2024

DOKTORA TEZİ

Elif Merve Betül YANILMAZ

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLOFOSFAMİD İLE MİYELOSUPRESYON İNDÜKLENEN RATLARDA TİMOKİNONUN HEMATOPOİETİK FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Elif Merve Betül YANILMAZ

TIBBİ FİZYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2024

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLOFOSFAMİD İLE MİYELOSUPRESYON İNDÜKLENEN RATLARDA TİMOKİNONUN HEMATOPOİETİK FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Elif Merve Betül YANILMAZ

Prof. Dr. Mehmet Salih KAYA

TIBBİ FİZYOLOJİ PROGRAMI

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2022-2360 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2024

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Siklofosfamid ile Miyelosupresyon İndüklenen Ratlarda Timokinonun Hematopoietik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Elif Merve Betül YANILMAZ

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet Salih KAYA

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU
Prof. Dr. Mehmet Salih KAYA
Prof. Dr. Kadir DESDİCİOĞLU
Prof. Dr. Ethem GELİR
Doç. Dr. Faik ÖZDENGÜL

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Sena KAPLAN
Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

17.05.2024

Elif Merve Betül YANILMAZ

Bana değerli bir isim miras bırakan Biricik Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tezimin tüm aşamalarında değerli bilgileri, anlayışı ve ilgisiyle akademik eğitimime ışık tutan, desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Salih KAYA'ya,

Lisansüstü eğitiminde önemli olan farklı bir perspektiften bakmayı bana öğreten, kıymetli bilgileri ve anlayışlı tavrıyla bana yol gösteren AYBÜ Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU'na, her zaman hedeflediğim akademik çalışma hayatıma başlamamda ve sürdürmemde emeği geçen hem hocam hem değerli bir büyüğüm olarak çok sevdiğim ve desteğini her zaman hissettiğim değerli Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN'a teşekkür gönül borcumdur.

Tez çalışmamın histolojik incelemelerini yapan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hem çalışma arkadaşım hem ablam olarak gördüğüm Sayın Doç. Dr. Ebru ANNAÇ'a, tez çalışmalarım boyunca laboratuvar tecrübelerini benimle paylaşarak katkı sunan Sayın Doç. Dr. Esra BOZGEYİK, Doç. Dr. İbrahim BOZGEYİK, Dr. Öğr. Üyesi. Gülsün MEMİ, Ar. Gör. Safiye Beyza DURSUN'a, tez çalışmamı yürüttüğüm Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki hocalarıma ve iş arkadaşlarıma, projeme maddi imkân sağlayan AYBÜ BAP Birimi'ne destekleri için teşekkür ederim.

Beni ben yapan, gücünü ve desteğini daima hissettiğim Anneme ve varlıklarıyla hayatıma anlam katan tüm aileme beni hiç yalnız bırakmadıkları için sonsuz teşekkürler.

Minicik kalbiyle bana ilham olan, çalışma saatlerim boyunca sabırla bekleyen biricik kızım Zeynep Derin YANILMAZ'a, ilk kalp atışından itibaren akademik hayatımın stresine maruz kalan oğlum Ali Kerem YANILMAZ'a ve yaşantımın her anında olduğu gibi bu süreçte de sevgisini ve desteğini eksik etmeyen, hayatımda olduğu gibi akademik yolculuğumda da yüküme ortak olan kıymetli eşim Mehmet Kadir YANILMAZ'a canı gönülden teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1 Kemoterapi 4

2.1.1. Alkilleyici İlaçlar ve Siklofosfamid 5

2.1.2. Siklofosfamidin Kullanım Alanları 5

2.1.3. Siklofosfamidin Yapısal Özellikleri 5

2.1.4. Siklofosfamid Toksisitesi 7

2.2. Hematopoez 8

2.2.1 Embriyonik Hematopoez 8

2.2.1. Yetişkinlerde Hematopoez 11

2.3. Kemik İliğinin Yapısal Organizasyonu ve Hematopoezdeki Rolü 13

2.3.1. Hematopoietik Kök Hücre 14

2.4. Hematopoietik Kök Hücreden Farklılaşma Süreci 15

2.4.1. Eritropoez 15

2.4.2. Miyelopoez (Granülopoez) 19

2.4.3. Trombopoez 19

2.5. Hematopoietik Sitokinler 21

2.5.1. Eritropoietin (EPO) 23

2.5.2. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G–CSF) 24

2.5.3. Trombopoietin (TPO) 25

2.5.4. Kök Hücre Faktörü (SCF) 25
2.5.5. Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (CSF–1) 26
2.5.6. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G–CSF) 26
2.5.7. Granülosit–Monosit Koloni Uyarıcı Faktör (GM–CSF) 27
2.5.8. İnterlökin–3 (IL–3) 27
2.5.9. İnterlökin–5 (IL–5) 28
2.5.10. İnterlökin–7 (IL–7) 28
2.6. Miyelosupresyon 28
2.6.1. Anemi 31
2.6.2. Trombositopeni 31
2.6.3. Lökopeni 32
2.7. Siklofosfamid ve Miyelosupresyon 32
2.7.1. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Anemi 33
2.7.2. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Trombositopeni 33
2.7.3. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Lökopeni 34
2.8. *Nigella sativa* ve Timokinon 34
2.8.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri 35
2.8.2. Timokinonun Farmakolojik Etkileri 35
3. MATERYAL ve YÖNTEM 39
3.1. Etik Kurul İzni 39
3.2. Deney Hayvanları 39
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler 39
3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri 40
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü 42
3.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması 44
3.5.2. Kan ve Doku Örneklerinin Eldesi 45
3.5.3. Kemik Numunelerinin Hazırlanması 45

3.6. Analizler 45
3.6.1. Hematolojik Analizler 45
3.6.2. Histopatolojik Analizler 46
3.6.3. Biyokimyasal Analizler 47
3.7. İstatistiksel Analiz 50
4. BULGULAR 51
4.1. Canlı Ağırlık Bulguları 51
4.2. Hematolojik Bulgular 52
4.3. Hematopoietik Sitokin Bulguları 64
4.4. Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Bulgular 67
4.5. Histopatolojik Bulgular 69
4.5.1. Histopatolojik Skorlama 69
4.5.2. Femur, Epifiz ve Diyafiz Bölgesine Ait Örneklerin Histopatolojik Değerlendirmesi 70
4.5.3. Sternum Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirmesi 74
5. TARTIŞMA 76
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 83
7. KAYNAKLAR 85
8. EKLER 94
Ek–1: Etik Kurul Onayı 94
Ek-2: Özgeçmiş 95

ÖZET

Siklofosfamid ile Miyelosupresyon İndüklenen Ratlarda Timokinonun Hematopoietik Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Siklofosfamid (SP) antineoplastik kemoterapi ilacıdır. Fakat toksik yan etkilerinin çokluğu sebebiyle kullanım alanı kısıtlanmakta tedavinin çeşitli basamaklarını olumsuz etkilemektedir. SP tedavisi alan hastalarda miyelosupresyon gelişmesi temel problemdir. Timokinon (TK) uzun süredir geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanım alanı bulmuş, terapötik etkileri çokça araştırılmış, antioksidan etkisi ortaya konmuş, bir fitokimyasaldır. Bu çalışmada SP tedavisi alan sıçanlarda meydana gelen miyelosupresyona karşı TK'nın koruyucu etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada ağırlık ortalaması 230-250 gr olan 32 adet 8–10 haftalık erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanıldı. Her grupta eşit hayvan olacak şekilde (n=8) dört grup oluşturuldu. Kontrol grubu, TK grubu (10 mg/kg TK), SP grubu (50 mg/kg SP), TK+SP grubu (10 mg/kg TK ve 50 mg/kg SP). TK günlük olarak intragastrik gavajla verilirken, SP haftada bir kez toplamda dört kez olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla verildi. 28 günlük uygulama sonunda hayvanlar anestezi altında kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Sıçanlarda SP ile indüklenen miyelosupresyona karşı TK'nın koruyucu etkinliği hematolojik parametreler (WBC, Neu, Lym, Mono, Eos, Baso, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT), kemik iliği histopatolojisi, hematopoietik büyüme faktörleri (EPO, TPO ve G–CSF) ve oksidan-antioksidan sistem parametrelerinin (MDA, GSH) ölçümleri ile belirlendi.

Verilerin analiz sonuçları incelendiğinde timokinon ilavesinin siklofosfamidin sebep olduğu canlı ağırlık artışında azalma, hematolojik parametrelerden trombosit ve lökosit sayısında baskılanma, hematopoietik sitokinlerden trombopoietin ve G-CSF seviyeleri ile oksidatif stres parametrelerinden GSH seviyelerindeki azalmayı önlediği tespit edildi. Ayrıca histopatolojik incelemelerde siklofosfamidin stromal ve hematopoietik alanlarda hasara yol açtığı ve adiposit yoğunluğunda artışa sebep olduğu, timokinon ilavesinin ise bu etkilerin ortaya çıkışını engellediği gözlendi.

Sonuç olarak, timokinonun kısmen bazı hematopoietik sitokinlerin seviyelerini koruyarak kısmen de antioksidan etkinlik göstererek siklofosfamidin sebep olduğu miyelosupresyon derecesini azaltabileceği hem hematolojik hem de histopatolojik olarak ortaya konuldu. Timokinonun kemik iliği üzerindeki olumlu etkilerinin daha net bir şekilde ortaya konulabilmesi için daha kapsamlı ve ileri düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hematopoietik sitokinler, miyelosupresyon, siklofosfamid, timokinon.

ABSTRACT

The Effect of Thymoquinone on Hematopoietic Functions in Myelosuppression Induced Rats by Cyclophosphamide

Cyclophosphamide (CP) is an antineoplastic chemotherapeutic. However, because of its excessive toxic side effects, its area of use has become limited, therefore causing several steps of treatment to be negatively affected. Myelosuppression is the main problem with patients who are being treated with CP. Thymoquinone (TQ) is a phytochemical that has long been used in traditional and complementary medicine. Its therapeutic effects have been studied thoroughly and its antioxidant effects have been proven. In this study, it was aimed to evaluate the preventative effects of TQ against myelosuppression seen in rats that are getting CP treatment.

In the study, 8-10 weeks old 32 male Sprague Dawley rats with a mean weight of 230-250 gr were used. Four groups were formed with an equal number of rats in each one (n=8). The control group, the TQ group (10 mg/kg TQ), the CP group (50 mg/kg CP), and the TQ+CP group (50 mg/kg CP and 10 mg/kg TQ) were the groups formed. TQ was given to the rats daily by intragastric gavage while CP was given by intraperitoneal injection once a week and 4 times in total. At the end of 28 days of practice, the rats were sacrificed under anesthesia by drawing blood from their hearts. The preventative effects of TQ against myelosuppression induced by CP in rats were determined by measuring the following parameters: hematologic parameters (WBC, Neu, Lym, Mono, Eos, Baso, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, PLT), bone marrow histopathology, hematopoietic growth factors (EPO, TPO and G–CSF), and oxidant-antioxidant system parameters (MDA, GSH).

When the results of data analysis were studied, it was determined that the addition of TQ prevents the following effects of CP: increase in body weight and decrease in numbers of thrombocyte and leukocyte from hematologic parameters, decrease in levels of thrombopoietin and G-CSF from hematopoietic cytokines, decrease in levels of GSH from oxidative stress parameters. In addition, it was found in histopathologic examinations that CP causes damage in stromal and hematopoietic areas and causes increase in adipocyte density, and the addition of TQ prevents these effects.

As a result, it was proven by both hematology and histopathology that TQ can, in fact, decrease the level of myelosuppression caused by CP, partially by preserving the levels of some hematopoietic cytokines, and partially by having an antioxidant effect. It was decided that more comprehensive and advanced studies were needed to reveal the positive effects of TQ on bone marrow more clearly.

Key Words: Cyclophosphamide, hematopoietic cytokines, myelosuppression, thymoquinone.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
ß	: Beta
α	: Alfa
ACR	: Akrolein
AGM	: Aort–gonado–mezonefroz bölgesi
Baso	: Bazofil
BFU–E	: Patlama oluşturan birim eritrosit
CAT	: Katalaz
CFU–E	: Koloni oluşturan birim eritrosit
CFU–GM	: Koloni oluşturan birim granülosit monosit
CFU–M	: Koloni oluşturan birim monosit
CFU–Meg	: Koloni oluşturan birim megakaryosit
CLP	: Ortak lenfoid progenitör
CMP	: Ortak miyeloid progenitör
Eos	: Eozinofil
EPO	: Eritropoietin
EPOR	: Eritropoietin reseptörü
GCS–F	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GMCS–F	: Granülosit monosit koloni uyarıcı faktör
GMP	: Granülosit miyeloid progenitör
GSH	: Glutatyon
GSH-px	: Glutatyon peroksidaz
Hb–A	: Hemoglobin A
Hb–F	: Fetal hemoglobin
Hct	: Hematokrit
HGB	: Hemoglobin
HIF–1	: Hipoksiyle uyarılabilen faktör–1
IL–3	: İnterlökin–3
IL–5	: İnterlökin–5

IL–7 : İnterlökin–7

Lym : Lenfosit

MCV : Ortalama eritrosit hacim

MCH : Ortalama eritrosit hemoglobini

MCHC : Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

MDA : Malondialdehit

Mono : Monosit

Neu : Nötrofil

NF-ϰB : Nükleer faktör kappa B

NS : *Nigella sativa*

PAM : Fosforamid mustard

PLT : Trombosit

RBC : Kırmızı kan hücreleri

RDW : Eritrosit dağılım genişliği

ROS : Reaktif oksijen türleri

SOD : Süperoksit dismutaz

SP : Siklofosfamid

TK : Timokinon

TPO : Trombopoietin

WBC : Beyaz kan hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Siklofosfamidin Moleküler Yapısı* **6**

Şekil 2.2 *Siklofosfamidin Biyotransformasyon Sonucu Metabolitlerine Dönüşmesi* ... **7**

Şekil 2.3 *Embriyonik Hematopoez* **9**

Şekil 2.4 *Hematopoez* **12**

Şekil 2.5 *Kemik İliği Mikro Çevresi* **14**

Şekil 2.6 *Eritropoez* **16**

Şekil 2.7 *Eritroblastik adalar* **18**

Şekil 2.8 *Eritroblastik Adalarda Eritroblastik Farklılaşma Süreci* **18**

Şekil 2.9 *Hematopoietik Sitokinler* **21**

Şekil 2.10 *Eritropoietin Mekanizması* **24**

Şekil 2.11 *Miyelosupresyon* **29**

Şekil 2.12 *Timokinonun Kimyasal Yapısı* **35**

Şekil 3.1 *Cihazlar* **41**

Şekil 3.2 *Deneyde Kullanılan Sıçanların Tartım İşlemi* **42**

Şekil 3.3 *Sıçanlara İntragastrik Gavaj Uygulanması* **43**

Şekil 3.4 *Deney Protokol Şeması* **44**

Şekil 3.5 *MDA Analizinde Numunelerde Görülen Renk Değişimleri* **48**

Şekil 3.6 *Spektrofotometrede Ölçüm* **48**

Şekil 3.7 *GSH Analizinde Numunelerde Görülen Renk Değişimleri* **49**

Şekil 4.1 *Grupların Ortalama Canlı Ağırlık Değişimleri* **52**

Şekil 4.2 *Grupların Lökosit Değerleri* **54**

Şekil 4.3 *Grupların Nötrofil Değerleri* **55**

Şekil 4.4 *Grupların Eozinofil Değerleri* **56**

Şekil 4.5 *Grupların Bazofil Değerleri* **57**

Şekil 4.6 *Grupların Monosit Değerleri* **58**

Şekil 4.7 *Grupların Lenfosit Değerleri* **58**

Şekil 4.8 *Grupların Eritrosit Değerleri* **59**

Şekil 4.9 *Grupların Hemoglobin Değerleri* **60**

Şekil 4.10 *Grupların Hematokrit Değerleri* **61**

Şekil 4.11 *Grupların Ortalama Korpuskuler Hacim Değerleri* **61**

Şekil 4.12 *Grupların Ortalama Eritrosit Hemoglobini Değerleri* **62**

Şekil 4.13 *Grupların Ortalama Korpuskuler Hemoglobin Konsantrasyonu Değerleri* **63**

Şekil 4.14 *Grupların Eritrosit Dağılım Genişliği* **63**

Şekil 4.15 *Grupların Trombosit Değerleri* **64**

Şekil 4.16 *Grupların Eritropoietin Değerleri* **65**

Şekil 4.17 *Grupların Trombopoietin Değerleri.* **66**

Şekil 4.18 *Grupların Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Değerleri* **67**

Şekil 4.19 *Grupların serum MDA Değerleri* **68**

Şekil 4.20 *Grupların serum GSH Değerleri* **68**

Şekil 4.21 *Sıçan Femur Epifiz Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri* **71**

Şekil 4.22 *Sıçan Femur Epifiz Bölgesine Ait Histopatolojik Görüntüler* **72**

Şekil 4.23 *Sıçan Femur Diyafiz Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri* **73**

Şekil 4.24 *Sıçan Sternum Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri* **75**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 *Hematopoietik Sitokinler* **22**

Tablo 2.2 *Yan Etkiler İçin Ortak Toksisite Kriterleri Skalasına Göre Hematolojik Toksisite Derecelendirmesi (CTCAE)* **30**

Tablo 3.1 *Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler* **40**

Tablo 3.2 *Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri* **41**

Tablo 3.3 *Deney Grupları* **43**

Tablo 4.1 *Grupların Ortalama Canlı Ağırlık Değişimleri (g)* **51**

Tablo 4.2 *Gruplara Göre Sıçanların Hematolojik Parametrelerindeki Değişimler (Ort±SD)* **53**

Tablo 4.3 *Grupların Serum Hematopoietik Sitokin Değerleri (Ort±SD)* **65**

Tablo 4.4 *Grupların Serum Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Değerler (Ort±SD)* **67**

Tablo 4.5 *Yarı Kantitatif Değerlendirme Sonucu Elde Edilen Femur Dokusunun Histopatolojik Skorlamasına Ait Veriler (Ort±SD)* **69**

Tablo 4.6 *Yarı Kantitatif Değerlendirme Sonucu Elde Edilen Sternum Dokusunun Histopatolojik Skorlamasına Ait Veriler (Ort±SD)* **70**

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapında gelişen teknoloji ve tanı prosedürleri ile daha kolay teşhis edilebilmekte ve teknoloji çağında daha sağlıksız bir hal alan yaşam biçimi sebebiyle hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Kanser tedavileri ile alakalı yeni stratejiler sağkalım oranını artırmış ve mortalite oranını azaltmıştır. Yaşam süresinin artmasıyla birlikte hastalarda görülen ağrı, yorgunluk, kemoterapi uygulamalarının yan etkilerinin azaltılabilmesi gibi hastanın yaşam kalitesini etkileyen konular gündeme gelmiştir (Tanık ve Gürşan, 2022).

Siklofosfamid (SP) kemoterapide tek başına ya da kombinasyonlar şeklinde sıkça kullanılan, alkilleyici gruptan, immünosupresif ve antineoplastik bir ilaçtır. Karaciğerde hidroksillenerek iki aktif metabolitine dönüşür. Bunlardan fosforamid mustard (PAM) SP'nin terapötik etkilerinden, akrolein (ACR) ise toksik etkilerinden sorumludur. ACR dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarını artırarak ve antioksidan savunma mekanizmalarını bozarak toksik etki gösterir (Chu ve Sartorelli, 2018).

Siklofosfamidin kemoterapötik etkileri yüksek dozlarda kullanılmasına bağlıdır fakat yüksek dozlar ciddi yan etkilere yol açmaktadır. En ciddi yan etkiler miyelosupresyon ve hemorajik sistittir. Bu yan etkiler sebebiyle tedavide doz kısıtlaması gerekmekte ciddi vakalarda kemoterapi tedavisi kesilmek zorunda kalmaktadır (Emadi vd., 2009).

Kemik iliği ve kan doku; hızlı bölünen, belirli periyotlarla sürekli kendini yenileyen dinamik bir dokudur. Hücre siklusunun hızlı olması kemoterapi ilaçlarından diğer dokulara oranla daha fazla etkilenmesine sebep olmaktadır. Kemik iliğinin baskılanması sonucunda hematopoietik kök hücrelerden diğer hücre serilerinin oluşma süreci bozulur. Kemik iliğindeki miyeloid seri (eritrosit, trombosit, granülosit) hücrelerindeki baskılanma neticesinde periferik kanda meydana gelen anemi, granülositopeni ve trombositopeniyi kapsayan süreç miyelosupresyondur. Hastalarda

ortaya çıkan miyelosupresyon hastanın prognozunu kötüleştirmekte, hemorajik problemlere sebep olmakta, hastayı fırsatçı ve sekonder enfeksiyonlara açık hale getirmektedir (Yıldız ve Gözüoğlu, 2021). Son yıllarda SP'nin yüksek dozlarda kullanımına olanak sağlamak ve yan etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır (Alenzi vd., 2010; Patra vd., 2012; Yıldız ve Gözüoğlu, 2021).

Timokinon (TK), *Nigella sativa* tohumlarının uçucu yağında baskın olarak bulunan bir bileşendir. *Nigella sativa*, 2000 yılı aşkın bir süredir geleneksel tıpta kullanım alanı bulmuş, çeşitli farmakolojik etkilere sahip bir bitkidir. Günümüzde *Nigella sativa*'nın faydalı etkileri TK ile ilişkilendirilmiştir. TK, özellikle antioksidan etkisi ile sitoprotektif olduğu bilinmektedir. Ayrıca TK son derece güvenilir bir maddedir. Toksisite çalışmaları TK'nın çok yüksek dozlarının bile ciddi bir toksisiteye sebep olmadığını bildirmektedir (Darakhshan vd., 2015; Shaterzadeh–Yazdi vd., 2018).

Kemoterapinin kaçınılmaz yan etkilerinden biri de miyelosupresyondur. Kemoterapinin toksik etkilerine maruz kalmamak ya da bu etkileri azaltmak için antioksidan protektif ajanlar kullanılabilmektedir. Bu çalışmada SP'nin sebep olduğu miyelotoksisite üzerine güçlü antioksidan etkilere sahip olan TK'nın olası faydalı etkilerinin hematolojik, biyokimyasal ve histolojik açıdan araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerle hem kemoterapide sık kullanılan siklofosfamidin yan etkilerinin azaltılmasına yönelik bir alternatif sunulmasıyla sağlık ve ekonomik yönden katkı sunacağı hem de literatüre bu konuda katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser tüm dünyada ölüme sebep olan hastalıklar arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır [(OHD), 2009]. Kanserle ilişkili yaşam tarzı olarak tanımlanabilen fiziksel hareketsizlik, sigara kullanımı, nüfusun yaşlanması, sağlıksız diyetler ülkelerin kanser yükünü artırmaktadır (Jemal vd., 2011).

Kanser; bir organizmada bulunan hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve çoğalması ile karakterize, bir ya da birden çok organı etkileyebilen, tanımlanmış 100'den fazla türü bulunan bir hastalıktır (Baykara, 2016). Multifaktöriyel bir etiyolojiye sahiptir. Kalıtım, bakteriler, virüsler, beslenme alışkanlığı, radyasyon, güneş ışığı, mekanik darbeler, kimyasal maddeler, küfler, sigara ve alkol kullanımı kanser oluşumunda etkili faktörlerdir (Yokuş ve Çakır., 2012). Hücre siklusu ve kontrolü genler ile kontrol edildiği için kanser temelde genlerle ilişkilidir. Genlerde meydana gelebilecek fiziksel ve kimyasal değişimler (fosforillenme, asetillenme, metillenme) gibi epigenetik modifikasyonlar hücre işlevini etkileyebilir. Hasar gören DNA'nın onarılması ile alakalı tamir sistemleri bulunsa da bazen yeterli olmaz. Bu gibi durumlarda genlerin ürünü olan proteinlerde hasar oluşur ve hücresel işlevlerde bozulmalar başlar. Kanser hücreleri kendi metabolizmaları olan, kontrolsüz çoğalmayı sağlayabilen sinyal sistemlerine sahip, gerekli oksijen ve besini sağlayabilmek için periferdeki dokulardan kendi damar sistemlerini oluşturabilen, dolaşıma geçerek uzak dokularda kanserleştirmeyi başlatabilen zeki hücrelerdir (Baykara, 2016).

Kanser tedavisinde; cerrahi girişimler, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi, hedefli terapi, biyolojik yöntemler gibi farklı yaklaşımlar tek tek ya da kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Kanser türlerinin fazlalığı, bireysel farklılıklar her yöntemin kendine özel avantaj ve dezavantajlarının bulunması sebebiyle kansere karşı net bir tedavi prosedüründen bahsetmek mümkün değildir (Baykara, 2016; Pucci vd., 2019).

2.1 Kemoterapi

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik yaklaşımlar, neoplastik hastalığın gelişimini yavaşlatmak, durdurmak hatta geriletmek için kullanılan antineoplastik ilaçlar kullanımını içermektedir [(OHD), 2009]. Kanser biyolojisinin anlaşılabilirliğinin artmasıyla birlikte hedefe yönelik tedavi stratejileri gelişmektedir. Son on yılda birçok ajan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi'nden (FDA) onay almıştır. Kemoterapinin amacı hücre ve tümör çoğalmasını engellemek, böylece kanserli dokunun invazyonunu ve metastazını engellemektir. Geleneksel kemoterapi ilaçları öncelikle DNA, RNA ve protein sentezi süreçlerine etki ederek neoplastik hücrelerin fonksiyonunu bozup apoptozu tetikler. Geleneksel ilaçlarla yapılan kemoterapiden sonuç alınabilmesi için dozun tekrarlı uygulamaları ya da farklı ajanların kombinasyonları gerekebilir. Hücre çoğalması ve farklılaşması yolaklarını teşvik eden ya da baskılayan mekanizmalar çeşitli genleri, reseptörleri ve sinyal iletimini içerir. Kanser hücresinin biyolojisi hakkında edilen bilgiler sayesinde bu yollar üzerinde moleküler hedefli tedaviler tasarlanmaktadır. Kemoterapötik ajanlar etki mekanizmasına göre alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antimikrotübüler ajanlar ve antibiyotikler olarak sınıflandırılabilirler (Amjad vd., 2023).

Kemoterapide kullanılan ajanlar kümülatif ya da geri dönüşümsüz yan etkilere sebep olabilmektedir. Kısa ya da uzun vadeli yan etkiler oluşabildiği gibi uzun vadeli yan etkilerin en önemlisi de sekonder tümör oluşumudur. Yan etkilerin ciddiyeti tedavi dozunun değiştirilmesine, tedavinin yarıda kesilmesine hatta ölümlere sebep olabilmektedir. Kemoterapi ilaçları kanser hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği kadar sağlıklı vücut hücrelerini de hasara uğratmaktadır. Özellikle hızlı bölünme özelliğine sahip kan, kemik iliği, kıl folikülleri, gastrointestinal sistem hücreleri ve ağız boşluğu mukozasındaki hücreler kemoterapi esnasında yıkıma uğrayabilir (Çetik, 2014).

2.1.1. Alkilleyici İlaçlar ve Siklofosfamid

Alkilleyici grupta bulunan kemoterapi ilaçları (siklofosfamid, prokarbazin, klorambustil, karmustin vb.) alkil gruplarının çeşitli hücresel bileşenlere transferi aracılığıyla sitotoksik etki gösterir. Hücre ölümüne yol açan ana etkileşim muhtemelen çekirdek içinde bulunan DNA'nın alkilasyonu sonucu olur. Ancak bu ilaçlar hücredeki diğer kimyasal grupları da alkilleyebilirler. Alkilasyona ek olarak ikinci bir mekanizma proteinlerin lizin kalıntılarının karbamoilasyonunu içerir. İkinci mekanizma, DNA'nın şeker–fosfat bağının kopmasıyla DNA zincirinin kırılmasına yol açar. Alkilleyici ilaçlar hücre döngüsüne özgü olmamasına rağmen kanser hücrelerinin ilaca en duyarlı olduğu dönem hücre döngüsünün geç G1 ve S fazlarıdır. Siklofosfamid, klinikte kullanımı oldukça yaygın olan alkilleyici ajanlardan biridir (Chu ve Sartorelli, 2018).

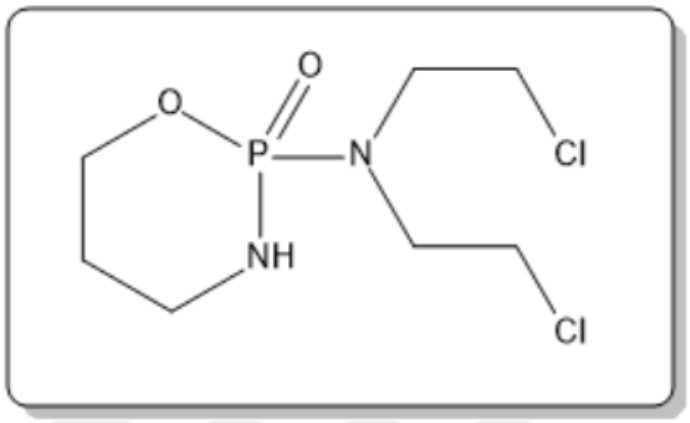
2.1.2. Siklofosfamidin Kullanım Alanları

Lenfomalar, lösemi, miyeloma, nöroblastom, adenokarsinom, retinoblastoma ve meme karsinomu gibi malign hastalıkların tedavisinde antineoplastik olarak kullanıldığı gibi amiloidoz, romatoid artrit, multipl skleroz ve idiopatik nefritis gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde ve organ transplantasyonlarında immünosupresif olarak kullanım alanı bulmaktadır (Abdelaziz vd., 2019; Perini vd., 2008; Sharda vd., 2008). Oral veya intravenöz kullanımları yüksek biyoyararlanım sağlamaktadır (Chu ve Sartorelli, 2018).

