



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2023; 37 (2): 87 - 92
http://www.fusabil.org

Ratlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Anemi Modelinde Zeytin Yaprağı Ekstraktının Etkilerinin Araştırılması *

Mehmet GÜVENÇ^{1, a}
Muhammed ETYEMEZ^{2, b}

¹ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Hatay, TÜRKİYE

² Kastamonu Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Kastamonu, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-9716-0697

^b ORCID: 0000-0003-0497-1878

Siklofosfamid (CP), kanser, multipl skleroz ve romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan ve çeşitli organ hasarları, kemik iliği toksisitesi ve hematopoietik disfonksiyon gibi yan etkilere neden olduğu için kullanımı sınırlı olan bir ilaçtır. Bu çalışmada ratlarda siklofosfamid uygulamasının neden olduğu anemiye karşı zeytin yaprağı ekstraktının (ZYE) koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışma toplam 28 gün sürdü. Bu amaçla anemi modeli oluşturulan grupta 50 mg/kg dozda, haftada bir kez ve intramusküler olarak CP uygulaması yapıldı. Tedavi grubunda ise oral gavaj yöntemi ile 400 mg/kg dozda ZYE uygulaması yapıldı. Çalışma sonunda hematolojik analizlerde alyuvar (RBC), akyuvar (WBC), hemoglobin konsantrasyonu (HGB), hematokrit değeri (HTC), ortalama alyuvar hemoglobini (MCH), ortalama alyuvar hacmi (MCV), eritrosit dağılım genişliği (RDW) gibi parametreler incelendi. Serum örneklerinde ise malondialdehid (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. CP uygulamasının kan RBC ($P<0.01$), HGB ($P<0.001$) ve HTC ($P<0.001$) parametrelerinde istatistiki açıdan anlamlı azalmalara neden olduğu belirlendi. Ayrıca bu uygulamanın serum MDA ($P<0.05$) düzeyinde artışa, GSH ($P<0.05$) düzeyi ve CAT ($P<0.05$) ve GSH-Px ($P<0.01$) enzim aktivitelerinde azalmaya sebep olarak oksidatif stres oluşturduğu tespit edildi. Zeytin yaprağı ekstrakt tedavisinin ise CP'nin neden olduğu oksidatif hasarı önlediği, ayrıca RBC, HGB ve HTC değerlerindeki azalmanın önüne geçtiği ve anemiye karşı koruyucu etkiler gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, anemi, zeytin yaprağı

Investigation of the Effects of Olive Leaf Extract in a Model of Cyclophosphamide-Induced Anemia in Rats

Cyclophosphamide (CP) is a drug used in the treatment of diseases such as cancer and rheumatoid arthritis, and its use is limited because it causes side effects such as various organ damage, bone marrow toxicity, and hematopoietic dysfunction. In this study, it was aimed to investigate the protective effects of olive leaf extract (ZYE) against anemia in rats. The study period was 28 days. For this purpose, CP was administered at a dose of 50 mg/kg once a week intramuscularly in the group in which anemia model was created. In the treatment group, 400 mg/kg ZYE was administered by oral gavage method. At the end of the study, red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit value (HTC), mean red blood cell hemoglobin (MCH), mean red blood cell volume (MCHC) and red blood cell distribution (RDW) were determined. In serum samples, malonyldialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities were analyzed by spectrophotometric method. It was determined that CP administration caused statistically significant decreases in blood RBC ($P<0.01$), HGB ($P<0.001$) and HTC ($P<0.001$) parameters. In addition, it was determined that this application caused an increase in serum MDA ($P<0.05$) level, a decrease in GSH ($P<0.05$) level and CAT ($P<0.05$) and GSH-Px ($P<0.01$) enzyme activities, resulting in oxidative stress. It was determined that olive leaf extract treatment prevented the oxidative damage caused by CP, also prevented the decrease in RBC, WBC, HGB and HTC values and showed protective effects against anemia.

