8. doi: 10.1097/00005373-199910000-00013. PM.

9. Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1991 Dec;23(12):1359-74. doi: 10.1016/0022-2828(91)90183-m. PMID.

10. Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Feb;284(2):H566-74. doi: 10.1152/ajpheart.00711.200.

11. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004 Apr;37(4):277-85. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015. PMID: 15003729.

12. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103–1111. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008

13. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 2014;47(18):326–332. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.09.026

14. Colovic MB, Vasic VM, Djuric DM, Krstic DZ. Sulphur-containing Amino Acids: Protective Role Against Free Radicals and Heavy Metals. *Curr Med Chem.* 2018 Jan 30;25(3):324-335. doi: 10.2174/0929867324666170609075434. PMID: 28595554.

15. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(3):304-18. doi:10.1080/10408398.2011.653458. PMID: 24915411.

16. Akgül, A., Ayar, A. 1993. Yerli baharatların antioksidan etkileri. *Doga-TR. J. of*

- Agriculture and Forestry. 17: 1061-1068.
17. *Basic Histology, Tenth Edition, 2003 – L.C. Junqueira, Jose Carneiro. Çeviri editörleri: Prof.Dr.Yener Aytekin, Doç.Dr.Seyhun Solakoğlu. Nobel Tıp Kitabevi - 2006.*
 18. 10. Edisyon, Arthur C. Guyton, John e. Hall Ç editörü: PDHÇ. *Textbook of Medical Physiology.*; 2011.
 19. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 2008 Jun 1;147(1):153-9. doi: 10.1016/j.jss.2007.06.015. Epub 2007 Jul 27. PMID: 1770786.
 20. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004;24(6):468-75. doi: 10.1002/micr.20060. PMID: 15378577.
 21. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994 May;81(5):637-47. doi: 10.1002/bjs.1800810504. PMID: 8044536.
 22. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res.* 2005 Aug;39(1):57-65. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00215.x. PMID: 15978058.
 23. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004 Oct 19;70:71-86. doi: 10.1093/bmb/ldh025. Erratum in: *Br Med Bull.* 2005;73-74:139. PMID: 15494470.
 24. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am.* 1992

- Feb;72(1):65-83. doi: 10.1016/s0039-6109(16)45628-8. PMID: 1731390.
25. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989 Aug;257(2 Pt 1):G299-307. doi: 10.1152/ajpgi.1989.257.2.G299. PMID: 2504053.
 26. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. *Cardiovasc Res.* 2006 May 1;70(2):200-11. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.01.024. Epub 2006 Mar 20. PMID: 16545349.
 27. No Title. *Maxwell SR, Lip GY Reperfus Inj a Rev Pathophysiol Clin manifestations Ther options Int J Cardiol* 1997 Jan 31;58(2)95-117 doi:10.1016/s0167-5273(96)02854-9 PMID 9049675.
 28. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol.* 1998 Jun;18(6):3112-9. doi: 10.1128/MCB.18.6.3112. PM.
 29. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, Miyata M, Inoue T, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res.* 1995 May;58(5):485-90. doi: 10.1006/jsre.1995.1076. PMID: 7745960.
 30. Parr DR, Wimhurst JM, Harris EJ. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res.* 1975 May;9(3):366-72. doi: 10.1093/cvr/9.3.366. PMID: 1175182.
 31. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res.* 2000 Feb 4;86(2):117-8. doi: 10.1161/01.res.86.2.117. PMID: 10666403.

32. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14. doi: 10.1016/0092-8674(94)90337-9. PMID: 7507411.
33. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Dec;27(12):2514-23. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151456. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17872453.
34. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology*. 1996 Jun;23(6):1656-63. doi: 10.1002/hep.510230649. PMID: 8675190.
35. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 2002 Feb 27;73(4):493-9. doi: 10.1097/00007890-200202270-00001. PMID: 11889418.
36. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*. 1990 May;66(5):1436-44. doi: 10.1161/01.res.66.5.1436. PMID: 2159391.
37. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*. 2003 Dec 9;108(23):2911-7. doi: 10.1161/01.CIR.0000101917.80668.E1. Epub 2003 Dec.
38. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, Arfors KE, Flodgaard H, Lindbom L. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing

- link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med.* 2001 Oct;7(10):1123-7.
39. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008 Feb-Mar;48(2-3):109-14. doi: 10.1016/j.vph.2008.01.003. Epub 2008 Jan.
 40. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg.* 1996 Feb;83(2):162-70. PMID: 8689154.
 41. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988 Dec;255(6 Pt 2):H1269-75. doi: 10.1152/ajpheart.1988.255.6.H1269. PMID: 3059826.
 42. Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ.* 2003 Apr;10(4):468-76. doi: 10.1038/sj.cdd.4401181. PMID: 12719724.
 43. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi Dergisi.* 2000;8(1):10-6.
 44. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar A, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bulteni.* 2001;2(4):154-67.
 45. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34-50. doi: 10.1038/cr.2009.139. Epub 2009 Dec 15. PMID: 20010915.

46. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg.* 2009 Jun;249(6):889-99. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181a38f45. PMID: 19474697.
47. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol.* 1999 Nov 15;101(2):1.
48. Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MA, Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide.* 2005 Nov;13(3):196-203. doi: 10.1016/j.nio.
49. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des.* 2004;10(19):2401-10. doi: 10.2174/1381612043384015. PMID: 15279617.
50. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res.* 1996 Jul;25(1):57-74. doi: 10.3109/10715769609145656. PMID: 8814444.
51. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):14S-22S. doi: 10.1016/0002-9343(91)90279-7. PMID: 1928205.
52. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.* 1987 Oct;107(4):526-45. doi:

- 10.7326/0003-4819-107-4-526. PMID: 3307585.
53. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen kosullar. Klinik gelism. 1998;11(1-2):336-41.
 54. Dizdaroğlu M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins, DNA and free radicals, Edited by Halliwell B, Aruoma OI, New York, 19-39, 1993.
 55. Viinikka L, Vuori J, Ylikorkala O. Lipid peroxides, prostacyclin, and thromboxane A2 in runners during acute exercise. Med Sci Sports Exerc. 1984 Jun;16(3):275-7. PMID: 6379367.
 56. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem. 1987 Jul 15;262(20):9895-901. PMID: 3036875.
 57. Maridonneau I, Braquet P, Garay RP. Na⁺ and K⁺ transport damage induced by oxygen free radicals in human red cell membranes. J Biol Chem. 1983 Mar 10;258(5):3107-13. PMID: 6298224.
 58. Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem. 1987 Apr 25;262(12):5488-91. PMID: 3571220.
 59. Wolf S.P., Garner A., Dean R.T., Freen radicals, lipids and protein degradation. TIBS 11: 27-31, january 1986.
 60. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):181-90. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.025. Epub 2006 Mar 3. PMID: 16580655.
 61. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int

- J Biomed Sci. 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.
62. Demiryürek AT, Kennedy S, Wainwright CL, Wadsworth RM, Kane KA. Influence of nitric oxide on luminol-enhanced chemiluminescence measured from porcine-stimulated leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997 Sep;30(3):332-7. doi: 10.1097/00005344-199709000-0001.
 63. Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziklerin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Dergisi.* 2003;11:87-98.
 64. Biesalski HK, Böhles H, Esterbauer H, Fürst P, Gey F, Hundsdörfer G, Kasper H, Sies H, Weisburger J. Antioxidant vitamins in prevention. *Clin Nutr.* 1997 Jun;16(3):151-5. doi: 10.1016/s0261-5614(97)80245-2. PMID: 16844591.
 65. Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res.* 1996 Feb;29(2):175-83. PMID: 8731346.
 66. Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Battino M, Ochoa JJ, Mataix J. Plasma antioxidants are strongly affected by iron-induced lipid peroxidation in rats subjected to physical exercise and different dietary fats. *Biofactors.* 1998;8(1-2):119-27. doi: 10.1002/bio.
 67. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000 Aug;72(2 Suppl):653S-69S. doi: 10.1093/ajcn/72.2.653S. PMID: 10919972.
 68. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:244-253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23747983; PMCID: PMC3909715.

69. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005 Oct 14;353(1):38-52. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.075. PMID: 16169013.
70. Cremers CM, Jakob U. Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *J Biol Chem.* 2013 Sep 13;288(37):26489-96. doi: 10.1074/jbc.R113.462929. Epub 2013 Jul 16. PMID: 23861395; PMCID: PMC3772196.
71. Jones DP, Liang Y. Measuring the poise of thiol/disulfide couples in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov 15;47(10):1329-38. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.021. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19715755; PMCID: PMC2774737.
72. Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F, Sokmen A. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum a.*
73. Rodrigues MR, Krause LC, Caramão EB, dos Santos JG, Dariva C, Vladimir de Oliveira J. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. *J Agric Food Chem.* 2004 May 19;52(10):3042-7. doi:
74. De Vincenzi M, Stamatii A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia.* 2004 Dec;75(7-8):801-4. doi: 10.1016/j.fitote.2004.05.002. PMID: 15567271.
75. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis.* 2007 Feb;28(2):233-9. doi: 10.1093/carcin/bgl243. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151090.

76. Khan HY, Zubair H, Ullah MF, Ahmad A, Hadi SM. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Curr Drug Targets*. 2012 Dec;13(14):1738-49. doi: 10.2174/138945012804545560. PMID: 23140285.
77. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Oct;65(10):4606-10. doi: 10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999. PMID: 10508096; PMCID: PMC91614.
78. Chan AS, Pang H, Yip EC, Tam YK, Wong YH. Carvacrol and eugenol differentially stimulate intracellular Ca²⁺ mobilization and mitogen-activated protein kinases in Jurkat T-cells and monocytic THP-1 cells. *Planta Med*. 2005 Jul;71(7):634-9. doi: 10.1055/s-20.
79. Dai W, Sun C, Huang S, Zhou Q. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2016 Apr 18;9:2297-304. doi: 10.2147/OTT.S98875. PMID: 27143925; PMCID: PMC4846059.
80. Mastelić J, Jerković I, Blazević I, Poljak-Blazi M, Borović S, Ivancić-Baće I, Smrecki V, Zarković N, Brcić-Kostić K, Vikić-Topić D, Müller N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *J* .
81. Quintero Ruiz N, Córdoba Campo Y, Stashenko EE, Fuentes JL. Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation-induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species. *Photochem Photobiol*. 2017 Jul;93(4):1063-1072. doi: 10.1111/php.12735. Epub 2017 M.
82. Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Pugalandi KV. Pharmacological effect of carvacrol on D: -galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by

- single-cell gel electrophoresis. *J Nat Med.* 2011 Jul;65(3-4):568-77. doi: 10.1007/s11418-011-05.
83. Ozkan A, Erdogan A. A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Nat Prod Commun.* 2012 Dec;7(12):1557-60. PMID: 23413548.
 84. Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Veeramani C, Pugalendi KV. Protective Effect of Carvacrol on Oxidative Stress and Cellular DNA Damage Induced by UVB Irradiation in Human Peripheral Lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2015 Nov;29(11):497-507. doi:
 85. Ozturk H, Cetinkaya A, Duzcu SE, Tekce BK, Ozturk H. Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018 Feb;98:656-661. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.060. Epub 2.
 86. Kaymaz A, Ulaş F, Çetinkaya A, Erimşah S. Investigating the effects of carvacrol in rats using oxygen-induced retinopathy model. *Indian J Ophthalmol.* 2021 May;69(5):1219-1223. doi: 10.4103/ijo.IJO_1935_20. PMID: 33913864; PMCID: PMC8186611.
 87. Sivaranjani A, Sivagami G, Nalini N. Chemopreventive effect of carvacrol on 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):755-62. doi: 10.4103/0973-1482.154925. PMID: 27461646.
 88. K. Husnu Can Baser, “ Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils”, *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14(29) .

<https://doi.org/10.2174/138161208786404227>.

89. Azirak, S., 2007, Thymol ve Carvacrol'un in vivo genotoksik etkilerinin araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
90. Suo L, Kang K, Wang X, vd. Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats. *PLoS One*. 2014;9(8):1–10. doi:10.1371/journal.pone.0104043
91. Ozturk H, Cetinkaya A, Duzcu SE, Tekce BK, Ozturk H. Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;98(November 2017):656–661. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.060
92. Guan X, Li X, Yang X, vd. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation. *Life Sci*. 2019;235(May):116795. doi:10.1016/j.lfs.2019.116795
93. Çetinkaya A, Çamsari Ç. Effects of carvacrol administration on motor function following spinal ischemia and reperfusion. Published online 2020:440–445. doi:10.3906/zoo-2006-18