2.1.3. Siklofosfamidin Yapısal Özellikleri

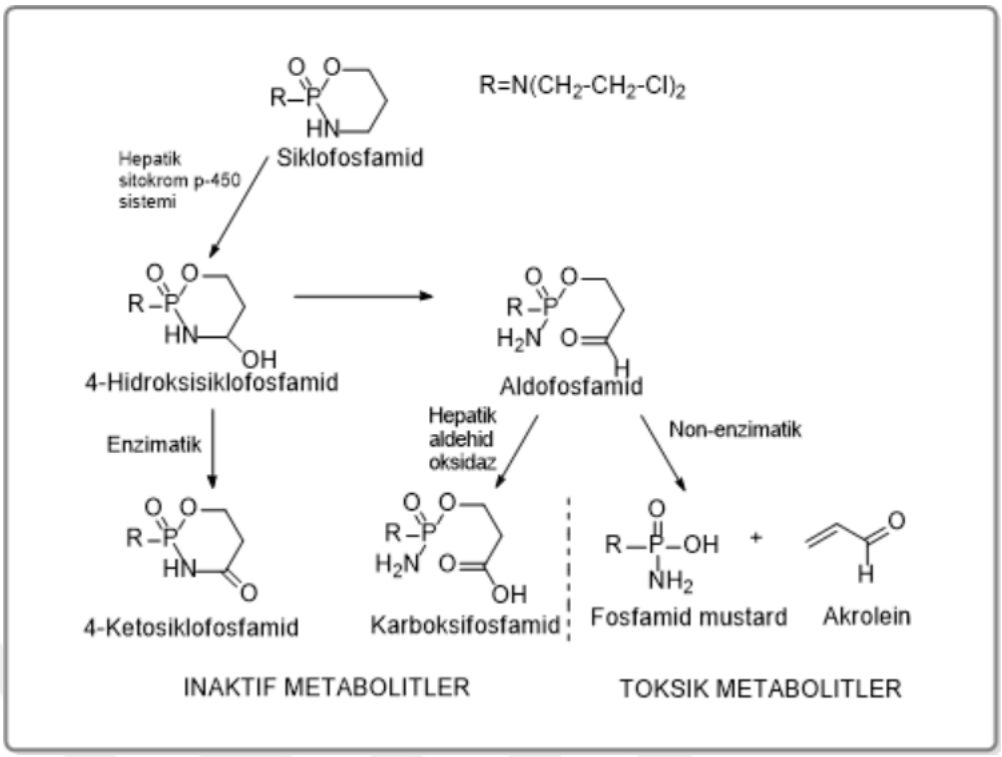
Siklofosfamidin kimyasal yapısı şekil 2.1'de gösterilmiştir. Siklofosfamid ana formunda inaktiftir ve aktif metabolitlere dönüşmesi için karaciğer mikrozomal

enzimleri gereklidir. SP; P–450 monooksijenaz enzimi aracılığıyla 4–hidroksi siklofosfamide dönüşür ve bu metabolit enzimatik olmayan bir şekilde aldofosfamide dönüşür. Bu da fosforamid mustard (PAM) ve akroleine (ACR) ayrılır (Güneş, 2014) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *Siklofosfamidin Moleküler Yapısı*

Genel olarak fosforamid mustard ve nor–nitrojen mustard siklofosfamidin terapötik etkilerinden ve akrolein de toksik etkilerinden sorumludur (Şekil 2.2) (Chu ve Sartorelli, 2018). PAM'ın DNA'ya bağlanma yoluyla hücre bölünmesini baskıladığı, böylece antitümör ve immünosupresif etki oluşturduğu düşünülmektedir. Öte yandan ACR, makro moleküllerin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek bağışıklığı baskılamaktadır. Ayrıca ACR böbrek epitelini geçip bazı reaktif oksijen türlerini uyararak ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi üzerinden nitrik oksit (NO) düzeylerini artırarak da etkisini göstermektedir. ACR'nin tetiklediği mekanizmalar neticesinde interlökin–α, siklooksijenaz–2, TNF– α, trombosit aktive edici faktör, peroksinitrit seviyeleri de yükselmektedir (Güneş, 2014). Akroleinden dolayı oluşan serbest radikaller; hücrede bulunan iyon pompaları, enzim ve reseptör gibi moleküllerle etkileşerek onların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar, apoptozu indükleyebilirler (Cengiz vd., 2018; Patra vd., 2012).



Şekil 2.2 *Siklofosfamidin Biyotransformasyon Sonucu Metabolitlerine Dönüşmesi*

2.1.4. Siklofosfamid Toksisitesi

Alkilleyici ilaçların toksik etkileri genellikle doza bağlıdır ve esas olarak kemik iliği, sindirim sistemi, üreme sistemi gibi mitotik aktivitesi hızlı olan dokularda meydana gelir (Chu ve Sartorelli, 2018).

İmmünosupresif bir ajan olarak siklofosfamid toksisitesi, lökopeni, trombositopeni ve anemi gelişimi ile ilişkilidir. Bu koşullar tekrarlayan enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olabilir ve yara iyileşmesini engelleyebilir. Siklofosfamid toksisitesinin diğer semptomları arasında gastrointestinal bozukluklar, alopesi, hemorajik sistit, renal tübüler nekroz, infertilite, pulmoner fibröz ve kardiyotoksisite yer alır. (Ogino ve Tadi, 2023). Yapılan bir çalışmada >1,55 g/m^2/gün dozunda hastaların %25'inde akut kalp yetmezliği oluşturduğu gözlenmiştir (Dhesi, vd., 2013). Yetişkinlerde üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden kaçınmak için

168 mg/kg'dan daha yüksek kümülatif doz kullanılmaması tavsiye edilmiştir (Ponticelli vd., 2018).

Alkilleyici ajanlar güçlü vezikan yapıda oldukları için uygulama bölgesinde dokulara zarar verebilir, sistemik toksisite oluşturabilir. Yapıları gereği kanserojendirler ve özellikle akut miyeloid lösemi olmak üzere sekonder malignitelerde artışa sebep olabilir (Chu ve Sartorelli, 2018). SP'nin kullanıldığı çok çeşitli koşullar, hastayı riske sokar ve SP kemoterapisinin sebep olduğu yan etkilerin ciddiyeti ilacın doz kısıtlamasına hatta kemoterapinin kesilmesine sebep olabilir (Chu ve Sartorelli, 2018; Feng vd., 2016; Güneş, 2014). Siklofosfamidin mide bulantısı, kusma, zayıflık, miyelosupresyon, anemi, alopesi gibi yaygın yan etkileri bulunmaktadır (Perini vd., 2008; Sharda vd., 2008).

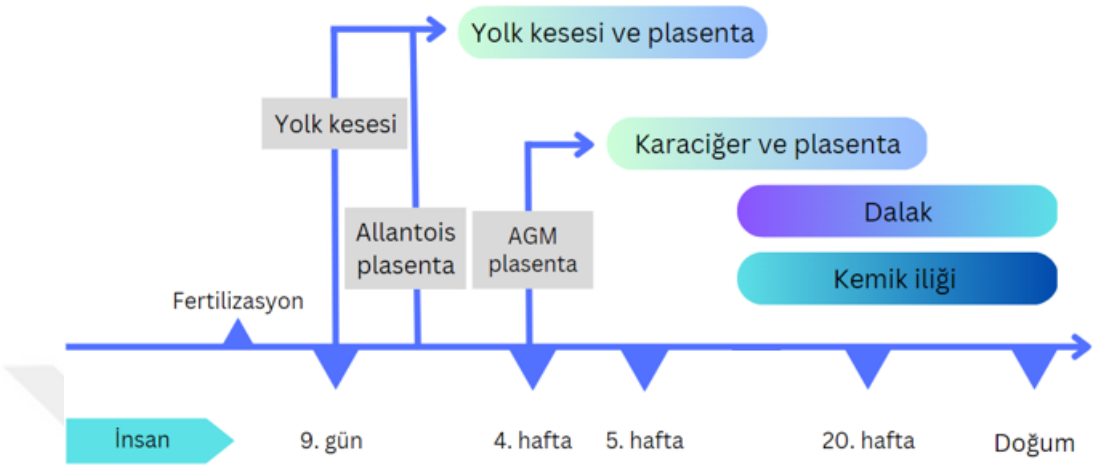
2.2. Hematopoez

Kan hücrelerinin oluşma süreci olan hematopoez, embriyonik dönemde başlar ve yaşam boyunca devam eder. Çoğu olgun kan hücresi kısa ömürlü olduğu için hematopoietik kök hücrelerden sürekli olarak yeni kan hücreleri ortaya çıkar ve eritroid megakaryositik, granülositik, monositik, lenfositik soylara bağlanır. Sabit durumdaki hematopoezi sürdürmenin yanı sıra sistemik kanama ve enfeksiyon gibi fizyolojik streslere de yanıt verir. Hem bazal hem de acil hematopoezi kontrol eden karmaşık sürecin düzenlenmesinde büyük ölçüde sitokinler ve bunların aynı kökenli reseptörleri aracılık eder (Jagannathan ve Zon, 2013).

2.2.1 Embriyonik Hematopoez

Omurgalı embriyolarında hematopoez dinamik ve kompleks bir süreçtir. Kan damarı endotel hücrelerinin yakınında zamansal ve mekânsal olarak örtüşen safhalar

halinde meydana gelir. Günümüzde üç hematopoietik safhadan oluşan bir model geniş çapta kabul görmektedir (Canu ve Ruhrberg, 2021) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 *Embriyonik Hematopoez*

Prehepatik (Mezoblastik) Safha: Yolk kesesinde gerçekleşen ve kısa ömürlü kan hücrelerini üreten ilkel hematopoezdir. Kan hücresi üretiminin ilk safhası, vasküler ve hematopoietik hücrelerin mezodermal progenitörlerden farklılaştığı ve kendilerini ekstraembriyonik yolk kesesine giderek kan adacıkları halinde organize ettikleri zaman başlar. Bu süreç insanda gebeliğin iki ile üçüncü haftasında, farede embriyonik yedinci günden itibaren meydana gelir (Canu ve Ruhrberg, 2021).

Yolk kesesi ilkel eritroid hücrelerin üretildiği özel bölgedir. İlkel eritroid hücreleri, geç fetal ve yetişkin eritroid hücrelerinden farklı hemoglobine sahiptir. Normal hemoglobin sentezleyemeyen bu hücrelerde embriyonik hemoglobinler Hb gower Tip I, Hb Gower Tip II ve Hb Portland 1–2 gözlenmektedir. Embriyoya özgü bu globinler yetişkin globinlerden daha yüksek bir oksijen afinitesine sahiptir, bu da muhtemelen anneyle embriyonik gaz değişimini artırır. İlkel eritrositlerin kan dolaşımına en erken hareketi kalp atışının başlangıcına denk gelmektedir. Başlangıçta dolaşımda ilkel eritroid hücrelerin çekirdekli bir formu dolaşır (Yamane, 2018). Yolk kesesinde eritroid hücrelerin büyük hücre popülasyonuna ek olarak megakaryosit soy

belirteçlerini eksprese eden hücreler gözlemlenmiştir. İlginç şekilde yolk kesesinde diploid hücrelerin trombositlerin salınması için proplatelet olarak bilinen sitoplazma uzantıları oluşturur. Bunlardan türetilen trombositler yetişkin kemik iliğinden üretilen trombositlerle karşılaştırıldığında daha büyüktür. Yolk kesesinde ayrıca olgunlaşmamış, vücut dışında da proliferatif kapasiteye sahip, gelişim aşamasında monosit olmaksızın olgunlaşan makrofajların varlığı da rapor edilmiştir (Kumar vd., 2019; Yamane, 2018).

Hepato–Splenik–Timik Safha: Yolk kesesin damar sistemine, hemojenik endotelyal hücrelerin alt kümesinden kaynaklanarak doğuma kadar kan hücrelerine katkıda bulunmak üzere hematopoietik progenitörleri üreten kesin olmayan hematopoezdir (Canu ve Ruhrberg, 2021). Bu hücreler endotelyal–hematopoietik geçişe uğrar ve böylece hücresel kimlikteki bir değişiklikle hematopoietik progenitörlerin endotelden tomurcuklanmasına sebep olur. Bu safhada hematopoezin ana bölgesi embriyodaki aort–gonad–mezonefroz (AGM) bölgesindeki dorsal aorttur. Orta evre gebelik sırasında kemik eritro–miyeloid progenitörlerin (EMP) üretimi başlar. Kan dolaşımının başlamasıyla EMP'ler yolk kesesinden dışarı taşınır ve fetal karaciğerde kolonileşmeye başlar. Doğuma kadar burada hematopoez sürdürülür. Karaciğerde EMP'ler, megakaryositler, fetal hemoglobin ß zincirlerine sahip çekirdekli eritrositler ve monositler dahil olmak üzere birden fazla kan hücresi tipine farklılaşır (Canu ve Ruhrberg, 2021). Dokuda yerleşik makrofajlar oluşturmak için dolaşım yoluyla diğer organlara taşınır. EMP türevli makrofajların doğumdan itibaren bulunan dokuda yerleşik makrofajların çoğunu oluşturduğu düşünülmektedir (Canu ve Ruhrberg, 2021).

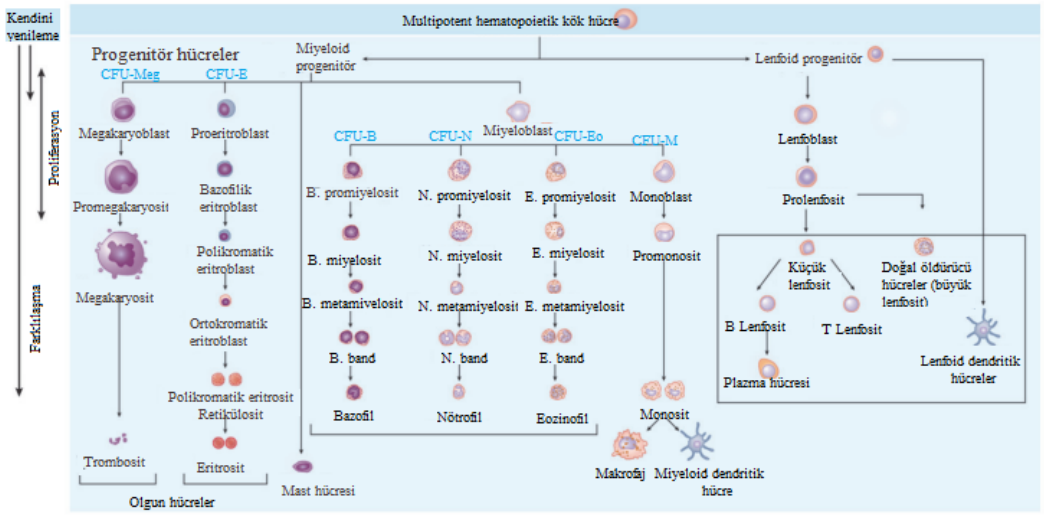
Bu safhada yolk kesesinde lenfoid progenitörleri ve lenfo–miyeloid progenitörler de üretilir. Karaciğerde, lenfoid progenitör dolaşımda B ve T hücrelerinin yanı sıra deri, akciğer ve karaciğerdeki T hücreleri de dahil olmak üzere birçok dokuda yerleşik, bağırsak ve akciğerdeki B1a hücreleri ve dalakta marjinal bölge B hücreleri gibi doğuştan gelen lenfositlere farklılaşır (Canu ve Ruhrberg, 2021).

Medullo–Lenfatik Safha: Embriyodan kaynaklanan ve başlangıçta fetal karaciğeri destekleyen daha sonra yetişkin hematopoezini desteklemek için kemik iliğini kalıcı olarak kolonize eden HKH'leri üreten kesin hematopoezdir (Canu ve Ruhrberg, 2021). Gebeliğin dördüncü ile yedinci haftaları arasında Aort–gonado-mezonefroz bölgesindeki endotelyal hücrelerden intraembriyonik olarak ortaya çıkar. AGM bölgesinde intra–aortik hematopoietik kümeler görülmesiyle kesin hematopoezin başladığı kabul edilir. Buradaki hematopoietik kök hücreler (HKH) uzun vadeli yeniden çoğalma kabiliyetine sahiptir. Bu HKH'ler dolaşımla karaciğere gelir ve burada genişlemeye ve daha fazla olgunlaşmaya başlar. Bu süreçte fetal karaciğer, dalak, timus ve plasentada, eritroblast, granülosit, monosit kümeleri gözlenebilir. Üretilen eritrositler artık çekirdeksizdir ve Fetal Hb (Hb–F) içerirler. Gebeliğin sekizinci haftasından itibaren ise lökositler üretilmeye başlar (Canu ve Ruhrberg, 2021). Sonunda, hematopoietik kök hücreler doğumdan sonra yaşam boyu hematopoezi sürdürmek için kemik iliğini kolonize etmek üzere karaciğerden çıkar (Canu ve Ruhrberg, 2021; Dalva, 2018).

Medullar safhada ölçülebilir miktarda eritropoietin (EPO), Granülosit–makrofaj stimüle edici faktör (G–CSF), Hb-F tespit edilebilir (Dalva, 2018).

2.2.1. Yetişkinlerde Hematopoez

Yetişkinlerde her tür kan hücresinin üretimi yalnızca kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücre tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.4). Bununla birlikte, kemik iliği yetmezliğiyle ilişkili patolojik koşullar altında (örneğin miyelofibroz), kan üreten doku, karaciğer ve dalak gibi fetal hematopoez bölgelerine yeniden göç edebilir (Lucas, 2021).



Şekil 2.4 *Hematopoez (Dalva, 2018) (Kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)*

Kemik iliğinde hematopoietik hücrelerin üretilip farklılaştırılması için Kİ stromal hücreleri ve mikro çevre büyük önem taşımaktadır. Progenitör hücreler ve hematopoietik kök hücreler stromal bir hücre ağı ile desteklenir. Bu stromal hücreler, hücrelerin tutunması için bir altyapı oluşturur ve hematopoietik büyüme faktörlerini sentezler. Burada bulunan stromal hücreler; mezenkimal hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, endotelyal hücreler, retiküler hücreler, yağ hücreleri, perivasküler stromal hücreler, glial hücreler, makrofajlar gibi birçok hücre grubundan oluşur (Smith ve Calvi, 2013).

Erişkinlerde kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoietik kök hücre hem kendisine hem de diğer tüm kan hücrelerine dönüşme yeteneğine sahip öncül hücredir. Kendisini yenileyebilmesi sayesinde ilerleyen yaşla birlikte azalmasına rağmen kök hücre havuzunun korunması sağlanmış olur (Gunsilius vd., 2001; Lucas, 2021). Hematopoezin ilk aşamaları çoğalmayla, ilerleyen aşamaları ise farklılaşmayla alakalıdır (Ingley vd., 2004).

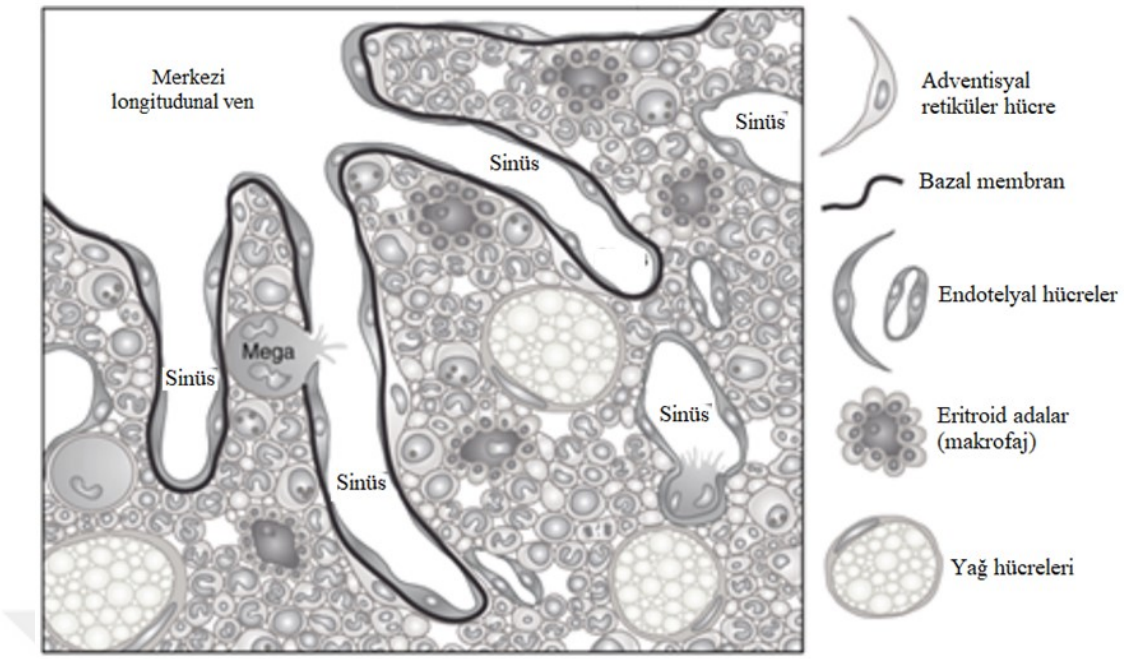
Hematopoietik kök hücrenin hangi olgun kan hücresine dönüşeceği büyüme ve farklılaşma faktörleri olarak bilinen sitokinler aracılığı ile belirlenir. Doğru uyaranların varlığında pluripotent kök hücre lenfoid veya miyeloid kök hücreye dönüşür. Miyeloid kök hücreye gelen faklı uyaranlar bu kök hücreden eritrositlerin,

megakaryositlerin, lökositlerin oluşmasını uyarırken, lenfoid kök hücreye gelen farklı uyaranlar ise lenfositlerin oluşmasını sağlar (Ingley vd., 2004).

Kök hücreden eritrosit oluşumu süreci eritropoez, lökositlerin oluşum süreci lökopoez, trombosit oluşum süreci trombopoez, granülositlerin oluşum süreci ise granülopoez olarak adlandırılmaktadır (Ingley vd., 2004). Şekil 2.3'te görüldüğü gibi hematopoietik progenitörler birkaç farklılaşma adımından geçtikten sonra ortak miyeloid progenitör (CMP) ve ortak lenfoid progenitör (CLP) hücrelere dönüşür. Ortak lenfoid progenitör hücreler T ve B lenfositleri doğal öldürücü hücreleri (NK) ve lenfosittik dendritik hücreleri oluştururken CMP'ler megakaryosit–eritrosit progenitörlerine (MEP) ve granülosit–miyeloid progenitörlerine (GMP) dönüşür (Tsiftsoglou vd., 2009). Şekil 2.2'de koloni oluşturan birim CFU (colony forming unit) olarak ifade edilmiştir ve kendisini takip eden gruptaki hücrelerin oluşmasını sağlar. Örneğin; ortak miyeloid progenitörlerden (CMP) makrofaj, CFU–Meg'den megakaryosit ve ortak eritroid progenitörden (CFU–E) eritrosit oluşmaktadır.

2.3.Kemik İliğinin Yapısal Organizasyonu ve Hematopoezdeki Rolü

Kemik iliği hematopoezin ana bölgesidir. Kemik iliğinin kompakt kemikle çevrili olması organizasyonun incelenmesini zorlaştıran bir faktördür. Buna rağmen gelişen teknoloji sayesinde görüntüleme analizleri için yüksek kalitede numune hazırlanabilmektedir. Ayrıca gün geçtikçe hücrelerin tanımlanması için daha fazla hücre yüzeyi belirteçleri kullanılabilmektedir. Kemik iliğinde bulunan stromal hücrelerin scRNAseq analizleri bu stromal popülasyonun karmaşıklığını bir kez daha gözler önüne sermiştir. Bu zorluklara rağmen son dönemde kemik iliği mimarisine dair muazzam ilerleme kaydedilmiştir (Lucas, 2021).



Şekil 2.5 *Kemik İliği Mikro Çevresi*

Kemik iliğini şekillendiren yapılar kemik, vasküler sistem ve retiküler stromal hücre ağıdır (Şekil 2.5). Kemik; kemik iliğini tamamen sarar, sınırlarını belirler ve trabekülleri oluşturur. Kemik iliğinin damar sistemi; Kİ alanının çoğunu kaplayan pencereli sinüzoid ağı oluşturan nadir arteriollerden oluşur. Damar sistemi Kİ boyunca yayılan perivasküler retiküler hücrelerle sıkı bir bağlantı içindedir. Hematopoez damarlar, kemik ve retiküler hücreler arasında gerçekleşmektedir. Kemik iliğinde sempatik sinirler, Schwan hücreleri, adipositler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler, çeşitli fibroblastlar hücreleri olmak üzere hematopoietik olmayan hücre türleri de bulunur (Lucas, 2021; Smith ve Calvi, 2013).

2.3.1. Hematopoietik Kök Hücre

Kan hücreleri; lenfoid hücreler [T lenfositler, B lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler] ve miyeloid hücreler (granülositler, monositler, eritrositler ve megakaryositler) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir. Tüm kan hücrelerinin sınırlı bir

ömrü vardır: granülositler birkaç saat, kırmızı kan hücreleri birkaç hafta ve bellek T hücreleri birkaç yıl kadar yaşar. Bu nedenle sürekli olarak çok miktarda kan hücresi üretilmesi gerekir. Tüm kan hücreleri, hematopoietik kök hücreler (HKH) adı verilen küçük bir ortak pluripotent hücre havuzundan türetilir (Smith ve Calvi, 2013).

Günümüzde HKH, kendini yenileyebilen ve çok soylu hematopoezi sürdürebilen klonojenik hücreler olarak tanımlanmaktadır. Multipotent HKH, kendini yenileme kapasitesini kaybeden ve olgun kan hücrelerine dönüşebilen progenitör hücrelere farklılaşır. Pluripotent HKH'den olgun kan hücrelerinin üretilmesi, belirli bir hücre soyuna bağlılık, soyla sınırlı progenitör hücrelerin terminal farklılaşması, büyümenin durdurulması ve apoptoz gibi ardışık aşamalar boyunca oldukça iyi düzenlenmiş bir süreci içerir. Hematopoietik progenitörlerin yüzeyindeki farklı reseptörlerin ekspresyonu, büyüme ve farklılaşma faktörleriyle, stromal hücrelerle, hücre dışı matriks moleküleriyle ve çözünebilir düzenleyici sitokinlerle, etkileşime izin verir (Smith ve Calvi, 2013; May vd., 2018).

Hematopoietik kök hücrelerin hayatta kalması, çoğalması, kendini yenilemesi ya da farklılaşması "büyüme ve farklılaşma faktörleri" olarak bilinen sitokinler aracılığıyla sağlanır. Doğru uyaranların varlığında pluripotent kök hücre lenfoid veya miyeloid kök hücreye dönüşür. Miyeloid kök hücreye gelen faklı uyaranlar bu kök hücreden eritrositlerin, megakaryositlerin, lökositlerin oluşmasını uyarırken, lenfoid kök hücreye gelen farklı uyaranlar ise lenfositlerin oluşmasını sağlar (Christopher vd., 2011).

2.4.Hematopoietik Kök Hücreden Farklılaşma Süreci

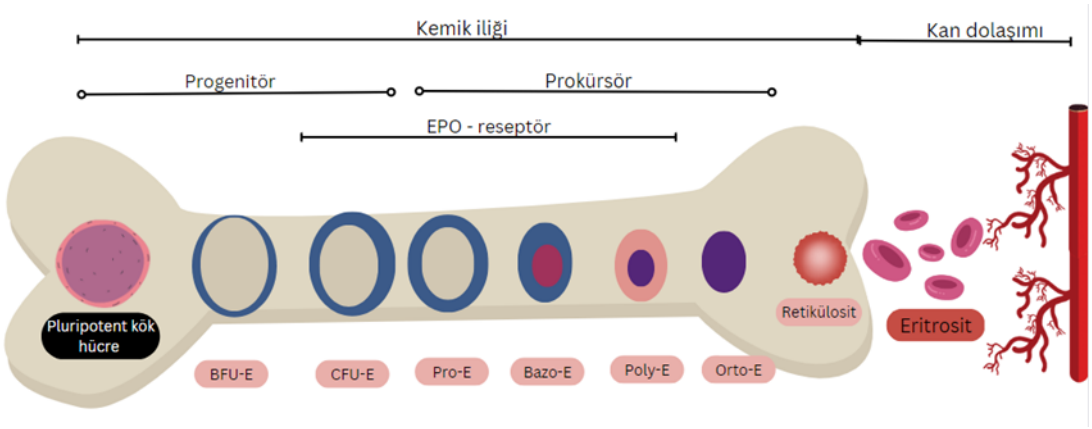
2.4.1. Eritropoez

Eritropoez; HKH'den aşamalı olarak farklı fonksiyonel ve morfolojik özelliklere sahip progenitörlerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve olgun eritrositlerin

üretilmesini içerir (Ingley vd., 2004; Tsiftsoglou vd., 2009). Omurgalılarda dolaşımdaki oksijen miktarı tarafından düzenlenen dinamik bir süreçtir. Bu sürecin kontrolünde yer alan spesifik sinyal yolları ve moleküler yolaklar tanımlanmıştır. Öncelikli olarak hipoksinin etkilediği süreçte demir hemostazı ve transkripsiyon faktörlerinin önemli rolü vardır (Tsiftsoglou vd., 2009).