Key Words: Cyclophosphamide, anemia, olive leaf

Giriş

Siklofosfamid, çeşitli kanserlerin, multipl sklerozun ve romatoid artrit tedavisinde kullanılan, antineoplastik ve immünosupresif etkileri olan alkilleyici bir ajandır (1-3). CP vücutta yayılır, fosforamid mustard ve akrolein olmak üzere iki aktif metabolit oluşturur. CP'nin antineoplastik etkileri fosforamid ile ilişkililikten, akrolein istenmeyen toksisitesinden sorumludur (4). Bulantı, kusma, alopesi, kemik iliği baskılanması, hepatotoksosite, nefrotoksosite, nörotoksosite, kardiyotoksosite, immün toksisite, mutajenite, teratojenite ve kanserojenlik gibi kapsamlı yan etkiler ve toksisiteler nedeniyle CP'nin klinik kullanımı sınırlıdır (5). Kemoterapötik ajanlar çoğunlukla vücutta hızla bölünen hücreleri öldürerek kanser hücrelerini ve kemik iliğinden kaynaklanan normal hücreleri hedef alır. CP, DNA ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur ve sitotoksik bir etki gösterir (6). CP'nin yan etkilerinin çoğunun patogenezinde

Geliş Tarihi : 06.10.2022
Kabul Tarihi : 22.02.2023

Yazışma Adresi Correspondence

Mehmet GÜVENÇ
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Hatay – TÜRKİYE

mguvenc@mku.edu.tr

* 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS), 2-4 September 2021, TÜRKİYE.

reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminden kaynaklanan oksidatif stres ve CP metabolitleri tarafından antioksidan savunma sisteminde oluşturulan zayıflık etkilidir (7). CP tedavisi normal hücrelerin DNA'sına zarar verebilir ve bazen yaşamı tehdit eden çeşitli dokularda miyelosupresyon, immünosupresyon ve oksidatif strese neden olabilir (8). CP uygulamasının sıçanlarda kemik iliği toksisitesi ve hematopoitik disfonksiyona neden olduğu ve lökopeni ve trombositopeni görüldüğü bildirilmektedir (9). Hasar gören veya ölen kemik iliği kök hücreleri yeni kan hücreleri üretemez ve bu da trombositopeni ve lökopeniye yol açar (10). Kemoterapi hem kanser hücreleri gibi aktif hücreleri hem de bazı sağlıklı kan hücrelerini etkiler. Kemoterapinin yan etkileri, kemoterapi sağlıklı hücrelere zarar verdiğinde ortaya çıkar. Kemoterapötik ajanlar genellikle sağlıklı hücreler için toksiktir ve miyelosupresyon ve çoklu organ yetmezliği gibi kritik yan etkilere neden olabilir (11). Kanser tedavisinde siklofosamidin kullanımı, genellikle hastaları artan anemi riskine maruz bırakır ve tedavi sırasında güçlü immünosupresif etkiye karşı önleyici tedbirlerin alınmasını zorunlu kılar (12). Kemoterapötiklerle tedavi sırasında ilaçların kemoterapötik etkilerini azaltmadan ve yan etkilerini en aza indirmek için yeni ve daha etkili yollar geliştirilmelidir. Çeşitli klinik ve prelinik çalışmalar, kemoterapötik ve kemopreventif ilaçların bir kombinasyonunun, kemoterapötik ilaçların sistemik toksisitesini azaltmada yardımcı olabileceğini ileri sürmüştür (13, 14). CP, olumsuz toksik etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak amacıyla farklı detoksifiye edici ve koruyucu ajanlarla kombinasyon halinde kullanılır (15).

Tedavi edici fitokimyasallar içeren şifalı bitkiler insan hastalıklarının tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bu fitokimyasallar, antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek veya koruyucu faktörler olarak hareket ederek oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde faydalı olabilir (16). Zeytin yaprağı (*Olea europaea* L. oleaceae), oleuropein (OLP), verbascoside, apigenin-7-glukozit (Api7G), luteolin-7-glukozit (Lut7G), hidroksitirosol (HT) ve tirosol gibi bol miktarda fenolik bileşik içerir. Zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) yaprakları antik çağlardan beri yüksek tansiyon, ateroskleroz ve diyabetle mücadele etmek ve diğer tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (17). Son klinik ve deneysel çalışmalarda, zeytin yaprağı ekstraktının kardiyoprotektif, nöroprotektif, antioksidatif, hipoglisemik (18), antiinflamatuvar, antikanser, antidiyabetik, gastroprotektif ve yara iyileştirici (19, 20) etkilere sahip olduğu ve bu etkilerin içerdiği yüksek polifenolik bileşik konsantrasyonuna bağlı olduğu vurgulanmaktadır.

Mevcut çalışmada da siklofosamid ile oluşturulan deneysel aplastik anemi modelinde *Olea europaea* ekstraktının muhtemel iyileştirici etkilerinin biyokimyasal parametreler değerlendirilerek araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deneysel Model ve Çalışma Dizaynı: Çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2021/02-14 no ile izin alınmıştır.

Çalışma ortamı ratların günlük döngü içerisinde olacak şekilde laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık-12 saat karanlık ve 21 ± 1 °C) uygun olacak şekilde yürütüldü. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari yem (pelet yem) ve musluk suyu ad-libitum olarak uygulandı. Çalışmada her grupta 7 rat olacak şekilde 4 grupta toplam 28 adet wistar albino ırkı dişi rat kullanıldı. Ratlarda CP ile oluşturulan deneysel anemi modeli El-Sebaey ve ark. (21)'nin, zeytin yaprağı ekstraktının kullanım dozu ise Guex ve ark. (22)'nin makalesine uygun olacak şekilde planlandı. Çalışma grupları toplam 4 gruptan oluşturuldu.

Grup 1 (Kontrol Grubu): Bu gruptaki ratlara oral gavaj yöntemi kullanılarak günde bir defa ve 28 gün boyunca 1 mL serum fizyolojik uygulaması yapıldı.

Grup 2 (CP): Bu gruptaki ratlara 4 hafta süre ile haftada bir kez ve 50 mg/kg dozda kas içi siklofosamid uygulaması yapıldı.

Grup 3 (ZYE): Bu gruptaki ratlara 28 gün süre ile günde bir defa, 1 mL serum fizyolojik içerisinde ve 400 mg/kg dozda oral gavaj yöntemi kullanılarak ZYE uygulaması yapıldı.

Grup 4 (CP+ZYE): Bu gruptaki ratlara 4 hafta süre ile haftada bir kez ve 50 mg/kg dozda kas içi siklofosamid uygulaması yapıldı. Ayrıca bu gruba 28 gün süre ile günde bir defa, 1 mL serum fizyolojik içerisinde ve 400 mg/kg dozda oral gavaj yöntemi kullanılarak ZYE uygulandı.

Denemenin 28. gününde anestezi [ketamin (60 mg/kg, İM) + ksilazin (10 mg/kg, İM)] altındaki ratların kuyruk veninden usulüne uygun olarak antikoagulanlı (EDTA) ve antikoagulanlı (serum) kan tüplerine kan örnekleri alındı ve serum tüplerine alınan kan örnekleri 3000 devirde ve 15 dakika santrifüj edildi ve kan serumları hazırlandı. Hazırlanan serum örnekleri epondorff tüplere konuldu ve biyokimyasal analizler yapılınca kadar Veteriner Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Anestezi altında kan örnekleri alınan bütün ratlara dekapitasyon yöntemi kullanılarak ötenazi işlemi uygulandı.

Hematolojik Analizler: Taze kan örneklerinde Veteriner Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan Mindray BC2800 marka otomatik kan sayım cihazı kullanılarak hematolojik analizler yapıldı. Hematolojik analizlerde alyuvar sayısı (RBC), akyuvar sayısı (WBC), hemoglobin konsantrasyonu (HGB), hematokrit değeri (HTC), ortalama alyuvar hücre hemoglobini (MCH), ortalama alyuvar hücre hacmi (MCV), retikülosit dağılım genişliği (RDW) gibi parametreler belirlendi.