Gebeliğin başında vitellüs kesesinde üretilen eritrositler gebeliğin ikinci trimesterinde ağırlıklı olarak karaciğer olmak üzere dalak ve timusta da üretilmektedir. Son trimesterde ise yaşamın geri kalanında devam edeceği gibi kemik iliği eritrosit yapımından sorumlu primer organ haline gelir (Ingley vd., 2004; Rieger ve Schroeder, 2012).

Pluripotent kök hücreden oluşan "patlama oluşturan birim (BFU–E)" ve "koloni oluşturan birim–eritrosit (CFU–E)" in vitro olarak tanımlanmış en erken tanımlanan progenitörlerdir ve her iki progenitöründe belirgin morfolojik özellikleri yoktur (Şekil 2.6) (Dalva, 2018; Ingley vd., 2004; Rieger ve Schroeder, 2012). Bununla birlikte farklılaşma sürecinde gerekli olan EPO reseptörlerini, sinyal ara ürünlerini, hücre yüzey belirteçlerini ve transkripsiyon faktörlerini eksprese ederler (Ingley vd., 2004).

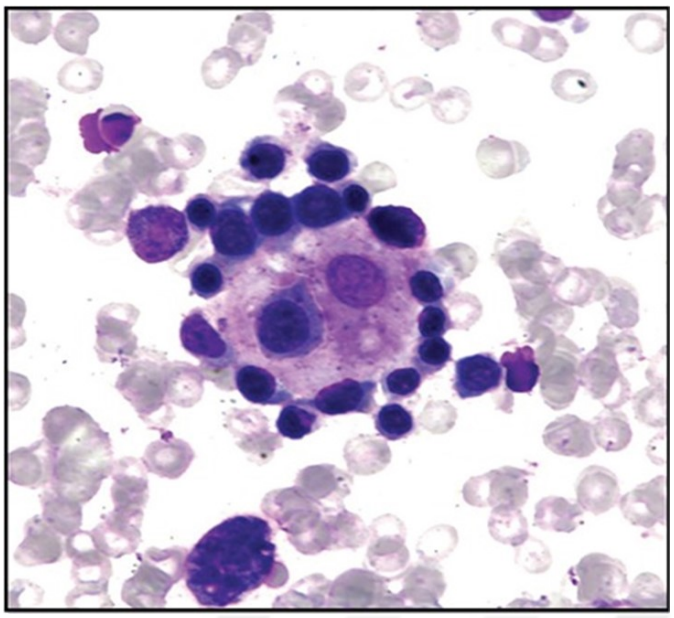


Şekil 2.6 *Eritropoez*

İlk eritrosit öncüsü “proeritroblast”tır ve çekirdekli bir hücredir. Hb sentezleyebilir ve üst üste mitoz bölünmeler geçirerek kendi hacminin yarısı kadar olan “bazofilik eritroblastları” oluşturur. Bazofilik eritroblastlar az miktarda Hb içerir. Bölünmesi sonucu daha küçük hacimdeki “polikromatofilik eritroblastlar” oluşur. Bu hücrelerin bölünmesiyle de “ortokromatofilik eritroblast” adı verilen daha küçük boyutlu, mitotik aktivitesini kaybetmiş hücreler oluşur. Bu safhada Hb yoğunluğu artar, çekirdek ve endoplazmik retikulum kaybolarak “retikülosit” oluşur (Ingley vd., 2004). Retikülositler çekirdek ve endoplazmik retikulumlarını kaybetmiş olmalarına rağmen hala sitoplazmik organellere sahiptir. Retikülositler oluştuktan sonra 72 saat kadar kemik iliğinde kalıp diapedezle kan dolaşımına geçer (Kumar vd., 2020). Retikülositte kalan DNA ve RNA artıkları birkaç gün içinde kaybolduktan sonra olgun eritrositler oluşur. Olgun eritrositler, mitokondri ve diğer organelleri olmayan ancak oksijen bağlayabilen ve dağıtabilen hemoglobin (Hb) içeren içbükey diskler şeklinde görülen hücrelerdir. Morfolojik olgunlaşmanın aşamaları, kademeli olarak hücre boyutunda küçülme, hemoglobin konsantrasyonunda artış ve sitoplazmik asitleşme ile karakterizedir. Eritropoez toplamda beş ile yedi gün sürmektedir (Ingley vd., 2004).

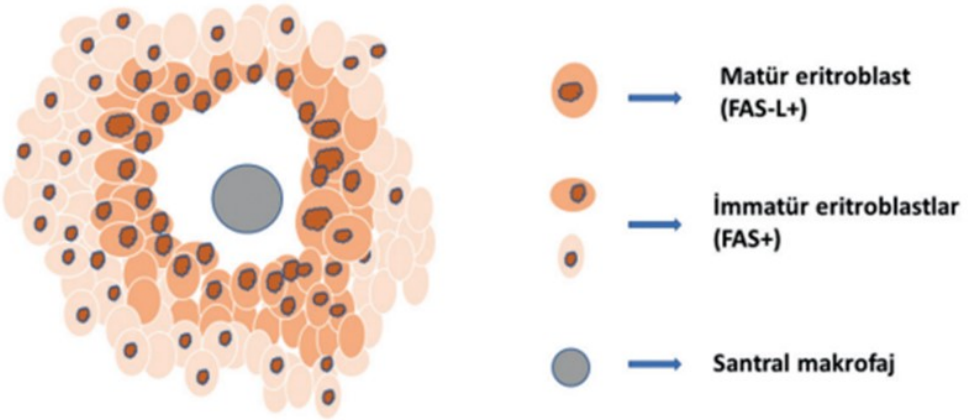
Eritrositler dolaşımda uzun bir süre kaldıktan sonra hücre zarının lipit tabakalarından fosfatidilserin eksprese etmeye başlar. Bu molekül retiküloendotelyal makrofajlar tarafından tanınarak yaşlanan eritrositlerin ve eritrosit bileşenlerinin fagosite edilmesini sağlar (Tsiftsoglou vd., 2009).

Eritrosit öncülerinin gelişimi; farklılaşan eritroblastlarla merkezi bir makrofajı içeren eritroblastik adalarda gerçekleşir (Şekil 2.7). Eritroblastik adalar kemik iliğinde ve eritropoezin sekonder bölgesi olan dalağın kırmızı pulpasında görülür. Eritroblastik adalarda bulunan makrofajlar, retikülositlerin ekstrüde çekirdeklerini ve elimine edilmiş diğer organelleri fagosite eder. Aynı zamanda eritropoez için önemli olan regülatörlerin [EPO, Transforming growth factor ß (TGF–ß)] üretiminden de sorumludur. Makrofajların tükenmesi eritropoezi baskılamaktadır. Bütün bunlar makrofajların eritropoezdeki önemini göstermektedir (Ingley vd., 2004).



Şekil 2.7 *Eritroblastik adalar (Kumar vd., 2020)*

Eritroblastik adalarda farklı aşamalardaki eritroblastlar arasında çapraz düzenleme vardır. Olgunlaşmamış eritroblastlar Fas Ölüm Reseptörleri eksprese ederken daha olgun eritroid hücreler Fas ligandları içerir (Şekil 2.8.). Bu nedenle olgun hücrelerin fazlalığı daha az gelişmiş hücrelerin farklılaşmasını engeller (Ingley vd., 2004).



Şekil 2.8 *Eritroblastik Adalarda Eritroblastik Farklılaşma Süreci*

2.4.2. Miyelopoez (Granülopoez)

Miyelopoez; miyeloid öncü hücrelerden eozinofil, nötrofil, bazofil, monosit ve makrofaj üretilmesini kapsar. Miyeloid hücreler; koloni oluşturan birim granülosit–monosit (CFU–GM) olarak bilinen progenitör hücreden farklılaşırlar. CFU–GM'nin farklılaşmasında granülosit koloni uyarıcı faktör (G–CSF), İnterlökin–3 (IL–3) ve interlökin–5 (IL–5) gibi sitokinler rol almaktadır. Miyeloid hücrelerin üç ana işlevi, gerekli durumlarda dokuya göç etme, fagositoz ve ekzositozdur (Ekinci ve Demir, 2020).

Sistemik enfeksiyon sırasında organizmanın artan fagosit talebiyle başa çıkma yeteneği, büyük ölçüde olgun miyeloid hücrelerin yeterli miktarda yenilenmesine bağlıdır. Acil durum veya talebe göre uyarlanmış miyelopoez olarak adlandırılan bu süreç, Kİ'nde hematopoietik progenitörlerin aktivasyonunu gerektirir, bu da bunların miyeloid soyuna doğru çoğalmasına ve farklılaşmasına sebep olur. Kİ progenitörlerinin periferdeki olgun hücrelere yönelik artan ihtiyaca uyum sağlamadaki başarısızlığı, kemoterapinin sebep olduğu miyelosupresyonun sistemik enfeksiyonun sonucu üzerindeki zararlı etkisinin gösterdiği gibi yaşamı tehdit edici olabilir. Son gelişmeler, acil miyelopoezde yalnızca işlenmiş miyeloid progenitörlerin değil aynı zamanda hematopoietik kök hücrelerin (HKH'ler) de önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu bağlamda, patojenden türetilen ürünler (Örn., Toll benzeri reseptör ligandları), hematopoietik ve hematopoietik olmayan hücreler tarafından inflamatuar medyatörlerin (örn., sitokinler ve büyüme faktörleri) üretimini indükleyerek, doğrudan veya dolaylı olarak miyeloid seriye doğru HKH farklılaşmasını aktive eder (Boudreaux ve Christopherson, 2022).

2.4.3. Trombopoez

Trombositler pıhtılaşma mekanizmalarında görev almaktadır. Dolaşıma katılan trombositler 8–10 günlük ömürlerini burada tamamlar. Vücutta bulunan trombositlerin

1/3 kadarı dalak pulpasında depolanmış halde bulunur. Kemik iliğinde yüksek hacimde bir trombosit deposu bulunmaz. Periferik dolaşımda trombosit miktarı azalırsa trombosit oluşumunu uyaran "trombopoietin" miktarında artış görülür (Boudreaux ve Christopherson, 2022).

Megakaryositler çekirdekli ve çok loblu olmasına rağmen gelişimini tamamlamış trombositler çekirdeksiz ve iki ile dört mm çapa sahip parçacıklardır. Trombositler; proplateletler olarak adlandırılan olgun megakaryosit zarlarında bulunan pseudopodal çıkıntılarının, organellerinin, zarların granüllerin ve çözünür makromoleküllerin parçalanmasıyla oluşur. Nükleer materyalin makrofaj aracılı fagositoz ile ortadan kaldırılmasından önce her megakaryositten 1000–3000 adet trombosit oluşturduğu bilinmektedir (Kaushansky, 2008).

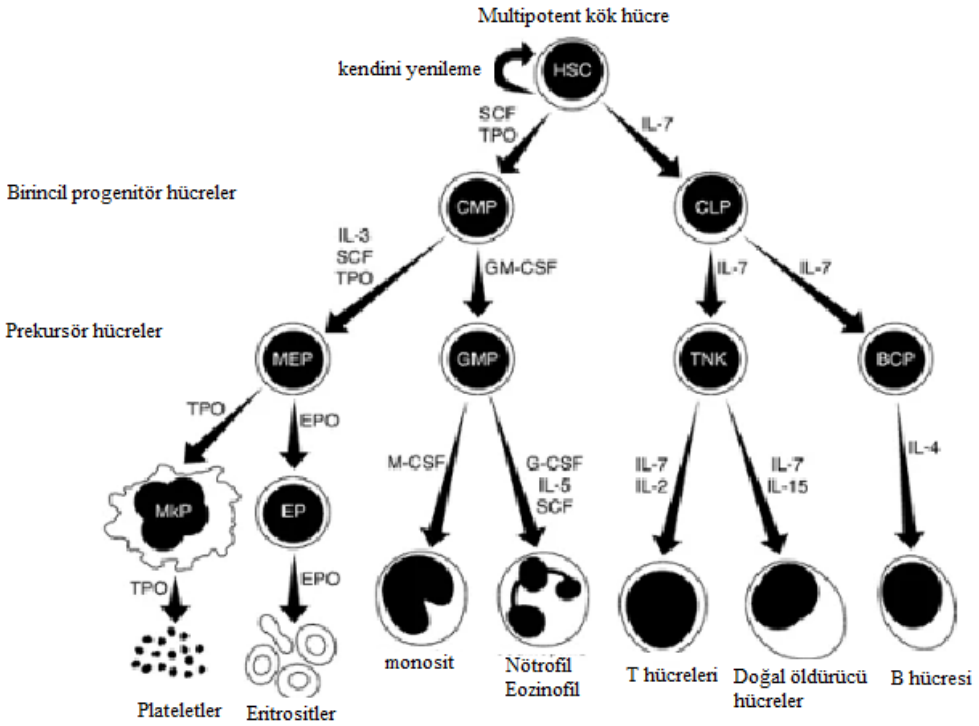
Trombosit üretimi, hematopoietik kök hücreleri (HKH'ler), bunların farklılaşmış nesillerini, kemik iliği mikro ortamını ve hematopoietik sitokinleri içeren karmaşık bir süreçtir (Boudreaux ve Christopherson, 2022). Trombositler HKH'lerden gelişen Megakaryosit–Eritroid Progenitörlerden (MEP) türetilirler (Boudreaux ve Christopherson, 2022; Kaushansky, 2003). Yetişkin bir insanda, kararlı durumda, günde 1000 trombosit üretilir. Talep arttığı zaman üretim kapasitesi 20 kat artabilmektedir (Kaushansky, 2003).

Proplatelet oluşumu esas olarak olgun megakaryositlerde meydana gelir ve sitoplazmanın uzantılara dönüştüğü bir intihar sürecini temsil eder. Mikrotübüllerde meydana gelen uzatma ve geri çekilme hareketleriyle muhtemelen aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesi sayesinde megakaryositlerin bir kutbunda başlar. Proplatelet morfogenezi oldukça dinamik bir süreçtir. Proplatelet oluşumu sınırlı sayıda transkripsiyon faktörüne ve bunların transkripsiyonel hedeflerine bağlıdır. GATA1 megakaryosit yaşam döngüsünün her aşamasında önemli roller oynar (Noguchi vd., 2007) .

2.5. Hematopoietik Sitokinler

Sitokinler, yapısal ve fonksiyonel olarak korunmuş sitokin reseptörleri ailesine bağlanarak ve bunları aktive ederek farklı hücre tiplerinde biyolojik tepkileri uyarabilen, spesifik hücre dışı ligandlardan oluşan bir ailedir (Jagannathan ve Zon, 2013).

Hematopoietik sistemin sürekli olarak yenilenmesi, spesifik hücre tipinin doğru yerde ve zamanda kalıcı olarak üretilmesi karmaşık bir süreçtir. Hematopoietik hücrelerin üretimi bir grup hematopoietik sitokinin sıkı kontrolü altındadır (Metcalf, 2008).



Şekil 2.9 *Hematopoietik Sitokinler*

Her sitokinin, sitoplazmik alanları hayatta kalma, çoğalma, farklılaşmaya bağlılık, olgunlaşma ve fonksiyonel aktivasyon gibi çeşitli yanıtları başlatan özel bölgeler içeren reseptörlerin aracılık ettiği birden fazla eyleme sahiptir. Bireysel sitokinler soya özgü olabilir veya birden fazla soydaki hücreleri düzenleyebilir ve kök hücreler veya megakaryosit progenitörleri gibi bazı hücre tipleri için proliferatif tepkiler için birden fazla sitokinin eşzamanlı etkisi gereklidir. Aynı sitokinler bazal ve acil hematopoietik hücre proliferasyonunu kontrol eder (Tablo 2.1., Şekil 2.7.) (Metcalf, 2008).

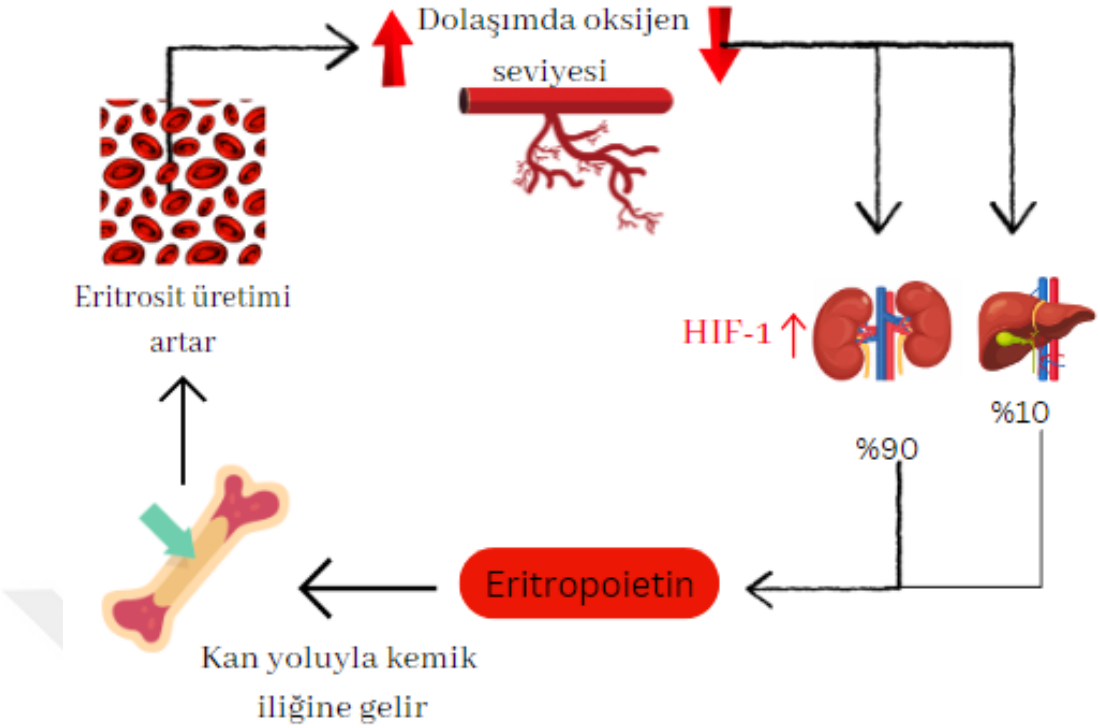
Tablo 2.1 *Hematopoietik Sitokinler*

Adı	**Hücresel Kaynağı**	**Üretilen Hücre Tipleri**
SCF (Kök Hücre Faktörü)	Fibroblast, Endotel	Nötrofil, Monosit, Eozinofil, Megakaryosit, Eritrosit
GCS–F (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör)	Monosit, Fibroblast, Endotel	Nötrofil
M–CSF (Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör)	Monosit, Makrofaj, Fibroblast, Endotel	Monosit, Makrofaj
G–MCSF (Granülosit Monosit– Koloni Uyarıcı Faktör)	T Hücresi, Monosit, Endotel, Fibroblast	Nötrofil, Monosit, Eozinofil, Megakaryosit, Eritrosit
Eritropoietin	Böbrek, Karaciğer	Eritrosit
Trombopoietin	Karaciğer, Böbrek	Trombosit
IL–3	T Helper Hücreleri, Mast Hücreleri, Endotel Hücreleri, Eozinofiller	Granülosit Koloni Oluşumu
IL–5	Mast Hücreleri, Eozinofiller	B Hücresi Farklılaşma Faktörü, Eozinofil Proliferasyonu
IL–7	Kemik İliği ve Timusun Stromal Hücreleri	T ve B Lenfosit Hemostazı

2.5.1. Eritropoietin (EPO)

Eritropoietin (EPO) yaklaşık 30 kDa'lık asidik, glikoprotein yapıda 165 amino asitten oluşan bir hormondur. EPO, fetal dönemde öncelikle hepatositler tarafından eksprese edilir. Doğumdan sonra renal korteksteki peritübüler fibroblastlar ana üretim bölgesi haline gelir. EPO sentezi transkripsiyonel seviyede düzenlenir. EPO mRNA aynı zamanda beyinde, karaciğerde, dalakta, akciğerde ve testislerde de tespit edilebilir, ancak bu organlar kronik böbrek hastalığında (KBH) renal Epo'nun yerini tutamaz (Jelkmann, 2011). Beyinden türetilen EPO, lokal olarak nöroprotektif bir faktör olarak görev yapar (Noguchi vd., 2007). Sistemik Epo, ağırlıklı olarak koloni oluşturan birimler olan eritroid (CFU–E'ler) olmak üzere eritrositik progenitörler için anti–apoptotik bir ajandır. EPO'ya yanıt olarak koloni oluşturan birimler olan eritroid (CFU–E) çoğalır ve farklılaşarak proeritroblast ve normoblast gruplarını oluşturur (Jelkmann, 2011). İnsan hematopoietik Epo–R (EPO reseptörü), sitokin sınıf I reseptör ailesine ait olan ve homodimerleri oluşturan, yaklaşık 60 kDa'lık 484 amino asitli bir glikoproteindir. EPO'nun EPO–R dimerine bağlanması üzerine sitoplazmik Janus kinazlar 2 (JAK2), EPO–R'nin tirozin kalıntılarının ve çeşitli hücre içi proteinlerin (enzimler ve transkripsiyon faktörleri) fosforilasyonunu katalize eder. Eritropoez yavaş etkili bir süreçtir. Plazma EPO'daki artışın ardından retikülositozun belirginleşmesi üç ile dört gün sürer (Jelkmann, 2011).

Eritropoietin sentezini uyaran en önemli faktör hipoksidir. (HIF–1), hipoksiye cevap olarak EPO salgılanmasını kontrol eden transkripsiyon faktörüdür. Hipoksik koşullar altında böbrekteki HIF–1seviyesi artar bu da böbreklerde EPO geninde mRNA transkripsiyonunu uyarır ve EPO sentezi artırılmış olur (Jelkmann, 2011).



Şekil 2.10 *Eritropoietin Mekanizması*

Böbrek dışındaki organlarda hipoksi oluşması durumunda da böbreklerde EPO salgılanması uyarılır. Androjenler, noradrenalin ve tiroid hormonları EPO miktarını artırırken östrojenler EPO üretimini baskılar. EPO'nun varlığında kan yapımı için gerekli demir gibi maddeler yeterli miktarda varsa eritrosit sayısı 10 kat kadar artırılabilir (Jelkmann, 2011).

2.5.2. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G–CSF)

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G–CSF) gibi hematopoietik sitokinler, proliferatif uyarıcı oldukları gibi hücrenin hayatta kalması, farklılaşması, olgunlaşması ve olgun hücrelerin fonksiyonel uyarımı üzerinde etkili olan sitokinlerdir (Metcalf, 2008). G–CSF çoklu doku ve hücre tiplerinden üretilmektedir. G–CSF'nin hücresel kaynağı; T hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve makrofajlardır (Mehta vd., 2015). İnsanlarla yapılan deneysel çalışmalar rekombinant G–CSF'nin kullanımının

kemoterapinin sebep olduğu düşüşün nötrofil düzeylerinin düzeltilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Metcalf, 2008). Koloni stimülan faktörler klinikte; primer ve sekonder proflaksi, ateşli ya da ateşsiz nötropeninin tedavisi, kök hücre transplantasyonu uygulanan hastalarda destek olarak ya da kök hücrelerin mobilizasyonu amacıyla kullanım alanı bulmaktadır (Özgüven, 2010).

2.5.3. Trombopoietin (TPO)

Trombopoietin; trombopoezi düzenlemekten sorumlu sitokindir (Kaushansky, 2003; Kaushansky, 2008; Metcalf, 2008). Karaciğerde başta olmak üzere böbrek, kemik iliği stroması, düz kas gibi dokulardan sentezlenen 332 amino asitlik bir glikoproteindir (Hitchcock ve Kaushansky, 2014; Kaushansky, 2003). Megakaryositlerin ve trombositlerin olgunlaşmasını ve salınmasını etkilemektedir (Kaushansky, 2008; Xu vd., 2018). TPO özellikle İnterlökin–3 ve SCF ile kombinasyon halinde megakaryosit oluşumu için güçlü bir uyarıcıdır (Kaushansky, 2008). Ancak TPO olmadan CSF–MK (koloni oluşturan birim– megakaryosit) üretimi tamamen durur (Kaushansky, 2003).

Trombopoietin plazma konsantrasyonları normal olarak, trombosit sayısıyla ters orantılıdır. Trombositozu olan hastalarda, trombosit aracılı TPO mekanizması bastırılır ve bu sebeple hormon düzeyleri düşüktür. Trombositopenili hastalarda ise hepatik TPO üretiminin bir miktarı trombositler tarafından adsorbe edilerek kan düzeylerinin yükselmesi sağlanır (Kaushansky, 2003).

2.5.4. Kök Hücre Faktörü (SCF)

Kök hücre faktörü hem primitive hem olgun hematopoietik progenitör hücrelerde ifade edilmektedir. İn vitro olarak SCF; lenfoid, miyeloid, eritroid hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarmak için G–CSF, GM–CSF, IL–3

gibi diğer büyüme faktörleri ile birlikte çalışır. G–CSF ile kombinasyon halinde kullanılması periferik kan progenitör hücrelerinin mobilizasyonunu artırdığı gösterilmiştir.

Embriyonik yaşamda hematopoez bölgelerinde, merkezi sinir sisteminde ve bağırsakta eksprese edilir. Yetişkinlerde ise kemik iliği endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir. Normal insan serumunda SCF konsantrasyonları ortalama 3,3 ng/ml'dir. Miyelosupresif kemoterapi veya radyasyon tedavisi kemik iliğinde SCF mRNA düzeylerini artırabilir (Wilkinson vd., 2020).

2.5.5. Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (CSF–1)

Makrofaj koloni uyarıcı faktör monositler, doku makrofajları, dendritik hücreler, mikroglia ve osteoklastlarla temsil edilen mononükleer fagositler yabancı patojenlere karşı vücudun ilk savunma hattını sağlamaktadır. Mononükleer fagositlerin gelişimsel morfolojisi ve fonksiyonları CSF–1 tarafından düzenlenir. M-CSF, endotel hücreleri, fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından yapısal olarak üretilir ve plazmada;10 ng/ml'de tespit edilebilir. CSF-1'in monosit ve makrofajlarda sitotoksisiteyi, süperoksit üretimini, fagositozu, kemotaksiyi artırdığı bilinmektedir (Ushach ve Zlotnik, 2016).

2.5.6. Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G–CSF)

Granülosit koloni uyarıcı faktör, nötrofilik granülositlerin ana düzenleyici olan sitokindir. Nötrofiller doğal bağışıklığın bir parçası olarak patojen mikroorganizmaların vücuttan temizlenmesinde görev alır (Panopoulos ve Watowich, 2008).

Granülosit koloni uyarıcı faktör, Kİ progenitör hücrelerinden nötrofil kolonilerinin büyümesini sağlar. G–CSF fibroblastlar, endotel hücreleri, monositler,

makrofajlar ve Kİ stromal hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Enfeksiyon durumlarında serumdaki G–CSF seviyelerinde ciddi artış izlenmektedir (Panopoulos ve Watowich, 2008).

2.5.7. Granülosit–Monosit Koloni Uyarıcı Faktör (GM–CSF)

Hematopoietik kök hücrenin granülositlere farklılaşması G–CSF'ün yanı sıra granülosit–monosit koloni uyarıcı faktör ile de uyarılır. Çeşitli sitokinler tarafından antijen uyarımı ya da aktivasyonu sonucunda makrofajlar, T hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından Granülosit–monosit koloni uyarıcı faktör üretilir ve salgılanır. HKH'den miyeloid progenitörlerin oluşması, ortak miyeloid progenitörlerden megakaryositlerin, eritrositlerin, miyeloblastların, monositlerin farklılaşması yolaklarında GM–CSF'ün görevi vardır. Miyeloblastlardan da bazofil, nötrofil ve eozinofil hücrelerinin oluşmasında rol oynamaktadır (Mehta vd., 2015). CM-CSF homeostatik koşullar altında düşük bazal dolaşıma sahiptir ancak enfeksiyon veya inflamasyon durumunda seviyesi hızla yükselebilir. GM-CSF ekspresyonu, IL-1α, IL-1ß, TNF-α ve IL-12 gibi proinflamatuar sitokinler tarafından indüklenirken, IL-4, IFN-γ ve IL-10 bunu baskılar (Ushach ve Zlotnik, 2016).

2.5.8. İnterlökin–3 (IL–3)

İnterlökin–3 kemik iliği stromasında üretilmez (Zhu ve Emerson, 2002). IL–3 hematopoez sırasında çoğu hücrenin büyümesini ve miyeloid seriden MEP farklılaşmasını uyarır (Robb, 2007). Ayrıca kök hücrenin kendini yenilemesinde rolü vardır (Robb, 2007; Zhu ve Emerson, 2002). Acil granülopoeze katkıda bulunur (Ueda vd., 2009).

2.5.9. İnterlökin–5 (IL–5)

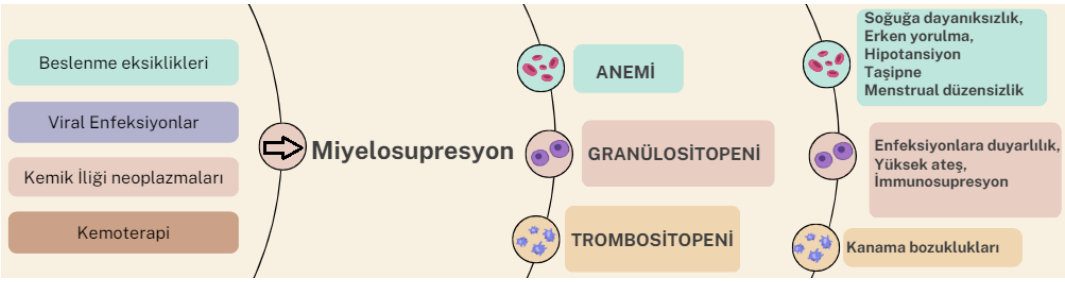
İnterlökin–5 ilk kez saflaştırıldığında bir B hücresi farklılaşma faktörü olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra IL–5'in eozinofil üretiminin ana düzenleyici olduğu anlaşılmıştır. IL–5 sinyalleri IL–3 ve GM–CSF ile birlikte eozinofil proliferasyonunu uyarmaktadır (Metcalf, 2008).