Biyokimyasal Analizler: Derin dondurucudan çıkarılan serum örneklerinde oksidatif hasar ve antioksidan aktivite durumunu ortaya koyabilmek için spektrofotometrik olarak lipit peroksidasyon seviyesi, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler konsantrasyonuna göre ölçüldü ve üretilen MDA miktarı, lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak kullanıldı. MDA seviyesi 532 nm'de nanomol cinsinden ifade edildi (23). GSH (24) düzeyi, Sedlak ve Lindsay tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak ölçülmüştür (23). Örnekler %50 TCA (triklorasetik asit) ile çöktürüldü. Çöktürülen örneğin üst fazından 0.5 mL alınarak 2 mL Tris-EDTA tamponu (0.2 M, pH=8.9) ve 0.1 mL 0.01 M 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve spektrofotometrede 412 nm de absorbansları ölçülerek ml protein başına nanomol olarak ifade edildi. GSH-Px aktivitesi, Lawrence ve Burk (25) tarafından tanımlanan metoda göre belirlendi. Reaksiyon karışımında 50 mm potasyum fosfat tamponu; 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azide, 0.2 mM redükte NADPH, 1 IU/mL okside glutatyon reduktaz (GSSG), 1 mM GSH, 0.2 mM H₂O₂ içermektedir. Enzim kaynağından 0.1 mL alınarak, 0.8 mL bahsedilen karışımdan ilave edildi. Bu ilave karışıma 0.1 mL peroksit solüsyonu ilave edilerek reaksiyon başlatılmadan önce 25 °C de inkube edildi. 5 dakika içerisinde 340 nm de absorbansları ölçülerek alınarak mL protein başına IU/L olarak ifade edildi. CAT (26) açıklamış olduğu metoda göre yapıldı. 0.2 mL serum plazma örneği alınarak 1.0 mL substratta 37 °C'de 60 saniye inkube edildi, bu enzimatik reaksiyon 32.4 mM amonyum molibdat ile sona erdirilerek spektrofotometrede 405 nm'de örneğin köre karşı ölçümü yapıldı. CAT aktivitesi ku/L olarak ifade edildi enzim aktivite analizleri yapıldı.

İstatiksel Analizler: Çalışma sonunda elde edilen verilerde gruplara ait değerlerin normal dağılım gösterip

göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik analizi yapıldı ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Grup ortalamalarını karşılaştırmak amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla da Tukey testi yapıldı. İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS Statistics 23 paket programı kullanılarak yapıldı ve P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışma sonunda elde edilen hematolojik parametrelere ait veriler Tablo 1'de, biyokimyasal analizlere ait veriler Tablo 2'de verilmiştir.

Tartışma

Siklofosamid (CP), özellikle yüksek doz ve uzun süreli kullanımda yaygın yan etkilere ve toksisiteye rağmen yüksek terapötik indeks gösteren en popüler alkilleyici antikanser ilaçlardan biridir (7). Siklofosamid, Hodgkin hastalığı, Hodgkin olmayan lenfoma, birçok lösemi türü, multipl miyelom, nöroblastomlar, meme kanseri, yumurtalık adenokarsinomları ve akciğerin belirli malign neoplazmaları dahil olmak üzere çeşitli kötü huylu hastalıkları tedavi etmek için kullanılır (27). CP tedavisinde esas olarak reaktif oksijen türleri ve lipid peroksit oluşumunun aracılık ettiği, mutajenite, kanserojenlik, teratojenite, mielosupresyon, immünosupresyon, kardiyak toksisite, akciğer toksisitesi ve ürotoksisite dahil olmak üzere birçok ciddi yan etki ve toksisite görülebilir (28-30). Ayrıca CP tedavisi, eritrosit, lökosit, trombosit ve kemik iliği çekirdekli hücrelerini önemli ölçüde azaltır. CP, DNA ipliklerini çapraz bağlayarak hücre bölünmesini önler. Hızla bölünen hücreler üzerindeki inhibe edici etkileri, onu bazı kanser türlerine ve bazı immün aracılı hastalıklara karşı etkili bir