2.5.10. İnterlökin–7 (IL–7)

İnterlökin–7 hem B hem T lenfositlerin hemostazında rol oynamaktadır. Lenfosit hemostazında ayrıca IL–2 ve IL–15'de görev almaktadır (Ma vd., 2006). IL-7 lenfopoezde merkezi bir öneme sahiptir. T hücresi gelişimi için ve timustan ayrılan T hücresinin hayatta kalması için gereklidir. Murin B-lenfositlerin proliferasyonunu indükler. IL-7 lenfositler için bir büyüme ve antiapoptotik faktör olarak kabul edilir. Farelerde IL-7 uygulamasının dalaktaki miyeloid, monositik ve eritroid hücrelerin sayısını artırdığını ve periferik kandaki nötrofil ve monosit sayısını artırdığı gösterilmiştir (Aiello vd., 2007).

2.6. Miyelosupresyon

Miyelosupresyon kemik iliğinde aktif olarak bölünen HKH'lerin hasarlanması sonucu ortaya çıkar. Vücut fonksiyonlarını tahrip eden, yorgunluğa sebep olan, yaşam kalitesini düşüren ciddi bir hastalıktır (Epstein vd., 2020; Feng vd., 2016; Zhao vd., 2011). Bu durum özellikle kemik iliği rezervi azalmış olan ileri yaşlı, miyelodisplazik ya da daha öncesinde kemoterapi almış hastalarda daha şiddetli gözlenir (Dilek, 2010).



Şekil 2.11 *Miyelosupresyon*

Miyelosupresyonun sebepleri arasında beslenme eksiklikleri, viral enfeksiyonlar, kemik iliği neoplastik hastalıkları ve en yaygın nedenlerinden biri olan kan hücresi replasmanını baskılayan ilaçlar sayılabilir. Birçok kemoterapi ilacı ciddi miyelosupresyona sebep olmaktadır. Bu durum tedavide doz sınırlamasına, hatta tedavinin yarıda kesilmesine sebep olabilmektedir (Epstein vd., 2020; Feng vd., 2016; Zhao vd., 2011).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi uygulamalarının sebep olduğu toksisitelerin en önemlisi miyelosupresyondur. Miyelosupresyon kan hücresi üretiminin baskılanmasıyla ilgili, hastaların yaşam kalitesini ve hastalığın prognozunu kötüleştiren ciddi bir patolojidir. Kemoterapide miyelosupresyonu telafi etmenin çok zor olduğu bildirilmiştir (Ghanim, 2020). Kemoterapide doz sınırlayıcı en sık yan etki granülositopeni ve bunu takip eden trombositopenidir. Böbrek üzerinde toksik etki gösteren ilaçlar EPO seviyesinin azalması sonucu anemiye sebep olabilir. Kullanılan ilacın niteliğine göre miyelosupresyonun ortaya çıkış zamanı farklılık gösterebilir. Metotreksat gibi hücre siklusuna etki eden kemoterapötikler üç–beş gün içinde, SP ve antrasiklinler 6–12 günde miyelosupresyona sebep olurken karmustin için bu süre üç ile beş hafta kadardır (Dilek, 2010).

Miyelosupresyona bağlı olarak zaman zaman çeşitli derecelerde immünosupresyon gelişebilmektedir. Alkile edici gruptaki ilaçlar ve antimetabolitler daha uzun süren immünosupresyona sebep olurlar. İmmünsupresyon sonucunda hastalar enfeksiyonlara açık hale gelmektedir (Dilek, 2010).

Miyelosupresyon oluştuktan sonra primer tedavi yöntemi olmasa da transfüzyonlar eritrosit ve trombositlerin yenilenmesinde etkili olabilir. Alternatif bir

yöntem de rekombinant büyüme faktörü (EPO, GCS–F veya filgrastim) enjeksiyonlarıdır. Ancak her iki yöntem de lökosit düzeyini değiştirmez. Kemik iliğinin ileri derecede hasarlandığı vakalarda ilik nakli gerekebilir (Zhao vd., 2011).

Sitotoksik ilaçların sebep olduğu miyelotoksisitenin derecelendirmesi "Yan etkiler için ortak toksisite kriterleri [Common Toxicity Criteria for Adverse Events (CTCAE)]" skalasına göre yapılmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 *Yan Etkiler İçin Ortak Toksisite Kriterleri Skalasına Göre Hematolojik Toksisite Derecelendirmesi (CTCAE)*

Hematolojik Toksisite	**Derecelendirme**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Anemi	NAS**–10 g/dl	10–8 g/dl	8–6,5 g/dl	<6,5 g/dl	Ölüm
Trombositopeni	NAS–75000	75000–50000	50000–25000	<25000	Ölüm
Nötropeni	NAS1500	1500–1000	1000–500	<500	Ölüm
Febril Nötropeni	–	–	Nötrofil sayısı<1000/mm3 iken vücut sıcaklığının ≥38,3ºC tek değer veya ≥38ºC bir saat boyunca sürmesi	Yaşamı tehdit eden değerler, acil müdahale gerektirir.	Ölüm
*Anemide Hb değerinde azalma (g/dl), trombositopenide, trombosit değerinde azalma (mm^3'te) ve nötropenide nötrofil sayısında azalma (mm^3'te) kastedilmiştir. **NAS: Normalin alt sınırı					

Antikanser kemoterapisinde miyelosupresyon önlenmesi zor ve tedaviyi engelleyici bir patolojidir (Feng vd., 2016). Kemoterapi alan hastaların genel sağlık durumları, kullanılan ilaçların yoğunluğu göz önüne alındığında miyelosupresyon gibi

ciddi yan etkilerin azaltılması ya da önlenmesi noktasında, yan etkileri daha az olan alternatif takviyelerin kullanımı gündeme gelmektedir (Zhao vd., 2011).

2.6.1. Anemi

Anemi; kırmızı kan hücresi sayısında ve/veya hemoglobin konsantrasyonunda azalma ve buna bağlı dokuların oksijenlenmesinde yetersizlikle karakterize bir olgudur (Balarajan vd., 2011; Gürsoy vd., 2021). Aneminin süresi aerobik metabolizma, dokuların CO_2'den arındırılması, enerji üretimi gibi metabolik olayların aksamasını etkiler (Balarajan vd., 2011). Oksijen taşınmasının yanı sıra eritrositler uygun asit–baz dengesinin korunmasında da çok önemlidir (Kuhn, 2002).

Anemide klinik bulgular dokulara taşınan oksijenin azalmasıyla ilgilidir. Oksijen miktarı azaldığı için kan vücutta daha hızlı dolaşmaya başlar böylece solunum sayısında artış ve taşikardi gözlenir. Müköz membranlarda solgunluk, dispne ve taşipne, egzersiz intoleransı, depresyon, hipoksi, letarji aneminin belirgin semptomlarıdır (Balarajan vd., 2011).

Kemoterapi ajanlarının kemik iliğini ve EPO'yu baskılaması aynı zamanda kanser hastalarının hastalığa bağlı olarak saf eritroid seri aplazisi gibi durumlarda hastalarda anemi gelişebilir. Soğuğa dayanıksızlık ve erken yorulma aneminin önemli klinik bulgularıdır. Efor sarf eden hastalarda dispne, baş ağrısı, hipotansiyon, renk solukluğu, taşipne ve menstrüel düzensizlik görülebilir (Bahar vd., 2019).

2.6.2. Trombositopeni

Trombositlerin normal olarak kandaki değeri 150.000–400.000/mm^3 arasındadır. Trombosit sayısının 100.000 seviyesinin altına düşmesi trombositopeni olarak adlandırılır. Trombositler kemik iliği tarafından üretildikten sonra üçte ikisi dolaşıma geçerken üçte biri dalakta depolanmaktadır (Çömlekçi, 2019; Smock ve

Perkins, 2014). Trombositopeni iç ya da dış kanamayı da içeren hematolojik patolojiler sergileyen bir durumdur. Trombositopeninin sebebi trombosit üretimindeki azalma, trombosit yıkımının artması ya da dalak sekestrasyonunun azalması olabilir. Düşük trombosit sayısı; lösemi, karaciğer sirozu, dang humması, ebola gibi viral enfeksiyonlar ve sıtma gibi paraziter enfeksiyonlar gibi birçok hastalıkla ilişkili ikincil komplikasyonlardan biridir. Ayrıca heparin, kloramfenikol ve antineoplastik kemoterapi ilaçlarının kullanımından kaynaklanabilir (Nandini vd., 2021).

2.6.3. Lökopeni

Lökopeni, dolaşımdaki lökosit (WBC) miktarının normal değerlerin altına indiği durum olarak tanımlanabilir. Generalize lökopeni olarak görülebileceği gibi granülositopeni (nötropeni) ya da lenfopeni olarak da görülebilir. Sağlıklı yetişkin bir bireyde normal WBC sayısı 4000–11000/µl'dir.

Lökopeni etiyolojisinde; immunosupresifler, antiinflamatuvar ilaçlar, kloramfenikol gibi antibiyotikler, antikonvülsanlar ve sülfonamidler gibi ilaçların yanı sıra sitotoksik kemoterapi bulunmaktadır (Parente, 2019).

2.7.Siklofosfamid ve Miyelosupresyon

Siklofosfamid yapısında bulunan kararsız bir alkil grubu olan R-CH2 ile proteinler ve nükleik asitler üzerindeki nükleofilik merkezlerle reaksiyona girerek alkilleyici bir özellik sergiler. Bu mekanizma ile DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder (Amjad vd.; 2023). Hücre siklusu hızlı olan kemik iliğinin baskılanması SP'nin en sık görülen toksik etkisidir. Siklofosfamid kaynaklı miyelosupresyon kemik iliğindeki miyeloid seri hücrelerini olumsuz etkileyerek eritrosit, trombosit ve lökosit sayılarının düşük seviyelerde seyretmesine sebep olmaktadır (Kuhn, 2002; Özgüven, 2010).

2.7.1. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Anemi

Anemi neoplastik hastalık yaygın olarak görülen bir semptomdur. Ayrıca miyelosupresif kemoterapinin en sık görülen komplikasyonudur (Tas vd., 2002). Siklofosfamid toksisitesine bağlı olarak oluşan anemi, kemik iliği aktivitesi, eritropoez, eritrosit yıkımı ve kemoterapiye bağlı kanamalarla ortaya çıkan çok multifaktöriyel bir olgudur (Kuhn, 2002). Aneminin şiddeti hastalığın yaygınlığına ve tedavinin yoğunluğuna bağlıdır. Tekrarlanan kemoterapi döngüleri eritropoezi kümülatif olarak bozabilir (Tas vd., 2002).

Dolaşımdaki eritrosit sayısının azalması neticesinde ortaya çıkan anemi, halsizliğe sebep olarak kemoterapi alan hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Böbrek yetmezliğinde EPO eksikliği sebebiyle ortaya çıkan aneminin tedavisinde kullanılan rekombinant EPO kullanımı, kemoterapiye bağlı anemi tedavisinde, tedaviye verilen yanıt ve genel prognoz üzerine etkileri açık şekilde ortaya koyulmadığından rutin olarak kullanılmamaktadır (Özgüven, 2010).

2.7.2. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Trombositopeni

Siklofosfamid, kemik iliği megakaryositlerinin olgunlaşmasını baskılayarak farelerde ve sıçanlarda trombositopeniyi indükler (Zhou vd., 2005). SP tedavisi sonrasında kemik iliğinde azalmış trombosit üretimi, periferik trombosit yıkımının artması, dalak sekestrasyonunun artması gibi sebeplerle trombosit sayısı azalmaktadır (Çömlekçi, 2019; Smock ve Perkins, 2014). Kanama hastalarda peteşi, melena, ekimoz, vajinal kanama, hematüri gibi çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir (Çömlekçi, 2019).

2.7.3. Siklofosfamidin Sebep Olduğu Lökopeni

İyileşme süresi diğer antineoplastik ajanlara göre hızlı olmasına rağmen oluşan lökopeni ve granülositopeni sebebiyle ortaya çıkan immünosupresyon, hastanın enfeksiyonlara karşı duyarlılığını arttırır. SP ile tedavi edilen hastalarda, nötropeni sebebiyle yaşamı tehdit eden enfeksiyöz komplikasyonlar yaygındır (Emadi vd., 2009). Günümüzde destek antibiyotik tedavi stratejileri gelişmiş olmasına rağmen kanser hastalarında sekonder enfeksiyonlar hastaların yaşam kalitelerini ve tedavi sürecini olumsuz etkilemekte, mortalite oranlarını ve tedavi maliyetlerini artırmaktadır. Kemoterapiye bağlı gelişen nötropeniyi önlemek amacıyla G–CSF kullanımı proflaksi sağlayabilir ancak oldukça yüksek maliyetlidir (Özgüven, 2010).

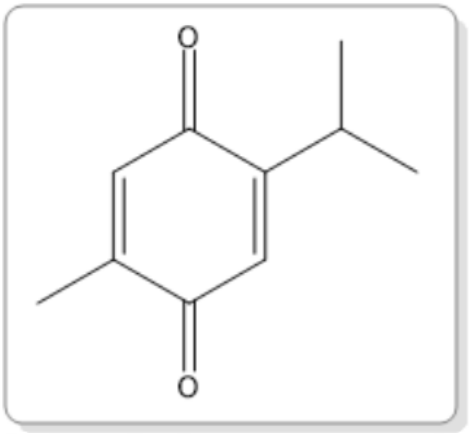
2.8. *Nigella sativa* ve Timokinon

Nigella sativa (NS); halk arasında çörek otu olarak da bilinen, *Ranunculaceae* (düğün çiçeğigiller) botanik ailesinin bir üyesi olarak, tek yıllık, otsu bir bitkidir (Şekil 2.12.) (Darakhshan vd., 2015).

Nigella sativa'nın aktif bileşenlerinden zengin tohumları, yemeklerde tatlandırıcı olarak kullanıldığı gibi, Orta ve Uzakdoğu'da çeşitli patolojilerin tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Darakhshan vd., 2015; Mercan, 2021). NS'nin kimyasal bileşenleri iyi karakterize edilmiştir. Hem sabit hem de esansiyel (uçucu) yağında, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar, alkaloitler, organik asitler, saponinler, ham lifler, vitaminler ve mineraller bulunmaktadır. NS'nin genel olarak aktif bileşenleri timokinon (TK), ditimokinon, timohidrokinon ve timol olarak sayılabilir (Kaçar, 2020; Türkeri, 2019). Timokinon, *Nigella sativa* uçucu yağının biyolojik olarak aktif bileşeni olduğu gibi sabit yağında da bulunmaktadır. NS'nin faydalı etkileri biyoaktif bir bileşen olarak timokinona atfedilmiştir (Ali ve Blunden, 2003; Darakhshan vd., 2015).

2.8.1. Timokinonun Kimyasal Özellikleri

TK (2–izopropil–5–metil–1,4–benzokinon) 10 karbona sahip, koyu sarı renkli kristallere sahip bir bileşiktir (Türkeri, 2019). Molekül ağırlığı 164,204 g/mol olan TK'nın, kimyasal formülü $C_{10}H_{12}O_2$'dir (Şekil 2.13) (Darakhshan vd., 2015; Türkeri, 2019).



Şekil 2.12 *Timokinonun Kimyasal Yapısı*

2.8.2. Timokinonun Farmakolojik Etkileri

Nigella sativa'nın farmakolojik etkilerinin araştırılması amacıyla genellikle bitkinin sabit ve uçucu yağları kullanılmıştır. NS'nin tohumlarının uçucu yağlarının baskın bileşeni olan TK'nın farmakolojik etkileri pek çok çalışmayla araştırılmıştır. Hidrofobik yapıdaki TK oral, intraperitoneal ya da intravenöz yollarla uygulanabilmektedir. Uzak Doğu'da ve Kuzey Afrika'da geleneksel tıbbın bir parçası olarak astım, dizanteri, baş ağrısı, romatizma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Çam, 2019).

Timokinonun Antiinflamatuvar Etkisi: Yapılan çalışmalar TK'nın zamana ve doza bağlı olarak insan kan hücrelerinde hem lökotrien C4 sentaz aktivitesini hem de lipooksijenaz aktivitesini baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Shaterzadeh–Yazdi vd., 2018). Farelerde oluşturulan alerjik astım modelinde TK'nın lökotrien oluşumunu önlediği ve hava yolu inflamasyonunu azalttığı gösterilmiştir (El Gazzar vd., 2006). Yapılan deneysel çalışmalarda asetik asitle indüklenen koliti baskıladığı (Mahgoub, 2003), sıçanlarda karagenanla indüklenen inflamatuar pençe ödemini azalttığı (Hajhashemi vd., 2004), alerji hava yolu inflamasyonu olan fare modelinde siklooksijenaz 2 (COX–2) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (El Mezayen vd., 2006). Sıçanlarda oluşturulan romatoid artrit modelinde TK'nın Toll–benzeri reseptör–2 (TLR–2) ve TLR–4 seviyeleriyle TNF–α, NF–B, IL–1 seviyelerini düşürerek immunomodülatör ve antiinflamatuvar etkisi ortaya konulmuştur (Arjumand vd., 2019).

Timokinonun Antiapoptik Etkisi: TK'nın koruyucu etkisini inceleyen deneysel bir çalışma, timokinonun kanser hücrelerinde bir apoptoz indükleyicisi olduğunu, fakat diğer hücre hasarı tiplerinde oksidatif hasarı azaltarak antiapoptik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (El–Ghany vd., 2009). Cecarini vd. (2010), tarafından yapılan başka bir çalışmada TK'nın kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesinde yer alabilecek seçici proteazom inhibisyonunu indüklediği gösterilmiştir.

Timokinonun Antikanser Etkisi: Antioksidan, antiapoptik ve antiinflamatuvar özellikleri ile timokinon, neoplazmaları önleyebilir ya da azaltabilir (Randhawa ve Alghamdi, 2011; Sethi vd., 2008). TK'nın kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemek, kanser hücrelerinin hücre siklusunu durdurarak gelişimini baskılamak, kemoterapötik ilaçların yan etkilerine karşı korumak, metastazı önlemek gibi etkileri bulunmaktadır (Türkeri, 2019). Kanserli dokularda bax ve kaspaz gibi apoptik genlerin ekspresyonunu artırarak apoptozu uyarır, sitokinleri uyararak NF–ϰB yolağını inaktive ederek onkogenik ekspresyonu kontrol eder. Antioksidan enzimleri artırmak suretiyle hücreleri oksidatif strese karşı korur. Sitokrom p450 enzimini çevresel hasardan korur. Akt aktivasyonunu baskılayarak kanserli hücrelerin hayatta kalmasını bloklar (Türkeri, 2019). Kanser çalışmalarında kullanılan TK'nın meme kanseri (Shoieb vd., 2003), prostat kanseri (Roepke vd., 2007) ve kalın bağırsak

kanseri (Gali–Muhtasib vd., 2004) gibi çok sayıda kanser türünde durdurucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Timokinonun Antioksidan Etkisi: Hücrelerde sürekli olarak aerobik metabolizma sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir. Ayrıca çevre kirliliği, UV radyasyon gibi çevresel etkenler ROS üretimini artırmaktadır. ROS üretimi membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere biyomoleküllerin oksitlenmesine sebep olur. Antioksidan enzimler ROS'lara karşı hücresel savunmanın önemli bir parçasıdır. Glutatyon (GSH), Süper oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon–S–transferaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler hücreleri serbest radikal kaynaklı oksidatif hasarı nötralize etmektedir (Darakhshan vd., 2015). ROS'ların antioksidan mekanizmalarla dengelenememesi durumu birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır. TK hem ROS oluşumunu hem lipit peroksidasyonunu önleyerek hem de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif strese karşı koruyucu bir etki göstermektedir (Çam, 2019; Eren, 2015). Badary vd. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada TK'nın süperoksit radikali ve hidroksil radikali dahil ROS'ları süpürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda TK'nın süperoksit radikaline karşı süperoksit dismutaz enzimi kadar etkili bir koruyucu olduğu gösterilmiştir (Badary vd., 2003; Nagi ve Mansour, 2000). TK; antioksidan özellikli CAT, GSH-Px ve GSH gibi enzimlerin aktivitesini korur (Woo vd., 2012). SP toksisitesine karşı NS ve TK'nın koruyucu etkilerinin ayrı ayrı araştırıldığı bir çalışmada her ikisinin de lipit peroksidasyonunu anlamlı şekilde azaltarak, glutatyon ve katalaz seviyelerini ise anlamlı şekilde artırarak koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Alenzi vd., 2010).

Timokinonun Hematoprotektif Etkisi: Mabrouk vd. (2021), tarafından yapılan bir çalışmada kurşunla (Pb) indüklenen hematoksisiteye karşı timokinonun koruyucu rolü araştırılmıştır. Çalışmanın bulgularına göre Pb ile subkronik maruziyetin sıçanlarda RBC, HGB, HCT ve PLT miktarlarını anlamlı derece düşürerek ve WBC sayısını anlamlı derece artırarak hematolojik parametrelerde belirgin patolojiye sebep olduğu görülmüştür. Buna karşılık TK'nın oral takviyesinin RBC, HGB, HCT ve PLT miktarlarını yükselterek, WBC sayısını azaltarak Pb'nin sebep olduğu hematolojik değişikliklere karşı önemli ölçüde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada Danaei ve Karami (2017), tarafından diazinon ile indüklenen hematoksisite modelinde TK'nın koruyucu etkileri incelenmiştir. Diazinon uygulanan gruplarda yapılan hematolojik tahlillerde RBC, HB, HCT, WBC, LYM, lenfosit, Mono ve PLT sayılarının baskılandığı, IL-4, IL-10 ve INF-γ miktarlarını azalttığı ve kemik iliği mikronükleus testlerinde mikronükleus indekslerini artırdığı görülmüştür. Ayrıca diazinonun serum ve eritrositlerdeki kolinesteraz aktivitesini artırdığı görülmüştür. Kolinesteraz enziminin inhibe edildiği durumlarda, organizmadaki asetilkolin miktarı artar ve sinir sistemindeki muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanarak akut toksisite semptomlarının ortaya çıkmasına neden olur. Bu çalışmada TK takviyesinin diazinon ile indüklenen kolinesteraz aktivitesinin inhibisyonunu önlediği görüldü. Ayrıca TK takviyesi hematolojik parametreleri kontrol grubuna yaklaştırarak hematoprotektif etki göstermiştir. Mikronükleus indekslerine bakıldığında TK'nın diazinonun genotoksik etkisini baskıladığı ancak önemli ölçüde engellemediği görülmüştür.

Timokinonun Toksisitesi: NS ve TK'nın toksisitesi ile ilgili yapılmış çalışmalarda kronik maruziyette LD_{50} değerinin ratlarda iki mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Deney sonunda karaciğerde histopatolojik bir değişiklik olmadığı ve enzim düzeylerinin değişmediği görülürken serum glikoz düzeyleri ile lökosit ve trombosit miktarında kontrole göre bir azalma ve hematokrit ve hemoglobin düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğu belirtilmiştir. Çalışmalarda belirlenen LD_{50} değerlerinin TK'nın protektif etkileri için kullanılan ip. dozlarından 10–15 kat, oral dozlarından ise 100–150 kat daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada TK'nın laboratuvar hayvanlarında 794,3 mg/kg doz LD_{50} değeriyle özellikle oral kullanımda oldukça güvenli olduğu belirtilmiştir (Al-Ali vd., 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzni

Çalışmanın etik kurul izni Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.12.2021 tarih ve 2021/065 karar numaralı Etik Kurul İzin Belgesi ile alındı. Deneysel çalışma Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 32 adet 230-250 gr ağırlığındaki 8–10 haftalık Sprague Dawley ırkı erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar gruplara randomize olarak dağıtıldı ve her kafeste dört adet hayvan olacak şekilde yerleştirildi. Hayvanlar merkezi havalandırma sistemiyle havalandırılan odalarda, 12 saatlik aydınlık karanlık döngüsünde, 21–24°C oda sıcaklığında, %45–65 nemde barındırıldı. Deney süresi boyunca içme suyuyla ve standart rasyonlu pelet sıçan yemi ile ad libitum olarak beslendi.

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 *Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler*

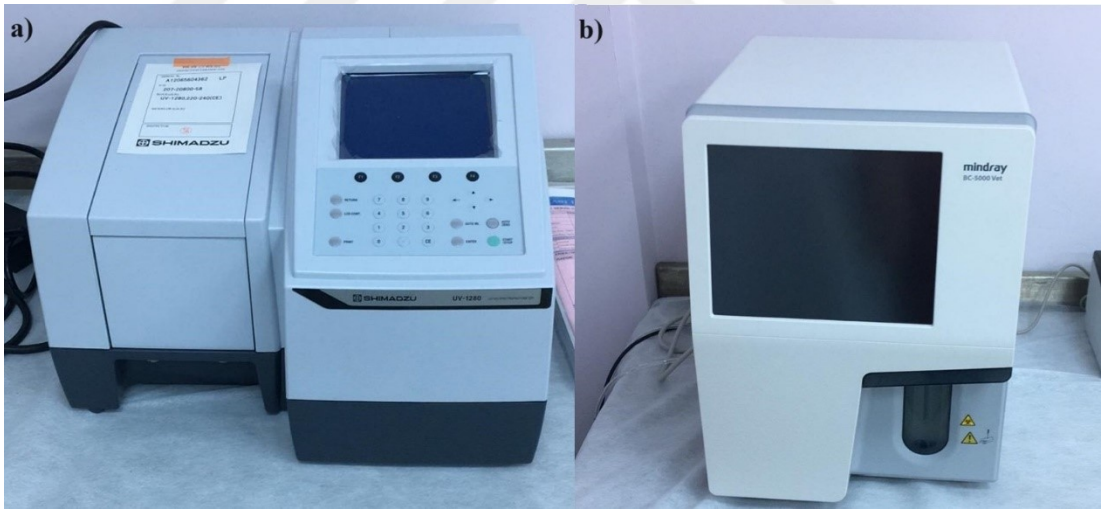
Kimyasal Adı	Firma	Katalog
Endoksan (Siklofosfamid)	Eczacıbaşı İlaç, İstanbul, Türkiye	
Timokinon	Sigma–Aldrich, ABD	274666–5G
Alfamine (Ketamin)	Alfasan, Hollanda	
Alfazyne (Ksilazin)	Alfasan, Hollanda	
Trikloroasetik Asit	Sigma–Aldrich, ABD	275–04–66
Thiobarbitürik Asit	Sigma–Aldrich, ABD	504–17–6
DTNB	Sigma–Aldrich, ABD	234–85–03C
Eritropoietin (ELISA Kiti)	SunRed	201–11–0294
Trombopoietin (ELISA Kiti)	SunRed	201–11–0691
Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (ELISA Kiti)	SunRed	201–11–0429

3.4.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmada kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri ve marka, model bilgileri tablo 3.2'de gösterilmiştir (Şekil 3.1).

Tablo 3.2 *Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri*

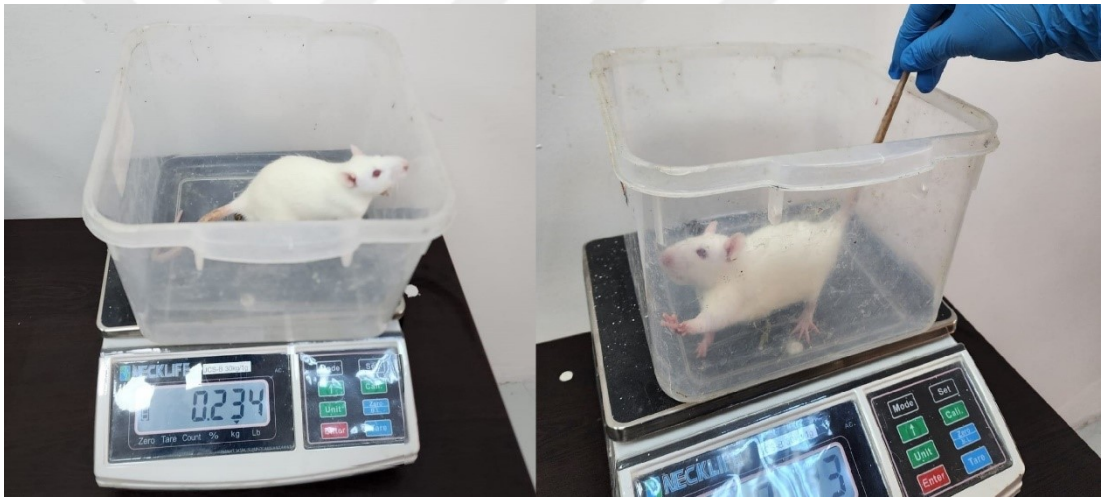
Cihaz Adı	**Marka/Model**
Hematoloji Cihazı	Hasvet /Mindray Bc500
Spektrofotometre	Shimadzu /UV 1280
Soğutmalı Santrifüj	Nüve/Fn/ 800r
Sirkülasyonlu Su Banyosu	Nüve /Bm 15
Derin Dondurucu	Nüve /Df 290
Otomatik Mikropipet	A.B.T /642460035
Hassas Terazi	Radwag/Ps600
Kaba Terazi	Radwag/ Wkc20/ A2
Mikroskop	Carl Zeiss /Axiocam Erc5
Mikroplate Okuyucu	Biochrom / EZ READ 400



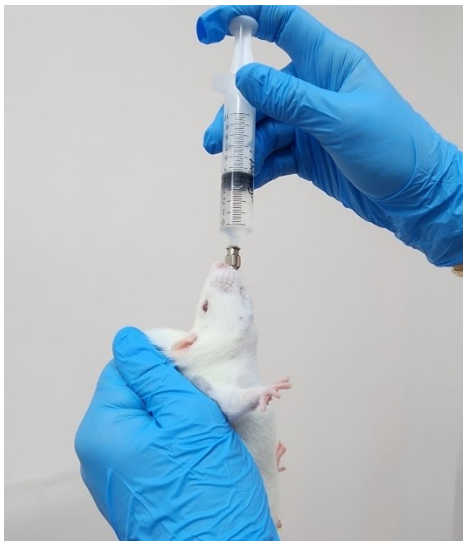
Şekil 3.1 *Cihazlar (a: Spektrofotometre, b: Hematoloji Cihazı)*

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Çalışmada kullanılacak hayvanlar her grupta sekiz adet olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı. Yedi günlük alıştırma periyodundan sonra hayvanların ağırlıkları ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.2). Kontrol grubuna hayvanların tutma ve işlemler esnasında maruz kaldıkları stresin etkisinin elimine edilmesi amacıyla deney süresi boyunca her gün bir ml salin gavajı yapıldı (Şekil 3.3). SP ve TK+SP gruplarına miyelosupresyonu indüklemek amacıyla 1. 8. 15. ve 22. günlerde toplamda dört kez 50 mg/kg dozda ip. SP enjeksiyonu yapıldı. TK ve TK+SP gruplarına ise deney süresince her gün 10 mg/kg dozda intragastrik TK gavajı yapıldı (Tablo 3.3, Şekil 3.4).



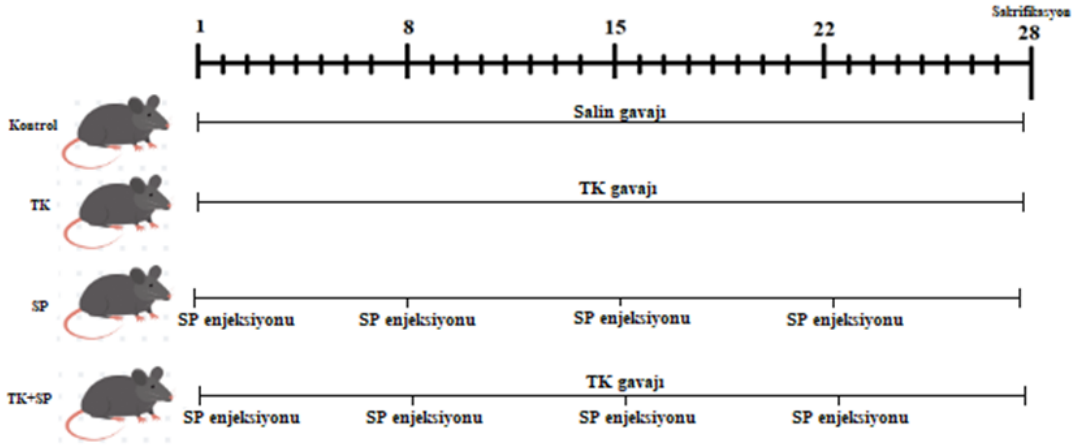
Şekil 3.2 *Deneyde Kullanılan Sıçanların Tartım İşlemi*



Şekil 3.3 *Sıçanlara İntragastrik Gavaj Uygulanması*

Tablo 3.3 *Deney Grupları*

Gruplar	Yapılan Uygulamalar
Kontrol	28 gün boyunca intragastrik gavajla bir ml salin uygulandı.
TK	28 gün boyunca intragastrik gavajla 10 mg/kg/gün dozda bir ml TK uygulandı.
SP	1. 8. 15. 22. günlerde, 50 mg/kg (ip) dozda haftada bir kez toplam dört kez, bir ml, SP enjeksiyonu uygulandı.
TK+SP	28 gün boyunca intragastrik gavajla 10 mg/kg/gün dozda bir ml TK ve 1. 8. 15. 22. günlerde, 50 mg/kg (ip) dozda haftada bir kez toplam dört kez, bir ml, SP enjeksiyonu uygulandı.



Şekil 3.4 *Deney Protokol Şeması*

Hayvanların canlı ağırlıkları haftalık ölçümlerle kaydedildi. 28 günlük deney protokolü sonunda hayvanlar kombine ketamin (90 mg/kg, ip) ve ksilazin (10 mg/kg, ip) anestezisi altında eksanguinasyonla sakrifiye edildi.

3.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Timokinon çözeltisi: Her bir hayvana 10 mg/kg dozda TK verebilmek için, 336 mg TK, 65°C'deki 112 ml sıcak suda karıştırılarak çözdürüldü. TK stok çözeltisi haftalık olarak hazırlandı (Aktaş ve Gür, 2022; Mabrouk., 2021).

Siklofosfamid çözeltisi: Ticari olarak alınan ilacın paketinden çıkan 500 mg IV infüzyonluk çözelti tozu içeren flakon, paketten çıkan 20 ml'lik salinle karıştırılarak homojen bir çözelti oluşması sağlandı.

Trikloroasetik asit %10'luk (TCA): 10 gr TCA ile 100 ml distile suda hazırlandı.

Thiobarbitürik asit %0,67'lik (TBA): 0,67 g TBA 100 ml H_2O'da hazırlandı.

Ellman solüsyonu: 40 mg DTNB (elman reaktifi): %1'lik 100 ml sodyum sitratla karıştırılarak hazırlandı.

3.5.2. Kan ve Doku Örneklerinin Eldesi

Biyokimyasal analizler için antikoagülan içermeyen jelli biyokimya tüplerine üç ml kan alındı. Biyokimya tüplerine alınan kanlar, +4°C'de 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek kan serumları elde edildi. Elde edilen serumlar ilgili analizler yapılana kadar –80°C'de muhafaza edildi. Hematolojik analizler için Etilen diamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere iki ml kan örneği alındı. Hematolojik analizler kan örnekleri alındıktan sonra 24 saat içerisinde yapıldı.

3.5.3. Kemik Numunelerinin Hazırlanması

Femur ve sternum kas dokularından ayrılarak %10'luk formaldehite konuldu ve histolojik incelemeler yapılmadan önce tespit olması sağlandı.

3.6. Analizler

3.6.1. Hematolojik Analizler

Hayvanlardan alınan kanlar EDTA'lı tüplere aktarıldıktan sonra Hasvet Mindray Bc 5000 otomatik kan sayım cihazında hematolojik parametreler [Lökosit (WBC), nötrofil (Neu), lenfosit (Lym), monosit (Mono), eozinofil (Eos), bazofil (baso), eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), ortalama korpuskuler

hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), eritrosit dağılım genişliği (RDW) ve platelet (PLT)] analiz edildi.

3.6.2. Histopatolojik Analizler

Gruplara ait kemik doku örnekleri alınarak %10'luk formaldehit solüsyonunda bir hafta tespit edildi. Dokuların fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra formik aside alınarak dekalsifikasyon işlemi başlatıldı. Yaklaşık bir buçuk ay süren dekalsifiye işleminden sonra alkol, ksilen ve paraplast kimyasallarından oluşan rutin histolojik doku takibi işlemi yapıldı. Daha sonra doku örnekleri parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklardan histopatolojik inceleme yapılabilmesi için beş µm kalınlıkta ince kesitler alındı. Hazırlanan kesitler ksilen kullanılarak deparafinize edildi ve Hematoksilen –Eozin (H&E) boyama yöntemi ile boyandı. Boyanan kesitlerde kemik iliği alanları Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 model dijital kamera ataçmanlı mikroskop ile incelenerek histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada histopatolojik skorlama için Bekheet'ten uyarlanan histopatolojik skorlama sistemi kullanılarak yarı kantitatif olarak değerlendirme yapıldı (Bekheet, 2010). Değerlendirmede 0 (yok), 1 (az), 2 (orta) ve 3 (yoğun) şeklinde derecelendirilme yapıldı.

Doku Takibi Prosedürü:

- Akarsuda yıkama 12 saat
- Dehidratasyon işlemi:
  - %70'lik Etil Alkol bir saat
  - %80'lik Etil Alkol bir saat
  - %96'lık Etil Alkol bir saat
  - %96'lık Etil Alkol bir saat
  - %100'lük Etil Alkol bir saat
  - %100'lük Etil Alkol bir saat
- Şeffaflaştırma işlemi:
  - Ksilen 30 dakika

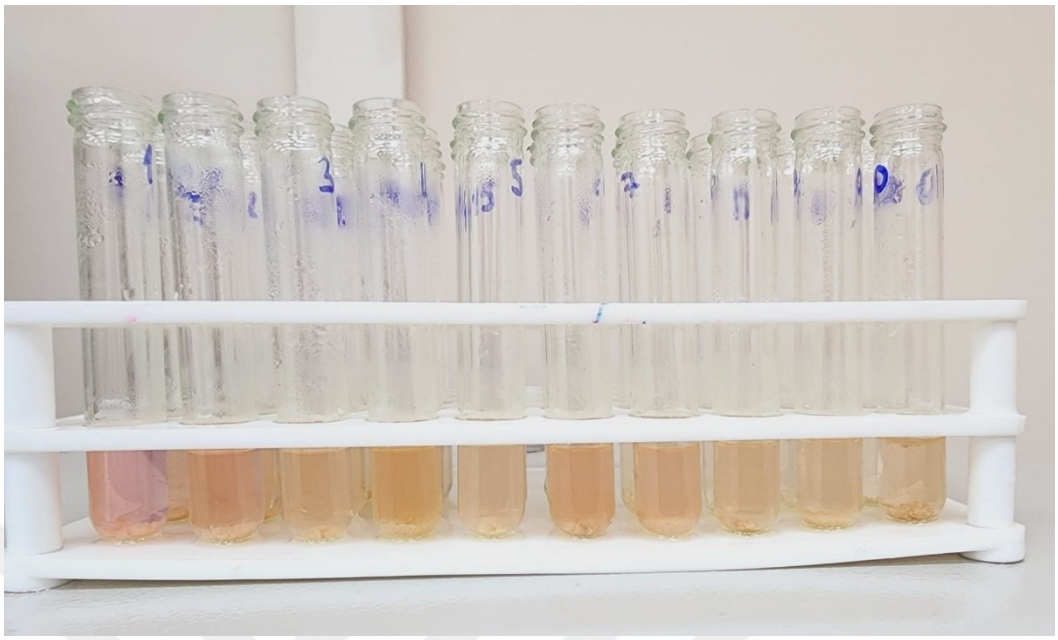
- ─ Ksilen 30 dakika
- İnfiltrasyon işlemi:
  - ─ Parafin bir saat
  - ─ Parafin bir saat
- Dokuların Gömülme İşlemi

Hematoksilen–Eozin Boyama Prosedürü:

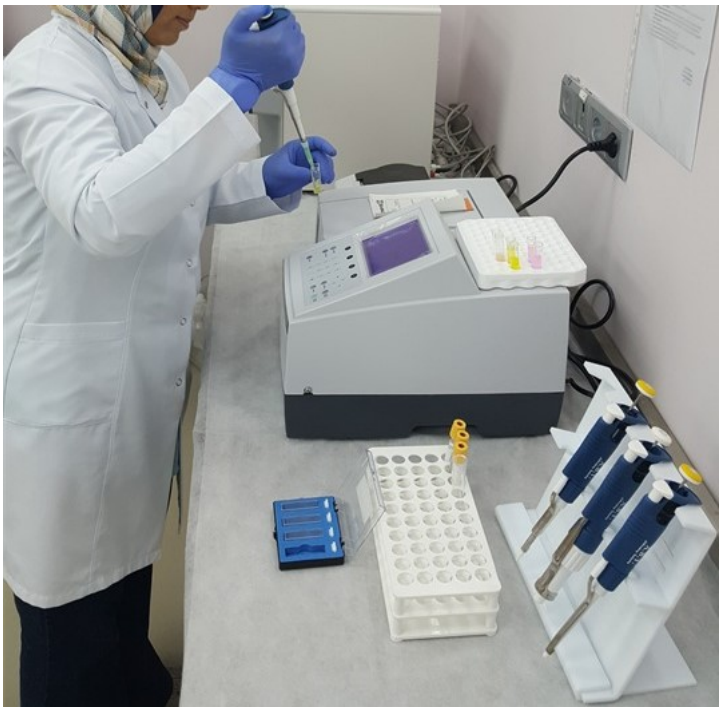
- Ksilen 20 dakika
- Ksilen 20 dakika
- %80'lik Etil Alkol 10 dakika
- %96'lık Etil Alkol beş dakika
- Çeşme suyunda yıkama
- Hematoksilen bir dakika
- Asit–Alkol karışımına batırılıp çıkarma
- Eozin bir dakika
- Suda yıkama bir dakika
- %80'lik Etil Alkol 10 dakika
- %96'lık Etil Alkol 10 dakika
- Ksilen 20 dakika
- Entellan ile kapama

3.6.3. Biyokimyasal Analizler

Malondialdehit (MDA) Analizi: Analiz gününe kadar –80°C'de bekletilen serumlar çalışma günü +4°C'de çözdürüldükten sonra 250 mikrolitre (µl) serum örneği bir ml %10'luk Trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırıldı. 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. 750 µl süpernatant ve 750 µl thiobarbitürik asit (TBA) cam tüpte karıştırılıp 15 dakika 95°C'de inkübe edildi. Daha sonra tüpler oda ısısında bekletilerek soğuması sağlandı. Soğuyan örnekler dört dakika 3000 rpm'de tekrar santrifüj edildi (Şekil 3.5). Oluşan süpernatant kısım spektrofotometrede 535 nanometrede köre karşı okundu (Şekil 3.6). Kör için 750 µl TCA ve 750 mikrolitre TBA karışımı hazırlandı. Sonuçlar nmol/ml olarak hesaplandı.

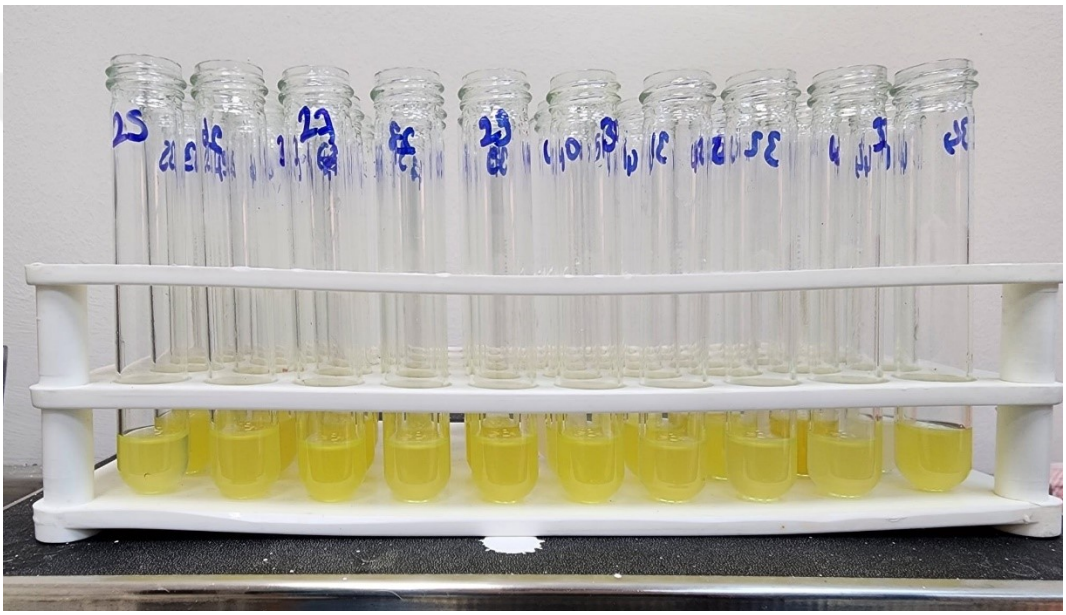


Şekil 3.5 *MDA Analizinde Numunelerde Görülen Renk Değişimleri*



Şekil 3.6 *Spektrofotometrede Ölçüm*

Glutatyon (GSH) Analizi: Glutatyon analizi için çözdürülen serumlardan 250 µl serum örneği bir ml %10'luk TCA ile karıştırıldı. 3000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. 250 µl süpernatant, 1000 µl 0,3 Na_2HPO_4 ve 125 µl Elman solüsyonu ile karıştırılarak 10 dakika oda ısısında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.7). Spektrofotometrede 412 nanometrede köre karşı okutuldu (Şekil 3.6). Sonuçlar µmol/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.7 *GSH Analizinde Numunelerde Görülen Renk Değişimleri*

Eritropoietin (EPO) Analizi: Çalışma sonunda –80'den çıkarılan serumlar +4°C'de bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Sıçan ELISA EPO kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda serum EPO düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

Numunelerdeki EPO miktarı standart eğri kullanılarak IU/L olarak hesaplandı.

Trombopoietin (TPO) Analizi: Çalışma sonunda –80'den çıkarılan serumlar +4°C'de bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Sıçan ELISA TPO kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda serum TPO düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

Numunelerdeki TPO miktarı standart eğri kullanılarak ng/L olarak hesaplandı.

Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (G–CSF) Analizi: Çalışma sonunda –80'den çıkarılan serumlar +4°C'de bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Sıçan ELISA G–CSF kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda serum G–CSF düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi.

Numunelerdeki G–CSF miktarı standart eğri kullanılarak ng/L olarak hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 22.0 (IBM SPSS statistic for Windows, version 22.0 Armonk, NY: IBM corp.) programı kullanılarak yapıldı.

Verilerin normal dağılımı Shapiro–Wilk testi ve grafiksel olarak kontrol edildi. Veriler kullanılırken ortalama (X) ve standart deviasyon (SD) değeri kullanıldı. Gruplar arası ortalamalar arası fark tek yönlü varyans analizi (oneway ANOVA) ve Post Hoc Tukey testi kullanılarak belirlendi. Tüm istatistiksel testlerde $p<0.05$ anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

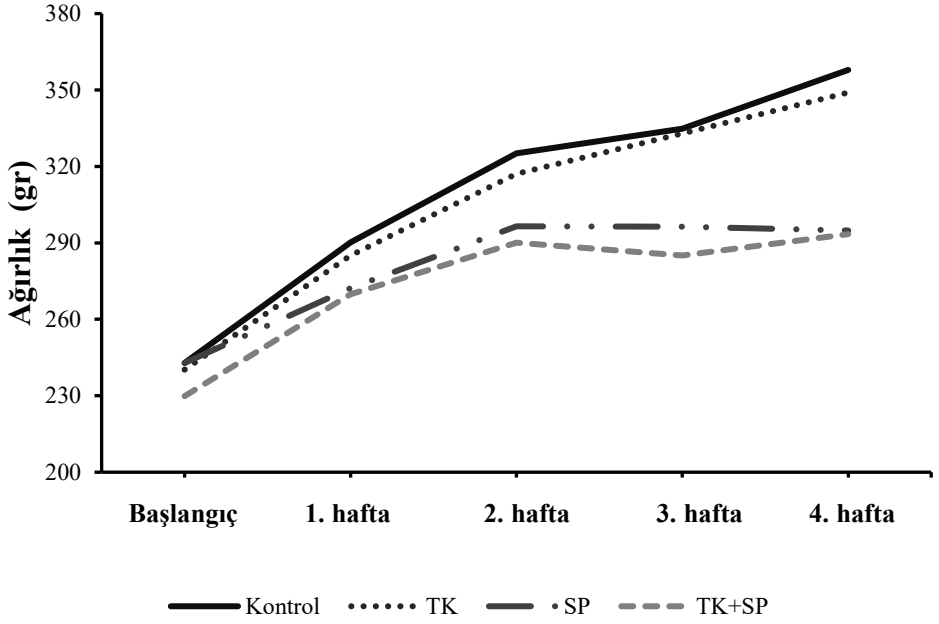
4.1.Canlı Ağırlık Bulguları

Grupların ağırlık değişimleri incelendiğinde kontrol ve TK gruplarının ağırlıklarında zamana bağlı doğrusal bir artış olduğu, üçüncü haftaya kadar gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı, dördüncü haftada ise SP ve TK+SP gruplarının ağırlık değişimlerinin hem kontrol grubuna ($p<0.001$) hem de TK grubuna göre önemli oranda azaldığı görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Fakat SP ve TK+SP grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo 4.1 *Grupların Ortalama Canlı Ağırlık Değişimleri (g)*

Grup	Başlangıç	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta
Kontrol	242,87±25,23	290,25±24,45	325,12±26,24	334,75±47,09	357,87±28,57
TK	240,25±20,55	285±27,14	317,12±32,74	332,87±31,97	349±38,20
SP	242,87±21,06	272,25±23,05	296,50±29,43	296,37±33,72	294,87±36,83[a,b]
TK+SP	229,85±12	269,85±19,24	290,14±22,88	285,00±33,05	293,42±29,70[a,b]

[a]Kontrol grubu ile fark var ($p<0.001$), [b]TK grubu ile fark var ($p<0.05$).



Şekil 4.1 *Grupların Ortalama Canlı Ağırlık Değişimleri*

4.2.Hematolojik Bulgular

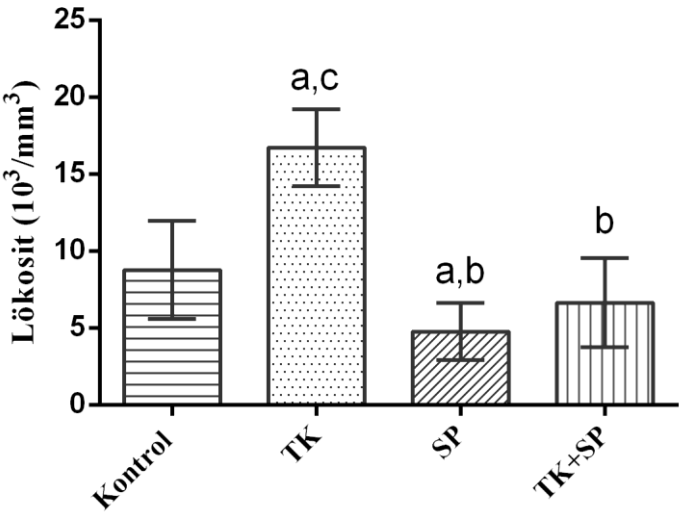
Uygulama sonrası grupların hematolojik parametrelerindeki değişimler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 *Gruplara Göre Sıçanların Hematolojik Parametrelerindeki Değişimler (Ort±SD)*

	Kontrol	TK	SP	TK+SP
WBC $10^3/mm^3$	7,2±1,2	16,7±2,5^{a**,c**}	4,2±0,7^{a**,b**}	6±1^{b**}
NEU (%)	3,9±0,9	5,3±0,9^{a*}	1,6±0,4^{a**,b*}	1,7±1,4^{a**,b**}
EOS (%)	0,15±0,03	0,16±0,003	0,002±0,0008^{a**,b**}	0,02±0,006^{a**,b**}
BASO (%)	0,4±0,08	0,4±0,05	0,0025±0,0008^{a**,b**}	1,9±0,8^{a**,b**,c**}
MONO (%)	3,5±0,3	4±0,3^{a*}	0,5±0,2^{a**,b**}	0,5±0,3^{a**,b**}
LYM (%)	6,5±0,4	14,1±2,4^{a**}	1,8±0,4^{a**b**}	1,9±0,40^{a**,b**}
RBC ($10^6/mm^3$)	7,4±0,4	8,4±0,3^{a**}	7,5±0,4^{b*}	7,4±0,2^{b*}
HGB (g/dl)	13,8±0,4	15,3±0,8^{a*}	13,5±1^{b*}	13,9±0,8^{b*}
HCT (%)	40,8±0,8	43,7±2,3	38,8±2,4^{b**}	40±1^{b*}
MCV (μm^3)	52,3±1,5	52,2±2	51,4±1,1	54±0,9^{a*,b*,c**}
MCH (pg)	18,6±0,9	18,3±0,6	18±0,6	18±0,6
MCHC (g/dl)	33,8±1,3	35±0,7	34,9±0,7	34,5±1,2
RDW (%)	17,2±1,3	15±1,9	14±1,6^{a*}	17,7±2,1^{b*,c*}
PLT ($10^3/mm^3$)	754,9±53	736±46,7	453±38,1^{a**,b**}	832,7±74,5^{a*,b*,c**}

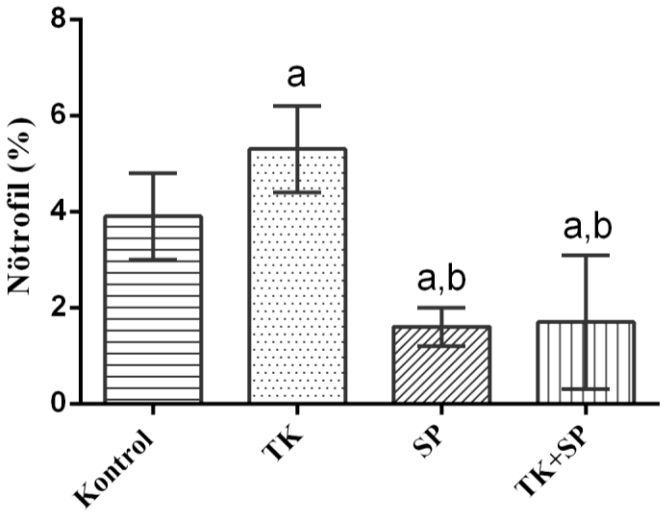
^{a}Kontrol grubu ile fark var, ^{b}TK grubu ile fark var, ^{c}SP grubu ile fark var, *p<0.05, **p<0.001

Uygulama sonrası grupların hematolojik parametrelerinden lökosit sayılarındaki değişimler incelendiğinde siklofosfamid uygulaması SP grubunda lökosit sayısını kontrol grubuna göre önemli oranda azaltırken (p<0.001), TK+SP grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Diğer taraftan sadece timokinonun uygulandığı TK grubunda lökosit sayısının kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı tespit edildi (p<0.001). (Tablo 4.2, Şekil 4.2).



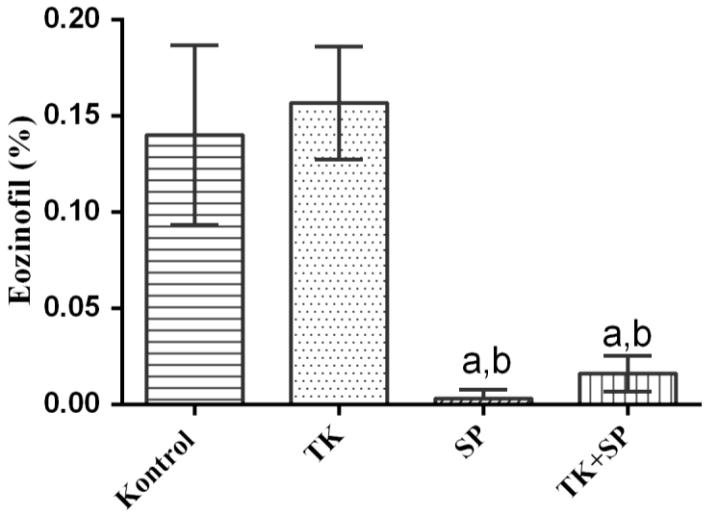
Şekil 4.2 *Grupların Lökosit Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var).*

Hematolojik parametrelerden nötrofil değerlerindeki değişimler incelendiğinde, siklofosfamid uygulamasının SP grubunda nötrofil sayısını kontrole göre anlamlı oranda azalttığı ($p<0.001$), timokinon takviyesinin (TK+SP) siklofosfamidin sebep olduğu nötrofil sayısındaki azalmayı kısmen engellediği ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmediği tespit edildi. TK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış gözlendi ($p<0.05$). (Tablo 4.2, Şekil 4.3).



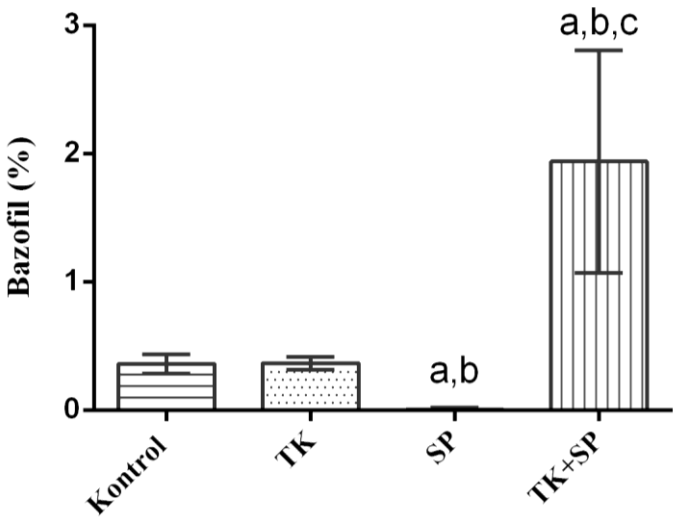
Şekil 4.3 *Grupların Nötrofil Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Grupların eozinofil değerlerindeki değişimler incelendiğinde, siklofosfamid uygulamasının SP grubunda eozinofil sayısını kontrol ve TK grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalttığı ($p<0.001$), TK+SP grubunda timokinon takviyesinin siklofosfamidin sebep olduğu bu baskılanmayı kısmen engellediği ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşmediği görüldü (Tablo 4.2, Şekil 4.4).