Tablo 1. Kan parametre sonuçları

	RBC (1X10 ⁶)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (%)	RDW (%)	WBC (1x10 ³)
Kontrol	8.607±0.29 ^a	15.075±0.49 ^a	48.500±1.46 ^a	56.400±0.77 ^a	17.475±0.27	11.675±0.21 ^b	6.300±0.55
CP	6.252±0.37 ^b	9.840±0.42 ^b	31.060±1.98 ^b	50.820±2.98 ^b	15.130±0.70	15.840±1.08 ^{ab}	6.000±0.43
ZYE	8.396±0.30 ^a	15.020±0.66 ^a	49.560±2.15 ^a	59.040±0.89 ^a	17.820±0.27	12.300±0.76 ^a	6.620±1.23
CP + ZYE	8.470±0.75 ^a	13.400±0.91 ^a	50.725±5.16 ^a	54.800±4.02 ^a	16.050±1.31	14.675±1.26 ^{ab}	4.825±0.60
Önemlilik	P<0.01	P<0.001	P<0.001	P<0.05	P>0.05	P<0.05	P>0.05

1 mm³ kanda; eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH), retikülosit dağılım genişliği (RDW) lökosit sayısı (WBC). (Veriler Ort ± SE şeklinde verilmiştir). Sütunlardaki harflendirme (a, b) istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir.

Tablo 2. Serum MDA ve GSH düzeyleri ile GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri düzeyleri

Grup/Parametre	MDA (nmol/mL)	GSH (nmol/mL)	GSH-Px (IU/g prot)	CAT (U/mL)
Kontrol	19.567±0.67 ^{bc}	5.082±0.54 ^{ab}	48.134±2.00 ^a	80.806±4.28 ^{ab}
SFD	25.023±0.71 ^a	3.388±0.36 ^b	33.774±1.21 ^b	67.080±4.95 ^b
ZYE	17.173±1.01 ^c	5.773±0.63 ^a	42.235±0.86 ^a	88.710±3.75 ^a
CP + ZYE	20.888±0.53 ^b	4.187±0.30 ^{ab}	46.274±3.22 ^a	74.415±4.02 ^{ab}
Önemlilik	P<0.05	P<0.05	P<0.01	P<0.05

Serum, malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktiviteleri (Veriler Ort ± SE şeklinde verilmiştir). Sütunlardaki harflendirme (a,b,c) istatistiksel olarak anlamlı farklılık ifade etmektedir.

ilaç haline getirir (31). CP, spesifik olmayan bir şekilde sadece kanser hücrelerini değil, aynı zamanda DNA'ya bağlanarak ve hücre döngüsüne müdahale ederek yüksek proliferasyon kapasitesine sahip normal sağlıklı hücreleri de etkiler (32). Siklofosamid hematopoietik mikro ortama, özellikle kemik iliği stromal hücrelerine zarar verebilir ve kemik iliğinin hematopoietik fonksiyonunda işlev bozukluğuna yol açabilir (33). Deney hayvanlarında yapılan çeşitli araştırmalarda CP uygulamasının RBC, WBC, Hb, PLT ve HCT gibi kan parametrelerinde azalmalara ve anemiye neden olduğu bildirilmektedir (34-36). Bu çalışmada CP uygulamasının kan RBC, WBC, HGB ve HCT değerlerinde istatistiki açıdan önemli düzeylerde azalmalara neden olduğu belirlendi. Bu parametrelerle ilgili sonuçlar, daha önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir (34, 36). Kırk ve yetmiş yaş arası kadınlar üzerinde yapılan bir araştırmada uzun süreli zeytin yaprağı çayı kullanımının kan RBC sayısı, hemoglobin ve hematokrit değerlerinde önemli düzeylerde artışlara sebep olduğu ifade edilmektedir (37). Aynı araştırmacıların başka çalışmasında da apigenin 7-glucoside (Api7G) ve luteolin 7-glucoside (Lut7G) gibi belirli zeytin yaprağı bileşenlerinin, hematopoietik kök hücreler (HSCs)'in eritroide farklılaşmasını indüklediği ve bu nedenle, kan hücresi oluşturma potansiyeline sahip olduğu vurgulanmaktadır (38). Yapılan çeşitli çalışmalarda (39, 40) diyabetik ratlarda anemi şekillendiği ve oral ZYE uygulamasının hematolojik parametrelerde iyileşmelere neden olarak anemiyi azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada ZYE tedavisinin CP'nin sebep olduğu anemiyi önlediği ve kan RBC, WBC, HGB ve HCT değerlerinin kontrol grubuna yakın olduğu görüldü. Ayrıca CP uygulamasının analiz edilen diğer kan parametrelerinde istatistiki açıdan anlamlı değişimlere sebep olmadığı belirlendi ve gruplar arasında bu parametreler açısından bir anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