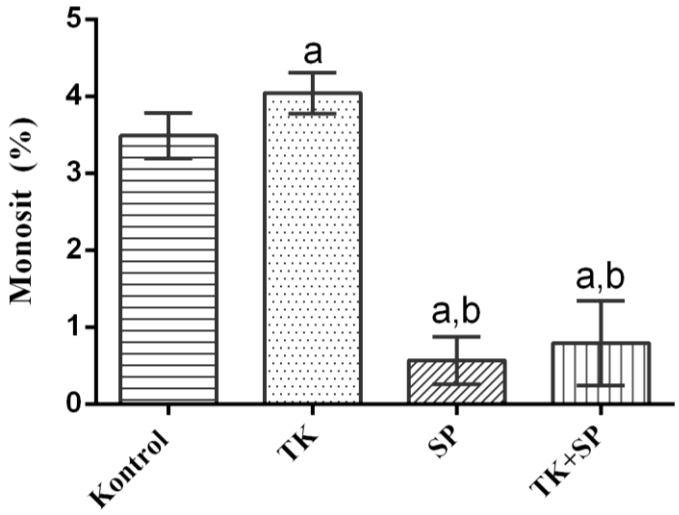
Şekil 4.4 *Grupların Eozinofil Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Grupların hematolojik parametrelerinden bazofil düzeyleri incelendiğinde, siklofosfamidin SP grubunda bazofil sayısını kontrol ve TK grubuna göre önemli oranda azalttığı gözlendi ($p<0.001$). TK+SP grubunda ise kontrol, TK ve SP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi ($p<0.001$) (Tablo 4.2, Şekil 4.5).



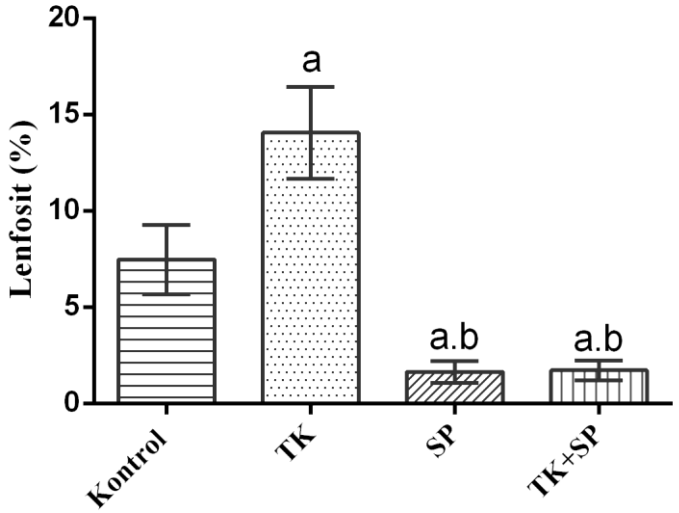
Şekil 4.5 *Grupların Bazofil Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var)*

Grupların monosit sayılarındaki değişiklikler incelendiğinde TK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlendi ($p<0.05$). Siklofosfamid uygulaması SP grubunda hem kontrol hem TK grubuna göre monosit sayılarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı ($p<0.001$). TK+SP grubunda SP grubuna göre anlamlı olmayan kısmi bir artış gözlendi (Tablo 4.2, Şekil 4.6).



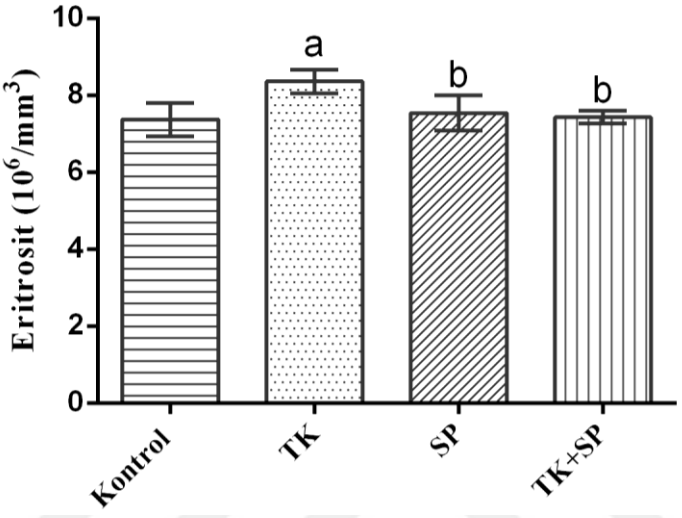
Şekil 4.6 *Grupların Monosit Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Lenfosit sayıları incelendiğinde TK grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0.001$). SP ve TK+SP grubunda Lenfosit sayıları kontrol ve TK grubuna göre anlamlı derecede azaldı ($p<0.001$) (Tablo 4.2, Şekil 4.7).



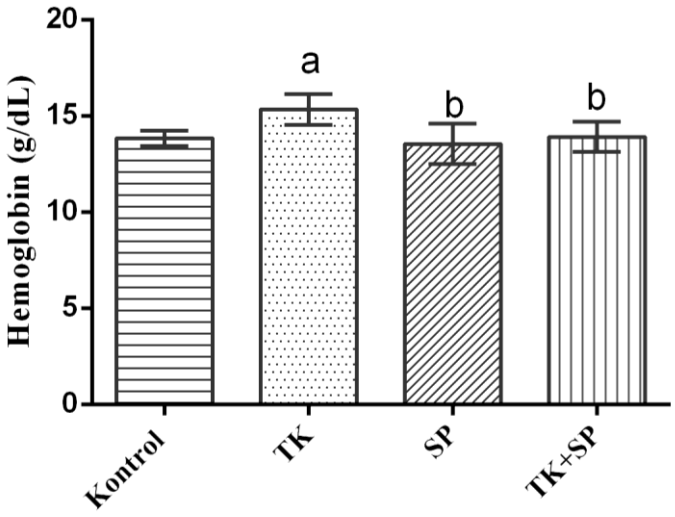
Şekil 4.7 *Grupların Lenfosit Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Grupların eritrosit düzeylerinde TK grubunda kontrole göre anlamlı bir artış görüldü ($p<0.001$). SP ve TK+SP grubunda kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p<0.05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.8).



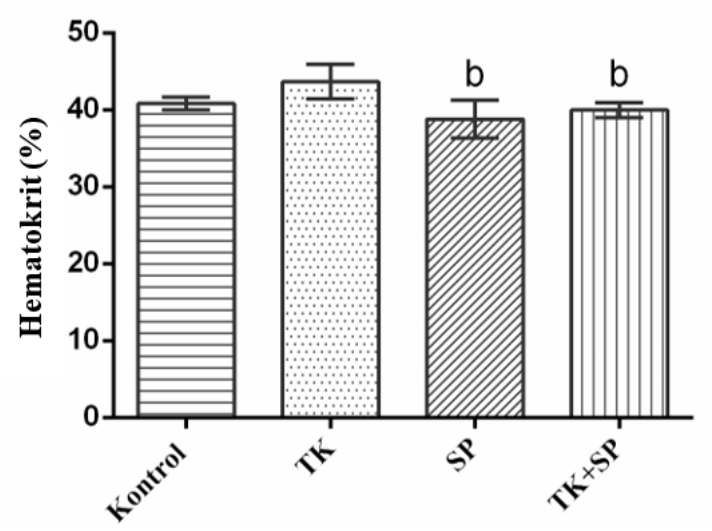
Şekil 4.8 *Grupların Eritrosit Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Hemoglobin düzeylerindeki değişim eritrosit sayılarındaki değişime benzer şekildeydi. TK grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek iken ($p<0.05$). SP ve TK+SP gruplarında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık yoktu (Tablo 4.2, Şekil 4.9).



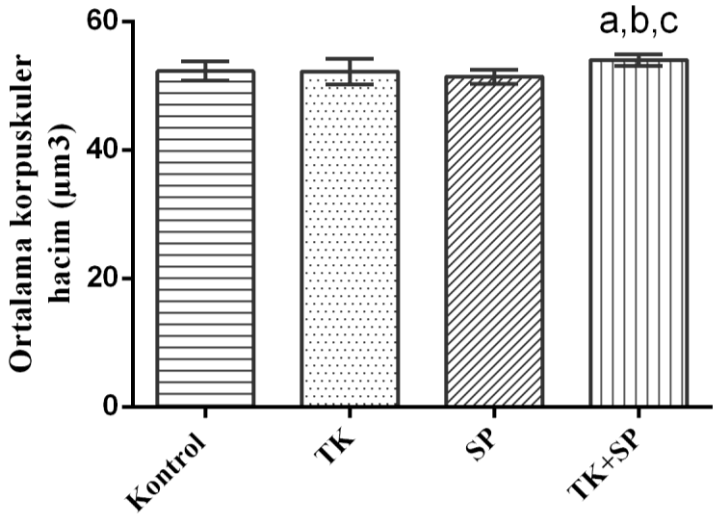
Şekil 4.9 *Grupların Hemoglobin Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

Uygulama sonrası grupların hematokrit değerleri TK grubunda kontrole göre yüksekti ancak bu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi ($p>0.05$). SP ve TK+SP gruplarında hematokrit değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde bir azalma gözlenirken TK grubuna göre anlamlı düzeyde bir azalma tespit edildi. (Tablo 4.2, Şekil 4.10).



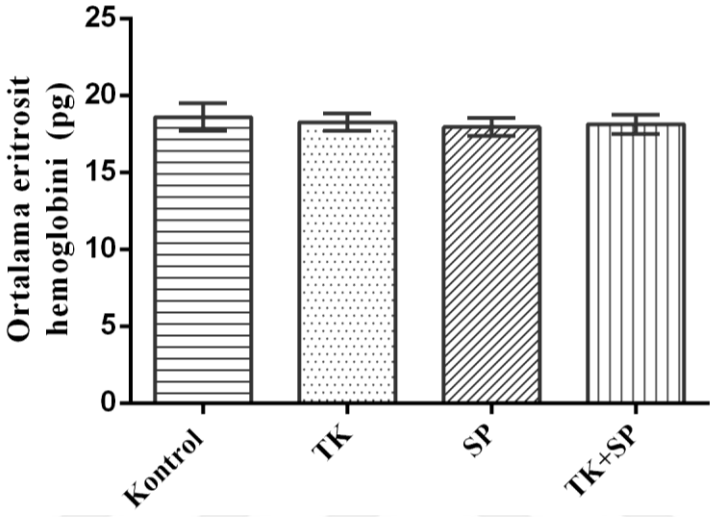
Şekil 4.10 *Grupların Hematokrit Değerleri (b: TK grubu ile fark var)*

Ortalama korpuskuler hacim değerlerindeki değişime bakıldığında TK ve SP grubunda kontrol grubuna göre bir değişim gözlenmezken, TK+SP grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde artış gözlendi (Tablo 4.2, Şekil 4.11).

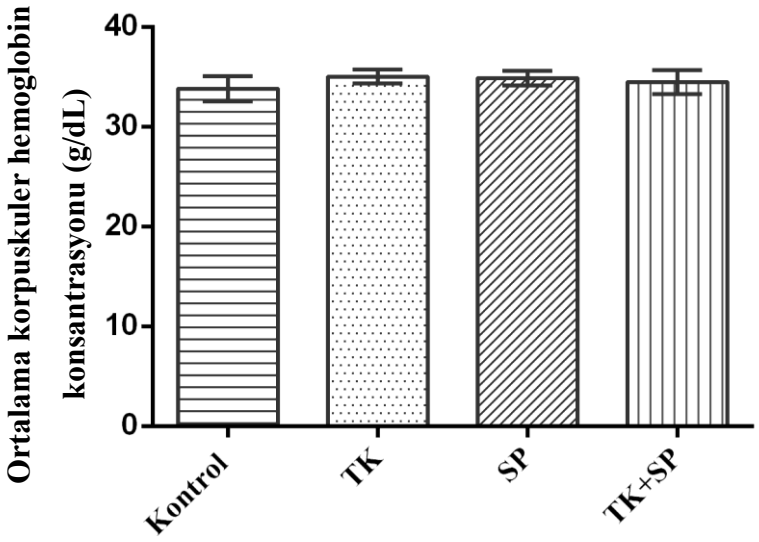


Şekil 4.11 *Grupların Ortalama Korpuskuler Hacim Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var).*

Gruplar arasında ortalama eritrosit hemoglobini ve ortalama korpuskuler hemoglobin konsantrasyonu değerleri açısından herhangi bir anlamlı düzeyde farklılık yoktu (Tablo 4.2, Şekil 4.12–13).

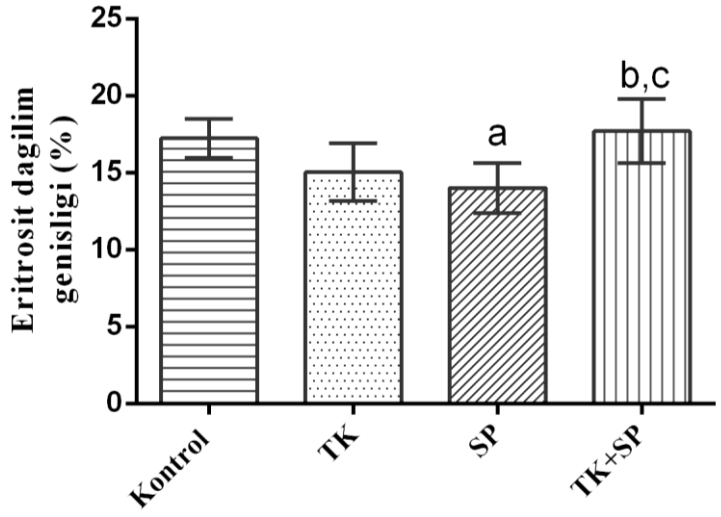


Şekil 4.12 *Grupların Ortalama Eritrosit Hemoglobini Değerleri*



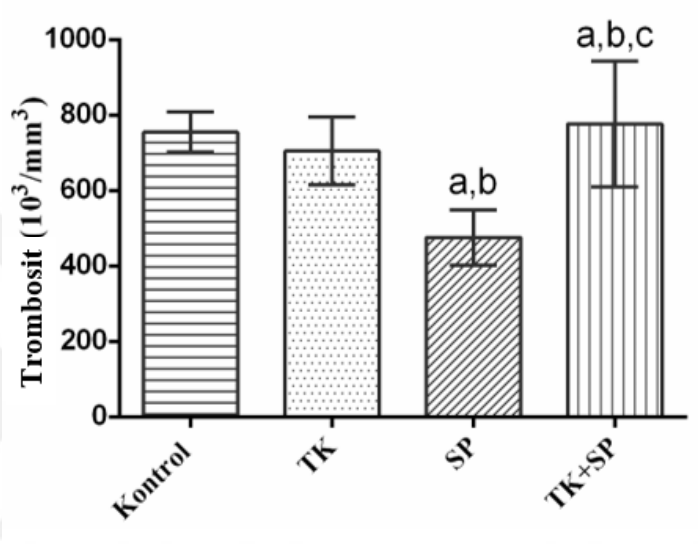
Şekil 4.13 *Grupların Ortalama Korpuskuler Hemoglobin Konsantrasyonu Değerleri*

Eritrosit dağılım genişliği değerleri açısından SP grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde azalma gözlenirken ($p<0.05$), TK+SP grubunda ise SP grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.14).



Şekil 4.14 *Grupların Eritrosit Dağılım Genişliği (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var).*

Trombosit düzeyleri incelendiğinde; TK grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). SP grubunda hem kontrol hem de TK gruplarına göre anlamlı düzeyde bir azalma gözlendi ($p<0.05$). TK+SP grubunda ise diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde artış mevcuttu (Tablo 4.2, Şekil 4.15).



Şekil 4.15 *Grupların Trombosit Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var).*

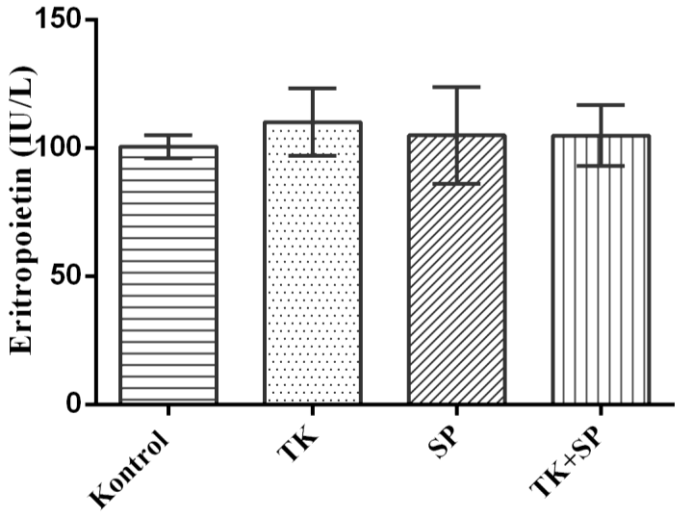
4.3. Hematopoietik Sitokin Bulguları

Uygulama sonrası hematopoezle ilişkili büyüme faktörlerinden olan serum EPO düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 4.3, Şekil 4.16).

Tablo 4.3 *Grupların Serum Hematopoietik Sitokin Değerleri (Ort±SD)*

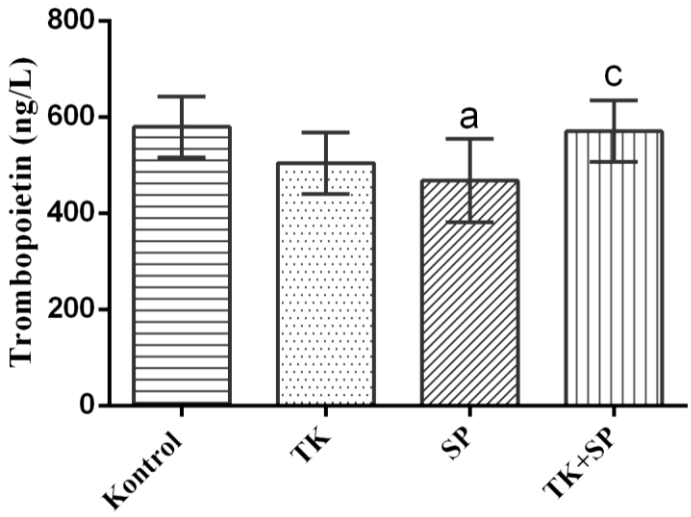
	Kontrol	TK	SP	TK+SP
EPO	100,5±4,5	110,1±13,2	104,9±18,8	104,8±11,9
TPO	579,6±63	504±64,1	467,8±87[a*]	570,5±64,3[c*]
G–CSF	724,9±69,9	684,2±76,8	540,5±28,8[a**,b*]	566,3±119,4[a*,b**]

[a]Kontrol grubu ile fark var, [b]TK grubu ile fark var, [c]SP grubu ile fark var, *p<0.05, **p<0.001



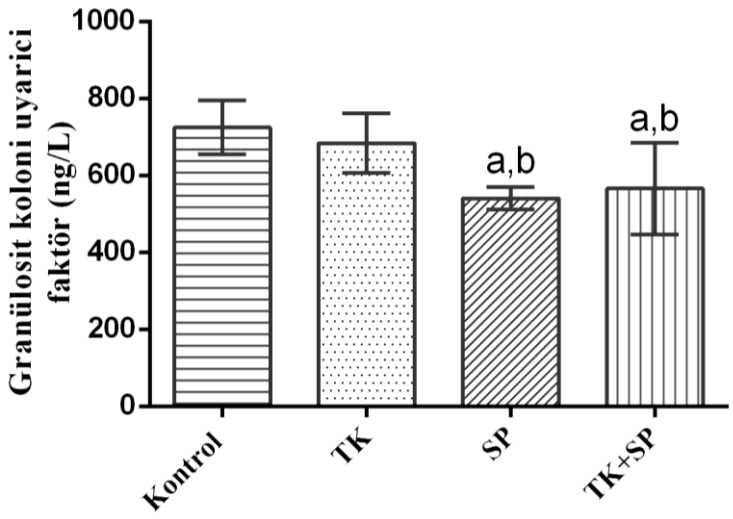
Şekil 4.16 *Grupların Eritropoietin Değerleri*

Serum TPO seviyesinde gruplar arasındaki değişimlere bakıldığında; SP grubunun değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü ($p<0.05$). TK+SP grubunda ise SP grubuna göre anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.17).



Şekil 4.17 *Grupların Trombopoietin Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, c: SP grubu ile fark var).*

Granülosit koloni uyarıcı faktör düzeyleri açısından SP ve TK+SP grubunda kontrol ve TK grubuna göre anlamlı derecede bir azalma olduğu görüldü. TK+SP grubunda SP grubuna kıyasla bir artış gözlense de bu artış anlamlı düzeyde değildi ($p<0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.18).



Şekil 4.18 *Grupların Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Değerleri (a: Kontrol grubu ile fark var, b: TK grubu ile fark var)*

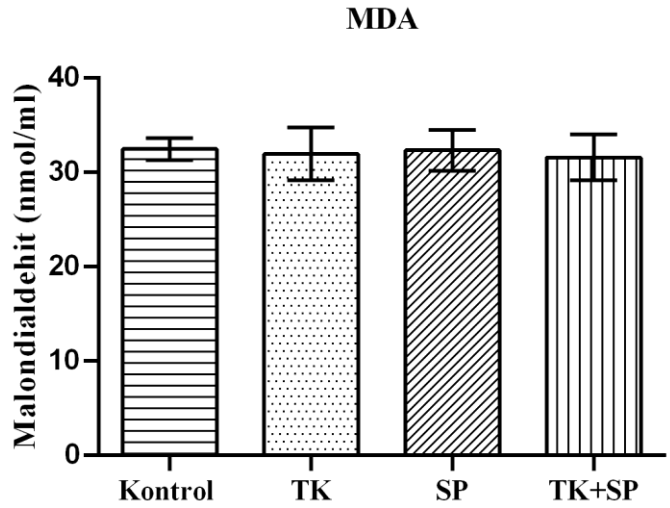
4.4. Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Bulgular

Uygulama sonrası grupların serum oksidatif stres parametrelerindeki değişimler Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4 *Grupların Serum Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Değerler (Ort±SD)*

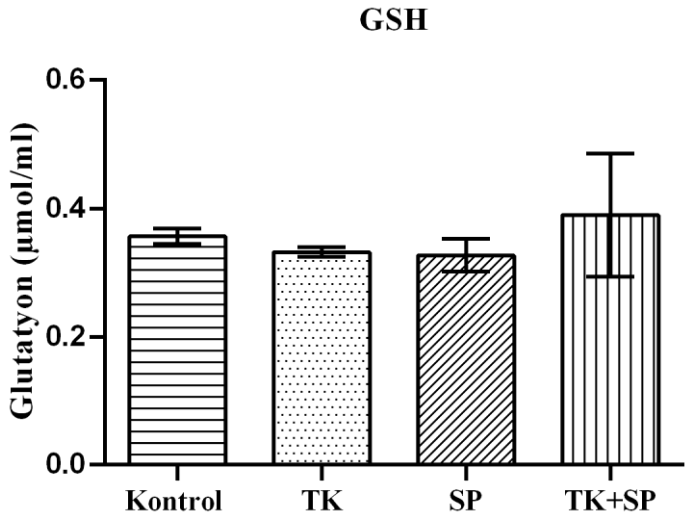
	Kontrol	**TK**	**SP**	**TK+SP**
MDA (nmol/ml)	32,48±1,172	31,94±2,813	32,36±2,168	31,59±2,409
GSH (µmol/ml)	0,356±0,011	0,330±0,007	0,327±0,025	0,389±0,096

Oksidatif stres parametrelerinden serum MDA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0.05$) (Tablo 4.4, Şekil 4.19).



Şekil 4.19 *Grupların serum MDA Değerleri*

Serumda GSH değerlerindeki değişimler incelendiğinde TK ve SP grubunda kontrole göre bir azalma gözlendi ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. TK+SP grubunda kontrol, TK ve SP gruplarına kıyasla bir artış gözlendi ancak bu anlamlı değildi ($p<0.05$) (Tablo 4.4, Şekil 4.20).



Şekil 4.20 *Grupların serum GSH Değerleri*

4.5. Histopatolojik Bulgular

4.5.1. Histopatolojik Skorlama

Femur Dokusuna Ait Histopatolojik Skorlama: Femur dokusuna ait histolojik preparatlarda stromal ve hematopoietik alan hasarı, megakaryosit ve adiposit yoğunluğu bulguları incelendi. Her parametre bağımsız kör bir şekilde alanında uzman histolog tarafından değerlendirildi. Yapılan değerlendirmelere ait istatistiksel sonuçlar Tablo 4.5'te gösterildi. Yapılan değerlendirmede siklofosfamid uygulanan grupta stromal ve hematopoietik alan hasarının artmış olduğu gözlendi. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ayrıca siklofosfamid grubunda adiposit yoğunluğunda da artış tespit edildi. Aynı şekilde bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 4.5 *Yarı Kantitatif Değerlendirme Sonucu Elde Edilen Femur Dokusunun Histopatolojik Skorlamasına Ait Veriler (Ort±SD)*

Histopatolojik Değişiklikler	Kontrol	TK	SP	TK +SP
Stromal alan hasarı	0,57±0,535	0,29±0,488	1,43±1,134	0,71±0,488
Hematopoietik alan hasarı	0,43±0,535	0,29±0.488	1,00±0,436	0,57±0,535
Adiposit yoğunluğu	0,29±0,488	0,43±0,535	1,86±1,069	0,86±0,690
Megakaryosit yoğunluğu	1,14±1,215	1,14±1,215	0,43±0535	0,57±0,535

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$)

Sternum Dokusuna Ait Histopatolojik Skorlama: Yapılan değerlendirmede siklofosfamid uygulanan grupta stromal ve hematopoietik alan hasarının artmış olduğu gözlendi. Stromal alandaki hasar artışında siklofosfamid grubu ile kontrol ve timokinon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilirken ($p<0.05$), hematopoietik alan hasarındaki artış gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ayrıca siklofosfamid grubunda adiposit yoğunluğunda da artış

tespit edildi. Aynı şekilde bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Değerlendirme sonucunda elde edilen skorlamaya ait istatistiksel veriler Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6 *Yarı Kantitatif Değerlendirme Sonucu Elde Edilen Sternum Dokusunun Histopatolojik Skorlamasına Ait Veriler (Ort±SD)*

Histopatolojik Değişiklikler	Kontrol	TK	SP	TK +SP
Stromal alan hasarı	0,71 ± 0,488	0,43 ± 0,535	1,71 ± 0,951*	1,00 ± 0,577
Hematopoietik alan hasarı	0,29 ± 0,488	0,57 ± 0,535	1,29 ± 1,113	0,86 ± 0,378
Adiposit yoğunluğu	0,43 ± 0,535	0,57 ± 0,535	1,86 ± 1,345	1,14 ± 0,690
Megakaryosit yoğunluğu	1,43 ± 1,134	1,57 ± 1,272	0,71 ± 0,488	0,71 ± 0,488

*Stromal alan hasarı açısından Siklofosfamid ile kontrol ve Timokinon grubu arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı ifade etmektedir ($p<0.05$). Diğer parametrelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$)

4.5.2. Femur, Epifiz ve Diyafiz Bölgesine Ait Örneklerin Histopatolojik Değerlendirmesi

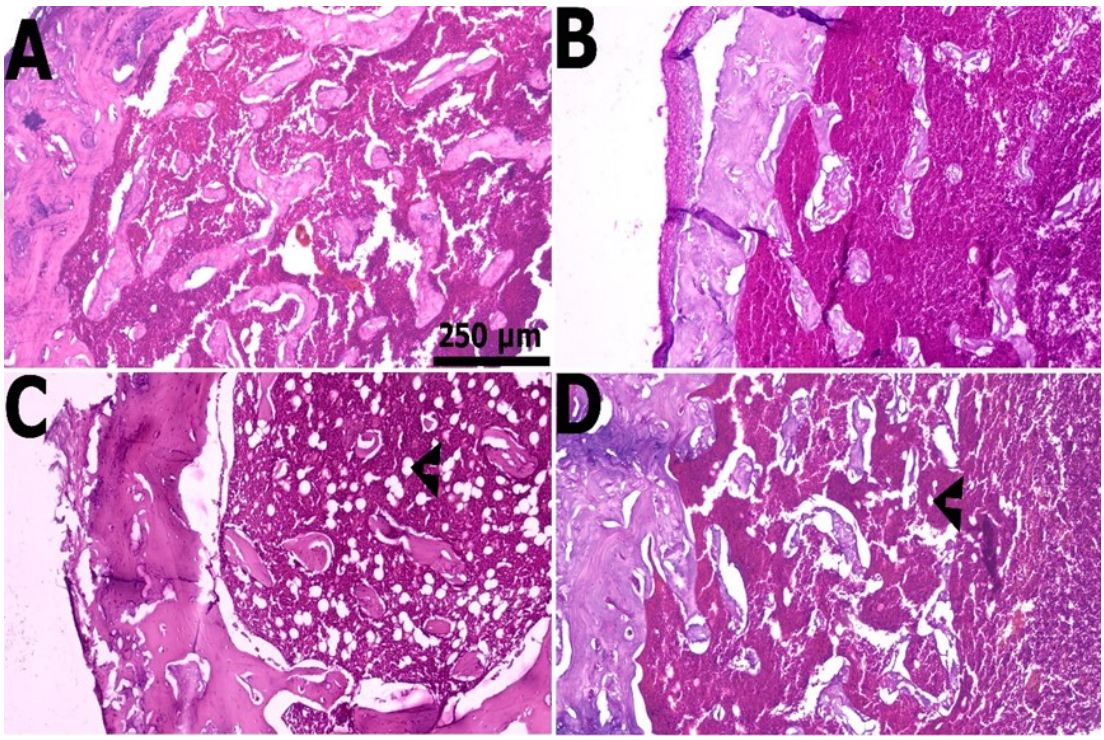
Kontrol grubundan alınan dokuların kesitleri incelendiğinde normal histolojik doku görüntüsü tespit edildi. Stromal elemanlar ile hematopoietik hücrelerin yoğun bir ağ oluşturdukları gözlendi. Olgunlaşmış miyeloid hücreler ve megakaryositler intertrabeküler boşluklarda mevcuttu. Kemik iliği bölgesinde hematopoietik hücre yoğunluğu adipositlere oranla çok fazlaydı (Şekil 4.21A, 4.22A ve 4.23A).

Timokinon uygulanan grupta kontrol grubuna benzer bir doku yapılanması hakimdi. Kemik iliği alanında stromal elemanlar ile hematopoietik hücrelerin yoğun bir şekilde düzenlendiği gözlendi. İntertrabeküler boşluklarda olgunlaşmış miyeloid hücreler ve megakaryositler mevcuttu. Adipositlerin yoğunluğu hematopoietik hücrelere oranla çok azdı (Şekil 4.21B, 4.22B ve 4.23B).

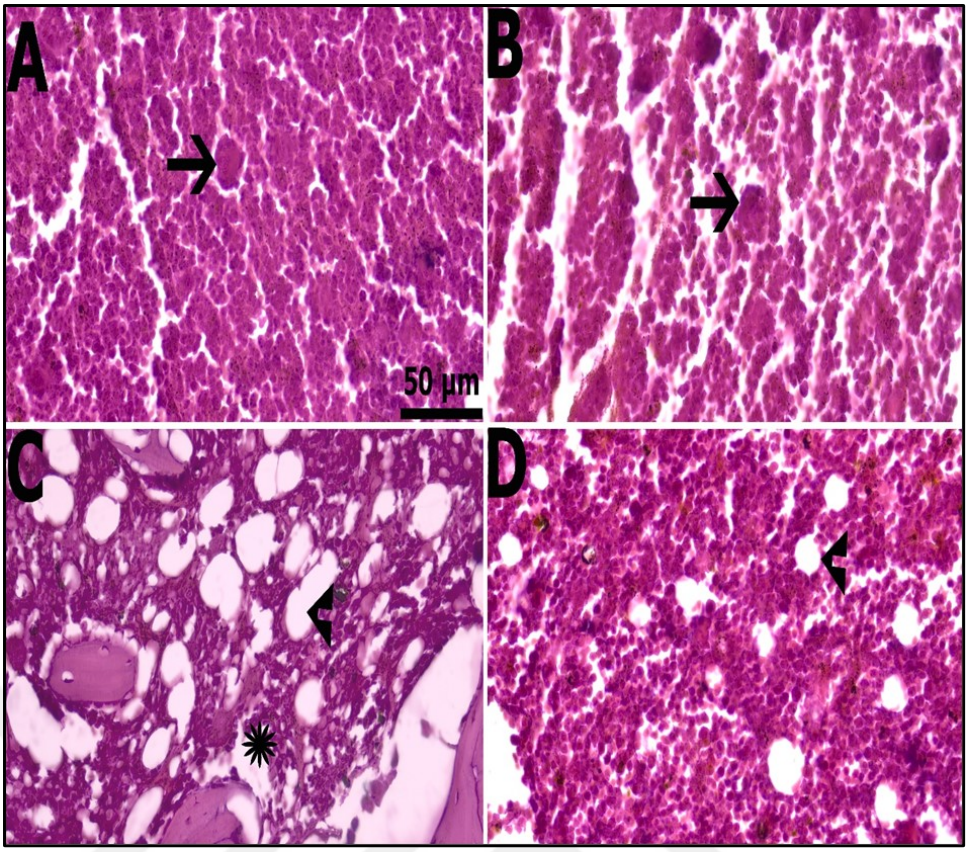
Siklofosfamid uygulanan grupta, kemik iliğinde düzensiz boş alanlar tespit edildi. Miyeloid ve eritroid dokuların bozulmasıyla birlikte, belirgin şekilde hiposelüler alanlar gözlendi. Ayrıca bu grupta megakaryositler saptanamadı; kontrol

grubuna göre yağ dokusunda hücresel dokudan daha fazla artış vardı (Şekil 4.21C, 4.22C ve 4.23C).

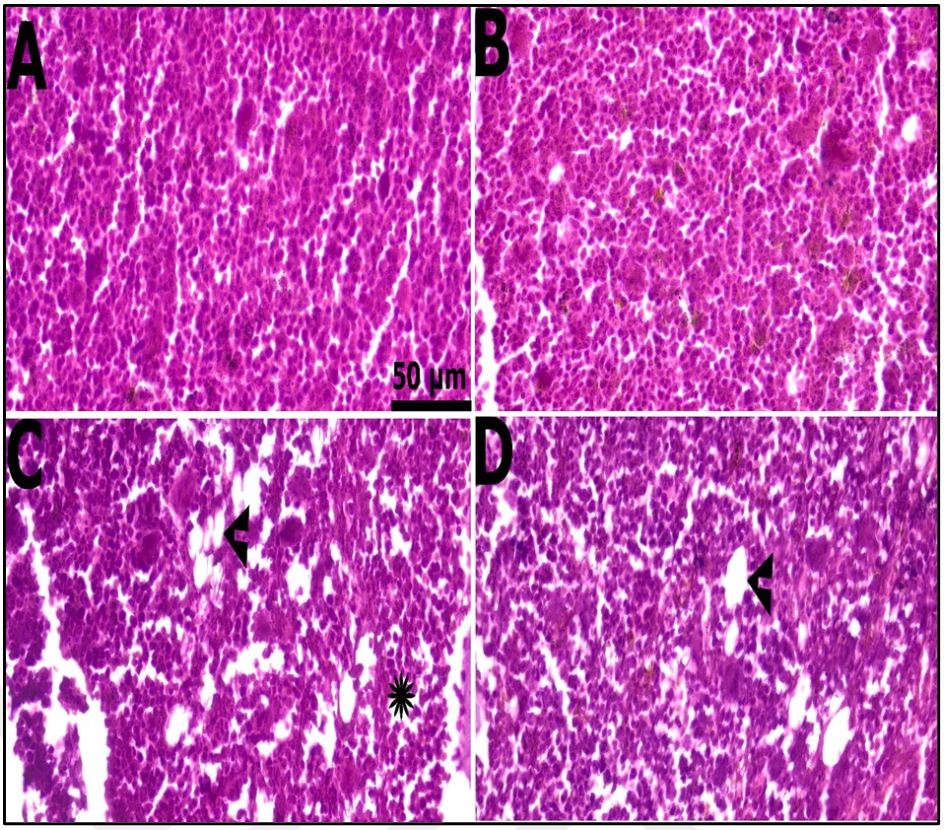
Siklofosfamid + Timokinon uygulanan grupta siklofosfamid grubuna göre dokunun sağlıklı yapısının korunduğu tespit edildi. Siklofosfamid grubuna göre dokudaki hasarın daha az oranda olduğu gözlendi (Şekil 4.21D, 4.22D ve 4.23D).



Şekil 4.21 *Sıçan Femur Epifiz Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri. Kontrol (A) ve TK grubunda (B) sağlıklı doku görünümü, SP grubunda (C) artan adiposit sayısı, TK+SP grubunda (D) genel olarak sağlıklı doku görünümünde korunma (X10 Objektif Büyütmesi, Hematoksilen & Eosin Boyama). Ok başı, Adiposit.*



Şekil 4.22 *Sıçan Femur Epifiz Bölgesine Ait Histopatolojik Görüntüler. Kontrol* ***(A)*** *ve TK grubunda* ***(B)*** *sağlıklı doku görünümü, SP grubunda* ***(C)*** *artan adiposit sayısı, TK+ SP grubunda* ***(D)*** *genel olarak sağlıklı doku görünümünde korunma (X40 Objektif Büyütmesi, Hematoksilen & Eosin Boyama). Siyah ok, Megakaryosit; Ok başı, Adiposit.*



Şekil 4.23 *Sıçan Femur Diyafiz Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri. Kontrol **(A)** ve TK grubunda **(B)** sağlıklı doku görünümü, SP grubunda **(C)** artan adiposit sayısı, TK+SP grubunda **(D)** genel olarak sağlıklı doku görünümünde korunma (X40 Objektif Büyütmesi, Hematoksilen & Eosin Boyama). Siyah yıldız, Hiposelüler alanlar; Ok başı, Adiposit.*

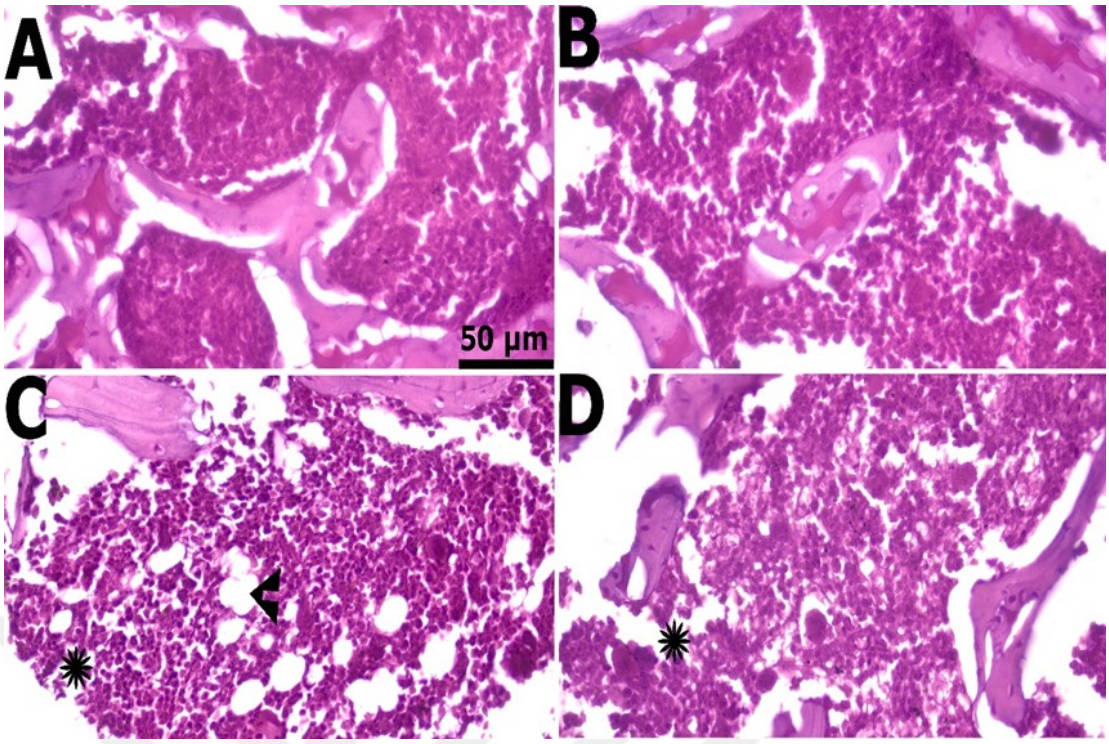
4.5.3. Sternum Örneklerinin Histopatolojik Değerlendirmesi

Kontrol grubundan alınan dokuların kesitleri incelendiğinde femur dokusu ile benzer normal histolojik doku görüntüsü izlendi. Stromal elemanlar ile hematopoietik hücrelerin yoğun bir ağ oluşturdukları tespit edildi. İntertrabeküler boşluklarda olgunlaşmış miyeloid hücreler ve megakaryositler mevcuttu. Kemik iliği bölgesinde hematopoietik hücre yoğunluğu adipositlere oranla çok fazlaydı (Şekil 4.24A).

Timokinon uygulanan grup ile kontrol grubu benzer bir doku yapılanmasına sahipti. Stromal elemanlar ile hematopoietik hücrelerin yoğun bir şekilde düzenlendiği kemik iliği alanı gözlendi. İntertrabeküler boşluklarda olgunlaşmış miyeloid hücreler ve megakaryositler mevcuttu. Adipositlerin yoğunluğu hematopoietik hücrelere oranla çok azdı (Şekil 4.24B).

Siklofosfamid uygulanan grupta, kemik iliğinde düzensiz boş alanlar gözlendi. Miyeloid ve eritroid doku düzenlenmesinin bozulmasından dolayı, belirgin şekilde hiposelüler alanlar gözlendi. Ayrıca bu grupta megakaryositler saptanamadı; kontrol grubuna göre yağ dokusunda hücresel dokudan daha fazla artış vardı (Şekil 4.24C).

Siklofosfamid + Timokinon uygulanan grupta siklofosfamid grubu ile kıyaslandığında dokunun sağlıklı yapısının korunduğu tespit edildi. Siklofosfamid uygulanan gruba göre dokudaki hasarın daha az oranda olduğu gözlendi (Şekil 4.24D).



Şekil 4.24 *Sıçan Sternum Bölgelerinin Enine Kesitlerinin Histopatolojik Görünümleri. Kontrol (**A**) ve TK grubunda (**B**) sağlıklı doku görünümü, SP grubunda (**C**) artan adiposit sayısı, TK+SP grubunda (**D**) genel olarak sağlıklı doku görünümünde korunma (X40 Objektif Büyütmesi, Hematoksilen & Eosin Boyama). Siyah yıldız, Hiposelüler alanlar; Ok başı, Adiposit.*

5. TARTIŞMA

Kanser günümüzde tüm dünyada ölüme sebep olan hastalıklar arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan kemoterapi rejimleri sağ kalım oranlarını artırmakla beraber hastalarda sağlıklı dokularda oluşan toksisiteden dolayı ciddi yan etkilere yol açmaktadır. Ortaya çıkan bu yan etkiler hem ilaçların doz kısıtlamasına, tedavi prosedürlerinin aksamasına sebep olmakta, hem de hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir.

Siklofosfamid antineoplastik tedavide kullanılan kemoterapötik bir ajandır. SP biyotransformasyonu sonucu iki metabolitine dönüşerek etkisini göstermektedir. Bunlardan biri olan fosforamid mustard SP'nin terapötik etkilerinden sorumluyken akrolein sitotoksik etki göstermektedir. (Emadi vd., 2009; Güneş, 2014; Perini vd., 2008). ACR hücrelerde serbest oksijen radikallerinin artmasına ve oksidatif strese sebep olmaktadır (Cengiz vd., 2018; Patra vd., 2012).

Siklofosfamide maruz kalma sonucunda hematoksisite ve miyelotoksisite meydana geldiğine dair kanıtlar giderek artmaktadır ve altta yatan mekanizmalar oksidatif strese atfedilmektedir (Ayhanci vd., 2008; Ayhanci vd., 2019; Feng vd., 2016). Birçok deneysel çalışmada kemoterapi ile miyelosupresyon modeli indüklenmiştir. Bu çalışmalarda SP'nin anemi, granülositopeni ve trombositopeniye sebep olduğu gösterilmiştir. (Akkaya vd., 2021; Ayhancı vd., 2019; Cengiz vd., 2020; Feng vd., 2016; Zhao vd., 2011). Miyelosupresyon sonucunda hastalarda immünosupresyon, sekonder ve fırsatçı enfeksiyonlar, hemorajik komplikasyonlar, erken yorulma, dispne, taşipne görülebilir (Friberg ve Karlsson, 2003).

Günümüzde kemoterapinin toksik yan etkilerinden sakınmak için destekleyici özellikte tedavilere yönelme olmuştur. Doğal içerikli antioksidan, immünomodülatör, antiinflamatuvar özelliklere sahip aynı zamanda toksik etkileri az olan ajanlara ilgi artmıştır.

Çörek otunun sabit ve uçucu yağlarının baskın bileşeni olan timokinon geleneksel tıpta kendine çokça yer bulmuş doğal bir bileşiktir. Sentetik ilaçlara oranla çok daha fazla antioksidan, immünomodülatör, antiinflamatuvar aktiviteye sahip

olduğu bilinmektedir (Ali ve Blunden, 2003; Darakhshan vd., 2015; Shaterzadeh–Yazdi vd., 2018; Umar vd., 2012).

Sitoprotektif ve antioksidan özelliği birçok çalışmayla ortaya konmuş olan timokinonun farklı hastalıklar üzerine olan etkisi birçok çalışmayla araştırılmıştır (Shoieb vd., 2003; Tavakkoli vd., 2017; Zafeer vd., 2012). Bu çalışmada TK'nın, klinikte yaygın olarak kullanılan SP'nin sebep olduğu miyelosupresyona karşı protektif etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Siklofosfamid kemoterapisi alan deneklerin vücut ağırlıklarının değerlendirildiği çalışmalara bakıldığında ağırlık artışıyla alakalı farklı sonuçlar olduğu görülmektedir. Peng vd. (2022), tarafından yapılan çalışmada haftalık 100mg/kg dozda SP uygulamasının beş hafta boyunca vücut ağırlığı ortalamasını istatistiksel olarak azalttığı gösterilmiştir. Buna karşılık antioksidan olarak asperulosit kullanılan grupların vücut ağırlığında bir iyileşme saptanmıştır. Bir başka çalışmada 200 mg/kg tek dozluk SP uygulamasından sonra sekizinci günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Bu çalışmada SP uygulanan grupların vücut ağırlığında anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir (Abd El Tawab vd., 2014). Bunların aksine başka bir çalışmada 50 mg/kg'lık tek doz SP uygulanan grupta vücut ağırlıklarının yükselerek diğer gruplarla uyumlu şekilde arttığı tespit edilmiştir (Ekeleme-Egedigwe vd., 2019).

Mevcut çalışmada hayvanların vücut ağırlıkları başlangıçtan itibaren haftalık olarak kaydedildi. Yapılan istatistiksel analizlerde SP ve TK+SP gruplarında vücut ağırlığının ilk üç haftada artış gösterdiği son iki haftada ise azaldığı ve son hafta yapılan ölçümde azalmanın kontrol ve TK gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Haftalık ölçümlerin hiçbirinde SP ve TK+SP grubunun değerleri arasında istatistiksel bir fark olmadığı saptandı. Literatürdeki farklı bulgulardan yola çıkarak SP uygulamasının vücut ağırlığı üzerindeki farklı etkilerinin SP'nin dozu ve uygulama sıklığı ile ilişkili olduğu söylenebilir. Farklı çalışmalarda meydana gelen farklı sistemik toksisite derecesine bağlı olarak yetersiz beslenme ve metabolik fonksiyonların bozulması yetersiz kalori alımı ya da kilo kaybına sebep olabilir. Öte yandan TK takviyesinin TK+SP gurubunda ağırlık kaybının önüne geçememesi ise TK uygulama dozu ve uygulama şekli ile ilgili olabilir.

Sıçanlarda SP uygulamasının kemik iliğini baskıladığı ve miyelosupresyona sebep olduğu ifade edilmektedir (Kuhn, 2002; Feng vd., 2016; Dilek, 2010; Emadi vd., 2009; Chu ve Sartorelli, 2018). SP ile hematoksisite oluşturulan bir çalışmada Peng vd. (2022), tarafından asperulositin antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada SP'nin oksidatif strese sebep olarak, proinflamatuvar sitokinlerin miktarını artırarak; RBC, Hb, Hct, WBC, Neu, Lym, Mono değerlerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca antioksidan olarak kullanılan asperulosidinin oksidatif stresi önleyip proinflamatuvar sitokinleri baskılayarak kan parametrelerini kontrol grubuna yaklaştırdığı görülmüştür. SP ile indüklenen başka bir miyelosupresyon çalışmasında periferik kanda Lym miktarının ve kemik iliği hücre sayısının önemli ölçüde deprese olduğu ortaya konulmuştur (Patra vd., 2012). Sıçanlarda SP'nin farklı dozlarda kullanıldığı bir çalışmada miyelotoksisite derecesinin doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı gruplara 50, 100 ve 150 mg/kg dozlarda SP uygulanmış ve sonrasındaki 3. günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Deneysel prosedürün toplam altı gün sürdüğü çalışmada seleno-l-metiyoninin koruyucu etkileri incelenmiştir. İlgili çalışmanın bulgularına bakıldığında lökosit, trombosit ve kemik iliği hücre sayısının her 3 doz SP uygulamasında da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde baskılandığı, artan doza bağlı olarak baskılanmanın da arttığı gösterilmiştir. Buna karşılık 0,4 ve 0,8 mg/kg seleno-l-metiyonin dozlarının etkileri karşılaştırılarak 0,4 mg/kg dozda seleno-l-metiyoninin hematoksisiteyi önlemede 0,8 mg/kg'a göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ayhanci vd., 2009).

Timokinonun hematoprotektif ve miyeloprotektif özelliklerinin incelendiği çalışmaların sonuçları TK'nın protektif niteliklerini göstermektedir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada diazinonla oluşturulan toksisite modelinde TK hematoksisiteyi ve immünotoksisiteyi önlemiştir. Bu çalışmada TK diazinonun azalttığı RBC, Hct, Hemoglobin, WBC, PLT, Lym düzeylerini önemli derecede yükseltmiştir (Danaei ve Karami., 2017). Hematoksisitenin kurşunla indüklendiği başka bir çalışmada azalan RBC, Hgb, Hct, lökosit ve PLT sayıları TK tedavisi alan grupta anlamlı derecede yükselmiştir (Mabrouk vd., 2021). Fenilhidrazin ile hemolitik anemi indüklenen bir çalışmada erkek sıçanlara 15 mg/kg dozda TK uygulaması yapılarak etkileri incelenmiştir. TK tedavisi ratların serumlarında GSH ve SOD seviyelerini yükseltmiştir. Hemolitik anemi oluşan sıçanların hematolojik analizlerin sonuçları TK

tedavisinin; RBC, HGB, HCT ve retikülosit sayılarını fenilhidrazin grubuna göre anlamlı şekilde yükselterek kontrol grubuna yaklaştırdığını ortaya koymuştur (Ashour, 2014).

Mevcut çalışmada yapılan hematolojik analizlerin sonuçlarına bakıldığında TK uygulaması yapılan grubun WBC, Neu, Lym, Mono, RBC, Hgb değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği bulundu. SP gurubunda bulunan hayvanların WBC, Nötrofil, Lym, Mono, Eos, RDW ve PLT değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı RBC miktarının etkilenmediği tespit edildi. SP+TK uygulamasının bu değerlerden Baso, RDW ve PLT'yi SP grubuna göre anlamlı derecede yükselterek kontrol grubuna yaklaştırdığı, WBC, Neu ve Lym değerlerini ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar artırdığı görüldü. Bu sonuç TK'nın, SP ile indüklenen granülositopeni ve trombositopeniyi tolere edici etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Siklofosfamidin hematopoietik sitokinler üzerindeki etkileri ile alakalı çelişkili bilgiler mevcuttur. *Panax notoginseng*'in SP nedenli miyelotoksisite üzerine koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada SP grubunda EPO, TPO ve GM–CSF seviyelerini kontrol grubuna göre yükselttiği görülmüştür (Liu vd., 2022). Swiss albino farelerde yapılan bir çalışmada SP ile kemik iliği ve hematolojik toksisite oluşturulmuş ve serum CFU–GM, CFU–E ve BFU–E (patlatma oluşturan birim eritrosit) düzeyleri ölçülmüştür. İlgili çalışmada SP uygulamasının oksidatif stresi MDA seviyelerini artırarak, SOD, CAT ve GSH gibi endojen antioksidanların miktarını ise azaltarak tetiklediği belirtilmiştir. Ayrıca SP uygulaması proinflamatuvar sitokinlerin (TNFα, IL-1ß, IL-6) miktarlarını artırdığı ve inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 miktarlarını ise azalttığı tespit edilmiştir. Artan oksidatif stres ve inflamasyonun serumda ve kemik iliği hücrelerinde hematopoietik sitokin değerlerini ciddi derecede azalttığı görülmüştür (Iqubal vd., 2020). Yine farklı bir çalışmada SP uygulaması sonucu plazma GM–CSF, EPO, TPO seviyelerinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığı bununla paralel olarak WBC, RBC ve PLT sayılarının azaldığı belirtilmiştir (Huang vd., 2020).

Atta vd. (2018), tarafından streptozotosin ile oluşturulmuş diyabet modelinde diyabete bağlı olarak azalan kardiyak EPO gen ekspresyon seviyesinin TK ile anlamlı derecede arttığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmada kardiyak dokudan yapılan

analizlerde diyabetle artan MDA değerinin TK takviyesi ile azaldığı, TK takviyesinin ayrıca E-selektin, CRP ve IL-6 gibi inflamatuar sitokinlerin seviyelerinin azaltarak kontrol grubuna yaklaştırdığı gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda oksidatif stresin artması neticesinde EPO'nun renal mRNA ekspresyonunun azaldığı, oral olarak verilen TK'nın diyabetik sıçanların EPO seviyelerini iyileştirdiği ortaya konulmuştur.

Mevcut çalışmada hematopoietik sitokin değerlerine bakıldığında hematolojik sonuçlarla uyumlu olarak EPO seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. SP grubunda anemi oluşmamasının sebebinin EPO değerinin değişmemesi ile ilgili olabileceği veya çalışma süresinin 28 gün ile sınırlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda TPO seviyesi SP grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede azalırken; TK+SP grubunda, SP grubuna göre anlamlı derecede yükseldi ve kontrol grubunun değerine yaklaştı. Bu sonuç TK'nın, SP'nin sebep olduğu trombositopeniyi, TK+SP grubunda TPO miktarını koruyarak önlediğini ifade ediyor olabilir.

Granülosit koloni uyarıcı faktör değeri SP grubunda kontrol ve TK grubuna göre anlamlı derecede azalmıştı. TK+SP grubunda da kontrol ve TK grubuna göre anlamlı bir azalma mevcutken, SP grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görüldü. Bu sonuçlar TK uygulamasının SP'nin sebep olduğu granülositozu kısmen de olsa iyileştirebileceğini ortaya koymaktadır.

Siklofosfamidin sebep olduğu hematoksisitede yer alan ana mekanizmalar reaktif oksijen türleri olup, hücrelerde lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Örneğin farelerde yapılan deneysel bir çalışmada siklofosfamid uygulamasının kan ve testis preparatlarında lipit peroksidasyonunu önemli derecede artırdığı buna karşılık melatonin tedavisinin SOD, CAT, GSH seviyelerini doz ilişkili olarak artırdığı gözlenmiştir (Chabra vd., 2014). Güneş vd. (2014) tarafından sıçanlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada tek doz SP uygulamasının sıçanlarda MDA seviyesini kontrole kıyasla anlamlı derecede yükselttiği ve GSH seviyesini ise kontrole kıyasla anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada antioksidan olarak kullanılan Selenyumun ise MDA seviyelerini SP grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı GSH seviyesini SP grubuna göre anlamlı derecede artırdığı gözlenmiştir. Oksidatif stres

parametrelerindeki bu değişimler periferik kan lökosit ve trombosit sayılarını önemli derecede değiştirmiştir.

Birçok deneysel ve klinik çalışmalarda oksidatif stres ve sitotoksisiteyle ilişkili hastalık modelinde TK'nın düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Alenzi vd. (2010), tarafından yapılan deneysel bir çalışmada farklı gruplara siklofosfamid kemoterapisi uygulanmış ve ayrı ayrı NS ile TK tedavileri yapılmıştır. SP uygulanan grubun MDA miktarı önemli derecede artmış ayrıca CAT ve GSH miktarı önemli derecede azalmıştır. SP uygulamasından önce ve sonra uygulanan NS ve TK tedavileri antioksidan enzimlerin seviyesini düzelterek lipit peroksidasyonunun önüne geçmiştir. Bu çalışmada NS'nin Hb seviyesini, ağırlık artışını, üre, kreatinin, bilirubin seviyelerini ve TK'nın kan şekeri ve trigliserit seviyelerini daha iyi tolere ettiği görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları SP kemoterapisinden önce NS veya TK uygulamasının antioksidan mekanizmaların indüksiyonu aracılığıyla toksisitenin önüne geçebileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada SP kemoterapisinin kalp dokularında tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinde ve toplam nitrat/nitritte anlamlı bir artışa ve indirgenmiş glutatyon, glutatyon peroksidaz, adenozin trifosfat ve katalaz seviyelerinde anlamlı bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada uygulanan TK'nın biyokimyasal değişikleri kontrol grubundaki değerlere yaklaştırdığı ortaya konulmuştur (Nagi vd., 2011). Asetaminofenle indüklenen karaciğer hasarının önlenmeye çalışıldığı bir çalışmada ise TK tedavisinin antioksidan aktiviteyi geliştirdiği ve lipit peroksidasyonu ile ROS oluşumunu zayıflattığı ortaya konulmuştur (Adam vd., 2016).

Mevcut çalışmada oksidatif stres parametrelerine bakıldığında literatürdekinin aksine SP uygulamasının MDA değerlerini anlamlı şekilde yükseltmediği görüldü. GSH seviyesi ise SP grubunda kontrole kıyasla bir miktar düşüş gösterdi fakat bu literatürdekinin aksine istatiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Bu farklılığın sebebinin SP dozunun düşüklüğünden ya da son SP uygulamasının sakrifikasyondan yedi gün önce yapılması ile arada geçen sürede kemoterapinin yan etkilerinin vücut tarafından belli bir düzeyde tolere edilmesinden kaynaklanabilir.

Siklofosfamidin oluşturduğu miyelotoksisite histopatolojik olarak incelendiğinde; kemik iliğindeki hücre sayısının azaldığı ve yağ hücresi miktarının arttığı görülmüştür. Iqubal vd. (2020), tarafından yapılan bir çalışmada SP

miyelotoksisitesine karşı nerolidolün koruyucu etkinliği araştırılmıştır. SP uygulanan hayvanların hemotoksilen eozin ile boyanan femur dokularında, kemik iliği hücrelerinde önemli bir azalma ve trabeküler kemik yapısında belirgin bir tahribat yaptığı, buna karşılık nerolidolün kemik ve kemik iliğini koruduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada SP'nin sebep olduğu trombositopeni, hematoksilen eozin ile boyanan histolojik preparatlarda megakaryosit sayısındaki azalma ile ortaya konulmuştur. Kemik iliğinde şiddetli hemorajik alanlar ile hematopoietik hücre sayısının azaldığı ve SP grubundaki hayvanların kemik iliği adipositesinde ciddi oranda arttığı belirlenmiştir. Çalışmada arı sütü takviyesinin SP tarafından indüklenen kemik iliği toksisitesini megakaryosit sayısını, hücre yapısını ve sayısını koruyarak engellediği gösterilmiştir (Khazaei vd., 2020).

Mevcut çalışmada femur ve sternumdan alınan kesitlerde H&E ile boyanan preparatlarda SP grubunda literatürle uyumlu olarak miyeloid ve eritroid dokuların bozulduğu, hiposelüler alanlar mevcuttu. Bu grupta megakaryositler görülemedi ve yağ dokunun yoğunluğunun önemli derecede arttığı görüldü. Buna karşılık TK+SP grubunda sağlıklı doku görüntüsünün korunduğu, adipositenin SP grubuna göre önemli oranda daha az olduğu görüldü. Ayrıca bu grubun preparatlarında megakaryositlere de rastlanıldı. SP grubunda baskılanan TPO miktarının TK+SP grubunda korunmuş olması kemik iliğindeki megakaryositlerin varlığına açıklık getirmektedir. Bu bulgular SP kemoterapisinin yan etiklerini önlemek için antioksidan kullanan çalışmalarla (Iqubal vd., 2020; Khazaei vd., 2020) uyumludur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı SP kemoterapisinin sebep olduğu oksidatif stres ve miyelosupresyon üzerine TK'nın koruyucu etkilerini araştırmaktı. Elde ettiğimiz verilere göre aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Siklofosfamid uygulaması mevcut metabolik durumun bozulması, çoklu organ toksikasyonu ve gıda alımının bozulması sebebiyle canlı ağırlık artışına olumsuz etki etmektedir. Timokinon takviyesi canlı ağırlık kazancı konusunda SP'nin etkilerini tolere edebilir.
- Siklofosfamid uygulaması kan parametrelerinden WBC, Neu, Eos, Baso, Mono, Lym, RDW, PLT değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde baskılayarak hematolojik toksisiteye sebep oldu. TK takviyesi ise bu değerlerden Baso, RDW ve PLT değerlerini anlamlı şekilde yükselterek SP'nin sebep olduğu hematolojik toksisiteyi kısmen önledi.
- Siklofosfamid kullanımı ve TK takviyesi serum EPO düzeylerini etkilemedi.
- Siklofosfamid kullanımı sıçanların serum TPO seviyelerini azaltarak PLT değerlerinin düşmesine sebep oldu. Oral TK takviyesi siklofosfamidin sebep olduğu TPO seviyelerindeki baskılanmayı engelleyerek trombositopeniden korunmada önemli bir etkiye sahiptir.
- Siklofosfamid tedavisi sıçanların serum G–CSF değerini anlamlı şekilde azaltarak granülositopeniye sebep oldu. TK takviyesi siklofosfamidin sebep olduğu bu etkiyi baskılayarak G-CSF değerlerini normale yaklaştırdı ve böylece granülositopeni gelişimine karşı kısmen de olsa koruyucu etki gösterdi.
- Siklofosfamid kemik iliğinde toksisiteye sebep olarak kemik iliğine ait histopatolojik kesitlerde kemik iliği hücrelerinin sayısını baskıladı ve yağ hücre miktarını artırdı. TK takviyesi, kemik iliğinin hücresel yapısını siklofosfamid toksisitesine karşı histopatolojik olarak korudu.

Bu çalışmada kemoterapi ile indüklenen miyelosupresyonun antioksidan takviyeler kullanılarak önlenebileceğine dair ortaya konulan çalışmalarla paralel sonuçlar elde edilmiştir. Ancak uygulanan siklofosfamid dozunun hem tek seferde verilmemesi hem de son doz uygulamasından bir hafta sonra kan ve doku örneklerinin alınması ve ayrıca çalışmanın 28 günde sonlandırılması gibi faktörler sebebiyle siklofosfamidin özellikle eritropoez üzerindeki etkileri tam olarak gözlemlenememiş ve timokinonun da bu alandaki koruyucu etkinliği tam olarak ortaya konulamamıştır. Ayrıca hem doku düzeyinde hem de serumda oksidan/antioksidan sisteme ait farklı parametelerin incelenememiş olması da çalışmanın sonuçlarını değerlendirmede bir diğer kısıtlılığa sebep olmuştur. Sonuç olarak TK'nın miyelosupresyon üzerine çeşitli mekanizmalarla bir müdahalesi vardır. Özellikle hematopoietik sitokin seviyeleri üzerine etkisi dikkat çekicidir. Bununla birlikte, koruyucu etkilerin mekanizmalarının aydınlatılması için daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

7. KAYNAKLAR

Abdelaziz, T. E., Borai, E.–B. N., Kamal, K. H., & Hanem, E.G. (2019). Contribution of garlic for improving the cytoprotective effect of mesna against cyclophosphamide toxicity in rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 7(3). https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.7.3.0089

Abd El Tawab, A. M., Shahin, N. N., & AbdelMohsen, M. M. (2014). Protective effect of Satureja montana extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 196–205. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.11.001

Adam, G. O., Rahman, M. M., Lee, S. J., Kim, G. B., Kang, H. S., Kim, J. S., & Kim, S. J. (2016). Hepatoprotective effects of Nigella sativa seed extract against acetaminophen-induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(3), 221–227. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.039

Aiello, F. B., Keller, J. R., Klarmann, K. D., Dranoff, G., Mazzucchelli, R., & Durum, S. K. (2007). IL-7 induces myelopoiesis and erythropoiesis. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 178(3), 1553–1563. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1553

Akkaya, K., Yildirim, M., Değirmenci, U., & Ünal, N. D. (2021). Sıçanlarda akrilonitril ile oluşturulmuş oksidatif strese karşi timokinon ve kurkuminin olasi koruyucu etkileri. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 11(3), 596–604. https://doi.org/10.31020/mutftd.983740

Aktaş, İ., & Mehmet Gür, F. (2022). Hepato-protective effects of thymoquinone and beta-aminoisobutyric acid in streptozocin induced diabetic rats. *Biotechnic & Histochemistry : Official Publication of The Biological Stain Commission*, 97(1), 67–76. https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1949041

Al–Ali, A., Alkhawajah, A. A., Randhawa, M. A., & Shaikh, N. A. (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20(2), 25–27.

Alenzi, F., El–Bolkiny, Y. E.–S., & Salem, M. (2010). Protective effects of Nigella sativa oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide. *British Journal of Biomedical Science*, 67(1), 20–28. https://doi.org/10.1080/09674845.2010.11730285

Ali, B. H., & Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. *Phytotherapy Research: PTR*, 17(4), 299–305. https://doi.org/10.1002/ptr.1309

Amjad, M. T., Chidharla, A., & Kasi, A. (2023). *Cancer Chemotherapy*. In StatPearls. StatPearls Publishing.).

Arjumand, S., Shahzad, M., Shabbir, A., & Yousaf, M. Z. (2019). Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF-α, IL-1, and NFκB expression levels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 958–963. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.006

Ashour, T. H. (2014). Hematinic and anti-anemic effect of thymoquinone against phenylhydrazine-induced hemolytic anemia in rats. *Research Journal of Medical Sciences*, 8(2), 67-72

Ashour, T. H. (2015). Thymoquinone therapy improves hyperglycemia, erythrocyte indices, erythropoietin production and erythrocyte osmotic resistance in rat

model of streptozotocin–induced diabetes. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 5(3), 350–361

Atta, M. S., El-Far, A. H., Farrag, F. A., Abdel-Daim, M. M., Al Jaouni, S. K., & Mousa, S. A. (2018). Thymoquinone Attenuates Cardiomyopathy in Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 7845681. https://doi.org/10.1155/2018/7845681

Ayhanci, A., Heybeli, N., Sahin, İ. K., & Cengiz, M. (2019). Myelosuppression and oxidative stress induced by cyclophosphamide in rats: The protective role of selenium. *Adıyaman University Journal of Science*, 9(2), 252–265. https://doi.org/10.37094/adyujsci.617016

Ayhanci, 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(1), 186–193. https://doi.org/10.1007/s12011-008-8189-5

Ayhanci, A., Yaman, S., Appak, S., & Gunes, S. (2009). Hematoprotective effect of seleno-L-methionine on cyclophosphamide toxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(4), 424–428. https://doi.org/10.1080/01480540903130682

Badary, O. A., Taha, R. A., Gamal el-Din, A. M., & Abdel-Wahab, M. H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*, 26(2), 87–98. https://doi.org/10.1081/dct-120020404

Bahar, A. , Ovayolu, Ö. & Ovayolu, N. (2019). Onkoloji Hastalarinda Sık Karşılaşılan Semptomlar Ve Hemşirelik Yönetimi . *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 42–58. https://dergipark.org.tr/en/pub/erusaglik/issue/47133/593190

Balarajan, Y., Ramakrishnan, U., Özaltin, E., Shankar, A. H., & Subramanian, S. (2011). Anaemia in low–income and middle–income countries. *The Lancet*, 378(9809), 2123–2135. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62304-5

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşimlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154–165.

Bekheet, S. H. (2010). Morphine sulfate-induced histopathological and histochemical changes in the rat liver. *Tissue and Cell*, 42(4), 266-272.

Boudreaux, M. K. & Christopherson, P. W. (2022). Thrombopoiesis. *In: Schalm's veterinary hematology* (7 th ed., pp. 651-657). Wiley Blackwell. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=6VJhEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA16&dq=Boudreaux+MK,+Christopherson+PW.+Thrombopoiesis.+Schalm%27s+veterinary+hematology.+2022:649-57.&ots=z3V3YOuYjK&sig=01wkpFWHa2r2hOISKceSm37896o&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Canu, G., & Ruhrberg, C. (2021). First blood: the endothelial origins of hematopoietic progenitors. *Angiogenesis*, 24(2), 199–211. https://doi.org/10.1007/s10456-021-09783-9

Cecarini, V., Quassinti, L., Di Blasio, A., Bonfili, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M., & Eleuteri, A. M. (2010). Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. *The FEBS journal*, 277(9), 2128–2141. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07629.x

Cengiz, M., Ayhanci, A., & Kutlu, H. M. (2020). Investigation into the protective effects of escin on blood cells and cyclophosphamide–induced bone marrow toxicity in rats. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 730–738. https://doi.org/10.35193/bseufbd.677193

Cengiz, M., Yeşildağ, Ö., & Ayhanci, A. (2018). Siklofosfamid Nedenli Hematoksisite Üzerine Karvakrolün Sitoprotektif Etkileri. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 5(2), 125–130. https://doi.org/10.19159/tutad.378717

Chabra, A., Shokrzadeh, M., Naghshvar, F., Salehi, F., & Ahmadi, A. (2014). Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Human & Experimental Toxicology*, 33(2), 185–195. https://doi.org/10.1177/0960327113489052

Christopher, M. J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J. R., & Link, D. C. (2011). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(2), 251–260. https://doi.org/10.1084/jem.20101700

Chu, E., & Sartorelli, A. C. (2018). Cancer chemotherapy. *Lange's Basic and Clinical Pharmacology*, 948-976.

Çam, S. A. (2019). Deneysel Alzheimer Hastalik Modeli Oluşturulan Siçanlarda Nigella sativa L. Ve Timokinon'un Etkileri [Doktora tezi]. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/

Çetik, S. (2014). Sıçanlarda siklofosfamid nedenli kardiyotoksisitede oksidatif stres ve kalp hasarına karşı karvakrolün koruyucu etkisi [Doktor tezi]. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi

Çömlekçi, N. (2019). Onkoloji hemşireliği: Trombositopeni ve kanama. http://hdl.handle.net/11772/2913

Dalva, K. (2018.Nisan,05–07). Hematopoez [Sözlü sunum] Türk Klinik Biyokimya Sempozyumu, Denizli, TÜRKİYE

Danaei, G. H., & Karami, M. (2017). Protective effect of thymoquinone against diazinon-induced hematotoxicity, genotoxicity and immunotoxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 55, 217–222.

Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H., & Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*, 95, 138–158. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.011

Dhesi, S., Chu, M. P., Blevins, G., Paterson, I., Larratt, L., Oudit, G. Y., & Kim, D. H. (2013). Cyclophosphamide-Induced Cardiomyopathy: A Case Report, Review, and Recommendations for Management. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*, 1(1), 2324709613480346. https://doi.org/10.1177/2324709613480346

Dilek, İ. (2010.Kasım,3-7). Kemoterapide toksisite değerlendirmesi. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Ekeleme-Egedigwe, C. A., Famurewa, A. C., David, E. E., Eleazu, C. O., & Egedigwe, U. O. (2019). Antioxidant potential of garlic oil supplementation prevents cyclophosphamide-induced oxidative testicular damage and endocrine depletion in rats. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 18, 100109.

Ekinci, Ö. & Demir, C. (2020). Hematopoez. In: Birinci Basamakta ve Aile Hekimliginde Güncel Tanı-Tedavi (1181-1183). Nobel Tıp Kitabevleri. https://www.researchgate.net/publication/340503066_Hematopoez

El Gazzar, M., El Mezayen, R., Nicolls, M. R., Marecki, J. C., & Dreskin, S. C. (2006). Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects*, 1760(7), 1088–1095. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.006

El Mezayen, R., El Gazzar, M., Nicolls, M. R., Marecki, J. C., Dreskin, S. C., & Nomiyama, H. (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunology Letters*, 106(1), 72–81. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.04.012

El–Ghany, A., Ragwa, M., Sharaf, N. M., Kassem, L. A., Mahran, L. G., & Heikal, O. A. (2009). Thymoquinone triggers anti–apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 3(6), 296–306.

Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638–647. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146

Epstein, R. S., Aapro, M. S., Basu Roy, U. K., Salimi, T., Krenitsky, J., Leone-Perkins, M. L., Girman, C., Schlusser, C., & Crawford, J. (2020). Patient burden and real-world management of chemotherapy-induced myelosuppression: results from an online survey of patients with solid tumors. *Advances in Therapy*, 37(8), 3606-3618.)

Eren, S. H. (2015). Sıçanlarda timokinon takviyesinin tükenme egzersizine bağli oluşan oksidatif stres ve antioksidan durum üzerine etkileri [Doktora tezi]. Selçuk Üniversitesi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/

Feng, L., Huang, Q., Huang, Z., Li, H., Qi, X., Wang, Y., Liu, Z., Liu, X., & Lu, L. (2016). Optimized Animal Model of Cyclophosphamide-induced Bone Marrow Suppression. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(5), 428–435. https://doi.org/10.1111/bcpt.12600

Friberg, L. E., & Karlsson, M. O. (2003). Mechanistic models for myelosuppression. *Investigational New Drugs*, 21(2), 183–187. https://doi.org/10.1023/a:1023573429626

Gali–Muhtasib, H., Diab–Assaf, M., Boltze, C., Al–Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., & Schneider–Stock, R. (2004). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53–dependent mechanism. *International Journal of Oncology*, 25(4), 857–866.

Ghanim, W. K. (2020). Evaluating the effects of different doses of vitamin B2 and single dose of vitamin B12 against myelosuppression induced by cyclophosphamide in experimental rats. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 134–142. https://doi.org/10.31351/vol29iss1pp134-142

Gunsilius, E., Gastl, G., & Petzer, A. (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55(4), 186–194. https://doi.org/10.1016/s0753-3322(01)00051-8

Güneş, S. (2014). Siklofosfamid nedenli doku hasarı ve oksidatif stres üzerine selenyumun etkisi [Yüksek lisans tezi]. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/

Gürsoy, İ., Türkkan, E., & Dağ, H. (2021). Evaluation of anemia frequency and etiologies in hospitalized patients in a tertiary pediatrics clinic. *Medical Science and Discovery*, 8(12), 696–702. https://doi.org/10.36472/msd.v8i12.631

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Jafarabadi, H. (2004). Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives,* 18(3), 195–199. https://doi.org/10.1002/ptr.1390

Hitchcock, I. S., & Kaushansky, K. (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *British Journal of Haematology*, 165(2), 259–268. https://doi.org/10.1111/bjh.12772

Huang, Q., Feng, L., Li, H., Zheng, L., Qi, X., Wang, Y., Feng, Q., Liu, Z., Liu, X., & Lu, L. (2020). Jian–Pi–Bu–Xue–Formula alleviates cyclophosphamide–induced myelosuppression via up–regulating NRF2/HO1/NQO1 signaling. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1302–1306. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01302

Ingley, E., Tilbrook, P. A., & Klinken, S. P. (2004). New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life*, 56(4), 177–184. https://doi.org/10.1080/15216540410001703956

Iqubal, A., Syed, M. A., Haque, M. M., Najmi, A. K., Ali, J., & Haque, S. E. (2020). Effect of nerolidol on cyclophosphamide–induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice. *Experimental Hematology*, 82, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.01.007

Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development* (Cambridge, England), 140(12), 2463–2467. https://doi.org/10.1242/dev.083147

Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589(6), 1251–1258. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. https://doi.org/10.3322/caac.20107

Kaçar, S. (2020). Akrilamitin C6 Siçan Glioma Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisine Karşı Timokinon ve Kuersetinin Etkilerinin Araştırılması [Doktora tezi] Eskişehir Osmangazi Üniversitesi. https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/399778

Kaushansky K. (2003). Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 1(7), 1587–1592. https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00273.x

Kaushansky, K. (2008). Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Blood, *The Journal of the American Society of Hematology*, 111(3), 981–986. https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00273.

Khazaei, F., Ghanbari, E., & Khazaei, M. (2020). Protective effect of royal jelly against cyclophosphamide–induced thrombocytopenia and spleen and bone marrow damages in rats. *Cell Journal (Yakhteh)*, 22(3), 302. https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6703

Kuhn, J. G. (2002). Chemotherapy–associated hematopoietic toxicity. American *Journal of Health–System Pharmacy*, 59(4), 4–7. https://doi.org/10.1093/ajhp/59.suppl_4.S4

Kumar, A., D'Souza, S. S., & Thakur, A. S. (2019). Understanding the journey of human hematopoietic stem cell development. *Stem Cells International*, 2019. https://doi.org/10.1155/2019/2141475

Kumar, C., Jain, G., & Chopra, A. (2020). Garland of erythroblasts around a macrophage: erythroblastic ısland. *Turkish Journal of Hematology*, 37(2), 123–124. https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0398

Liu, Y., Li, S., Pu, M., Qin, H., Wang, H., Zhao, Y., & Chen, T. (2022). Structural Characterization of Polysaccharides Isolated from Panax notoginseng Medicinal Residue and Its Protective Effect on Myelosuppression Induced by

Cyclophosphamide. *Chemistry & Biodiversity*, 19(1), e202100681. https://doi.org/10.1002/cbdv.202100681

Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 28(1), 36–39. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000621

Ma, A., Koka, R., & Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL–2, IL–15, and IL–7 in lymphoid homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 24, 657–679. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727

Mabrouk, A. (2021). Thymoquinone improves lead-induced hematotoxicity in rats. *Pakistan Journal of Zoology*, 54, 1–9. https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20191209171226

Mahgoub, A. A. (2003). Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology Letters*, 143(2), 133–143. https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00173-5

May, M., Slaughter, A., & Lucas, D. (2018). Dynamic regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow niches. *Current Stem Cell Reports*, 4(3), 201–208. https://doi.org/10.1007/s40778-018-0132-x

Mehta, H. M., Malandra, M., & Corey, S. J. (2015). G–csf and Gm–csf in neutropenia. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1341–1349. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500861

Mercan, T. (2021). Doksorubisin İle Kalp Yetmezliği Oluşturulan Siçanlarda Timokinonun Kardiyoprotektif Etkilerinin Araştirilmasi [Doktora Tezi]. Akdeniz Üniversitesi. http://acikerisim.akdeniz.edu.tr/handle/123456789/6616

Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(2), 485–491. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079681

Nagi, M. N., & Mansour, M. A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin–induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*, 41(3), 283–289. https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0585

Nagi, M. N., Al-Shabanah, O. A., Hafez, M. M., & Sayed-Ahmed, M. M. (2011). Thymoquinone supplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(3), 135–142. https://doi.org/10.1002/jbt.20369

Nandini, C., Madhunapantula, S. V., Bovilla, V. R., Ali, M., Mruthunjaya, K., Santhepete, M. N., & Jayashree, K. (2021). Platelet enhancement by Carica papaya L. leaf fractions in cyclophosphamide-induced thrombocytopenic rats is due to elevated expression of CD110 receptor on megakaryocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 275–285, 114074. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114074

Noguchi, C. T., Asavaritikrai, P., Teng, R., & Jia, Y. (2007). Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64(2), 159–171. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.03.001

Ogino, M. H., & Tadi, P. (2023). Cyclophosphamide. In StatPearls. StatPearls Publishing

Onkoloji Hemşireliği Derneği (OHD). (2009). Antineoplastik İlaçlarin Güvenli Kullanim Standartlari Rehberi. https://onkohem.org.tr/antineoplastik-ilaclarin-guvenli-kullanim-standartlari

Özgüven, A. A. (2010). Kemoterapi uygulanan ratlarda glutamin ve/veya granülosit koloni stimülan faktör uygulamalarının miyelosupresyon ve ratların ağırlıkları üzerindeki etkilerinin araştırılması [Tıpta uzmanlık tezi] Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. http://hdl.handle.net/20.500.12397/13137

Panopoulos, A. D., & Watowich, S. S. (2008). Granulocyte colony–stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine*, 42(3), 277–288. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.03.002

Parente, J. (2019). Diagnostics for White Blood Cell Abnormalities: Leukocytosis and Leukopenia. *Physician Assistant Clinics*, 4(3), 625–635. https://doi.org/10.1016/j.cpha.2019.02.010

Patra, K., Bose, S., Sarkar, S., Rakshit, J., Jana, S., Mukherjee, A., Roy, A., Mandal, D. P., & Bhattacharjee, S. (2012). Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chemico–Biological Interactions*, 195(3), 231–239. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.001

Peng, X., Zhang, X., Wang, C., & Olatunji, O. J. (2022). Protective effects of asperuloside against cyclophosphamide–induced urotoxicity and hematotoxicity in rats. *Open Chemistry*, 20(1), 1444–1450. https://doi.org/10.1515/chem-2022-0234

Perini, P., Calabrese, M., Rinaldi, L., & Gallo, P. (2008). Cyclophosphamide–based combination therapies for autoimmunity. *Neurological Sciences*, 29(2), 233–234. https://doi.org/10.1007/s10072-008-0947-9

Ponticelli, C., Escoli, R., & Moroni, G. (2018). Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases?. *Autoimmunity Reviews*, 17(10), 1022–1027. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.04.007

Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961

Randhawa, M. A., & Alghamdi, M. S. (2011). Anticancer activity of Nigella sativa (black seed)—a review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39(06), 1075–1091. https://doi.org/10.1142/S0192415X1100941X

Rieger, M. A., & Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a008250. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250

Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, 26(47), 6715–6723. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210756

Roepke, M., Diestel, A., Bajbouj, K., Walluscheck, D., Schonfeld, P., Roessner, A., Schneider–Stock, R., & Gali–Muhtasib, H. (2007). Lack of p53 augments thymoquinone–induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biology & Therapy*, 6(2), 160–169. https://doi.org/10.4161/cbt.6.2.3575

Sethi, G., Ahn, K. S., & Aggarwal, B. B. (2008). Targeting nuclear factor–κB activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 6(6), 1059–1070. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2088

Sharda, S. V., Gulati, S., Tripathi, G., Jafar, T., Kumar, A., Sharma, R. K., & Agrawal, S. (2008). Do glutathione–S–transferase polymorphisms influence response to intravenous cyclophosphamide therapy in idiopathic nephrotic syndrome? *Pediatric Nephrology*, 23(11), 2001–2006. https://doi.org/10.1007/s00467-008-0883-1

Shaterzadeh–Yazdi, H., Noorbakhsh, M.–F., Hayati, F., Samarghandian, S., & Farkhondeh, T. (2018). Immunomodulatory and anti–inflammatory effects of thymoquinone. *Cardiovascular & Haematological Disorders–Drug Targets (Formerly Current Drug Targets–Cardiovascular & Hematological Disorders)*, 18(1), 52–60. https://doi.org/10.2174/1871529X18666180212114816

Shoieb, A. M., Elgayyar, M., Dudrick, P. S., Bell, J. L., & Tithof, P. K. (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International Journal of Oncology*, 22(1), 107–113. https://doi.org/10.3892/ijo.22.1.107

Smith, J. N., & Calvi, L. M. (2013). Concise review: current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 31(6), 1044–1050. https://doi.org/10.1002/stem.1370

Smock, K., & Perkins, S. (2014). Thrombocytopenia: an update. *International Journal of Laboratory Hematology*, 36(3), 269–278. https://doi.org/10.1111/ijlh.12214

Tanık, F., & Gürşan, İ. N. (2022). Kanserde Fiziksel Aktivite ve Egzersiz-Koruyucu ve Tedavi Edici Etki. *İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 129-132.).

Tas, F., Eralp, Y., Basaran, M., Sakar, B., Alici, S., Argon, A., Bulutlar, G., Camlica, H., Aydiner, A., & Topuz, E. (2002). Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. *American Journal of Clinical Oncology*, 25(4), 371–379. https://doi.org/10.1097/00000421-200208000-00011

Tavakkoli, A., Ahmadi, A., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2017). Black Seed (Nigella sativa) and its Constituent Thymoquinone as an Antidote or a Protective Agent Against Natural or Chemical Toxicities. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(Suppl), 2–23

Tsiftsoglou, A. S., Vizirianakis, I. S., & Strouboulis, J. (2009). Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life*, 61(8), 800–830. https://doi.org/10.1002/iub.226

Türkeri, Ö. N. (2019). İskemi Reperfüzyonla İndüklenen Rat Over Hasari Üzerine Timokinonun Biyokimyasal Ve Histopatolojik Etkisi [Doktora Tezi] Atatürk Üniversitesi. https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/54343?show=full

Ueda, Y., Cain, D. W., Kuraoka, M., Kondo, M., & Kelsoe, G. (2009). IL–1R type I–dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *The Journal of Immunology*, 182(10), 6477–6484. 6484. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803961

Umar, S., Zargan, J., Umar, K., Ahmad, S., Katiyar, C. K., & Khan, H. A. (2012). Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico–Biological Interactions*, 197(1), 40–46. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.03.003

US Department of Health and Human Services. (2014). Common toxicity criteria for adverse events (CTCAE). https://www.uptodate.com/contents/common-terminology-criteria-for-adverse-events

Ushach, I., & Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(3), 481–489. https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R

Wilkinson, A. C., Igarashi, K. J., & Nakauchi, H. (2020). Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nature reviews. Genetics*, 21(9), 541–554. https://doi.org/10.1038/s41576-020-0241-).

Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. B. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(4), 443–451. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.09.029

Xu, M., Li, J., Neves, M. A. D., Zhu, G., Carrim, N., Yu, R., Gupta, S., Marshall, J., Rotstein, O., & Peng, J. (2018). GPIbα is required for platelet–mediated hepatic thrombopoietin generation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 132(6), 622–634. https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-820779

Yamane, T. (2018). Mouse yolk sac hematopoiesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 80. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00080

Yıldız, S. Ç., & Gözüoğlu G. (2021) Myeloprotective and hematoprotective role of kefir on cyclophosphamide toxicity in rats. *Archives of Clinical and Experimental Medicine*, 6(2), 77–82. https://doi.org/10.25000/acem.903843

Yokuş, B. & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası . *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7–18. https://dergipark.org.tr/en/pub/duvetfd/issue/31344/342253).

Zafeer, M. F., Waseem, M., Chaudhary, S., & Parvez, S. (2012). Cadmium-induced hepatotoxicity and its abrogation by thymoquinone. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(5), 199–205. https://doi.org/10.1002/jbt.21402

Zhao, A.–b., Bin, Y., Xian–Lin, W., Cao, K.–J., En–Qing, L., Qing–Mei, L., & Chen, X.–Y. (2011). Protective effects on myelosuppression mice treated by three different classic Chinese medicine formulae. *Pharmacognosy Magazine*, 7(26), 133. https://doi.org/10.4103/0973-1296.80671

Zhou, B., Kong, X., & Linzer, D. I. (2005). Enhanced recovery from thrombocytopenia and neutropenia in mice constitutively expressing a placental hematopoietic cytokine. *Endocrinology*, 146(1), 64–70. https://doi.org/10.1210/en.2004-1011

Zhu, J., & Emerson, S. G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors, and lineage commitment. *Oncogene*, 21(21), 3295–3313. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205318