CP, aşırı ROS üretimi nedeniyle oksidatif strese neden olabilen en zararlı alkilleyici ajanlardan biridir (41). Siklofosamid, karaciğerde fosframid mustard ve akroleine metabolize olur. Fosframid mustard, siklofosamidin tedavi edici etkisini meydana getirir. Toksik bir madde olan akrolein ise CP'nin yan etkisinden sorumludur (42, 43). Akrolein, indirgenmiş GSH bağlanarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artmasına ve ardından oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna yol açabilir (43, 44). Akrolein çok sayıda hücre sel bölgede hızla reaksiyona girer ve hücre sel antioksidanları tüketir (45). Ayrıca DNA'nın belirli protein kalıntıları ve nükleofilik bölgeleriyle de reaksiyona girebilir (46). CP, özellikle gonadlarda ve hipofizde replike olan ve hızla çoğalan hücrelerin DNA'sını etkiler, alkil gruplarını DNA'nın guanin bileşenlerine aktararak yanlış kodlama, çapraz bağlanma ve DNA kırılmalarına neden olur (47).

Oksidatif stresten antioksidan ve pro-oksidan sistem arasındaki dengesizlik sorumludur. Antioksidan sistem, CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzimleri ve GSH, A, C ve E vitaminlerini ve diğer ekzojen kaynakları içeren enzimatik olmayan bileşenleri kapsar (48). MDA, serbest radikal aracılı bir süreç olan lipid peroksidasyonunun bir son ürünüdür. Anormal şekilde çoğalan hücrelerde artan lipid peroksidasyonundan kaynaklanan MDA'nın dolaşımdaki kana salgılandığı ve kanser hastalarında MDA düzeylerinin artmasına neden olduğu bilinmektedir. CP uygulamasından sonra vücutta oksidatif stres ve artışların bir göstergesi olarak kullanılabilir (49). GSH-Px, hücre zarının yapısını ve işlevini korumak için hidrojen peroksiti katalize eden önemli bir enzimdir (50). CAT, tüm oksijen metabolize eden hücrelerde bulunur ve işlevleri, süperoksit ve hidrojen peroksitin potansiyel olarak zarar verici reaktivitelerine karşı bir savunma sağlamaktır (12). Yapılan çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarında CP uygulamasının serum MDA değerlerini arttırdığı (7, 51), GSH (36) düzeyi ile GSH-Px (7) ve CAT (52) enzim aktivitelerini ise azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada CP uygulanan gruplarda serum MDA düzeylerinde istatistiki açıdan anlamlı artışların olduğu, GSH düzeyi ile CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ise azaldığı belirlendi. Zeytin yaprakları oleuropein, verbascoside, ligstroside, tirosol ve hidroksitirosol gibi biyofenoller açısından zengindir (53). ZYE'nin antioksidan, antinflamatuar, antikanser, antihipertansif, antiaterojenik, hipoglisemik ve hipokolesterolemik etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (18, 54). Ratlarda gentamisin ile oluşturulan deneysel böbrek toksisitesi modelinde ZYE'nin artmış olan serum MDA düzeyini düşürdüğü, azalmış olan böbrek dokusu GSH düzeyi ile CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini arttırdığı, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve antioksidan sistemin uyarılması gibi etkileri sonucunda böbrek dokusunu nefrotoksisiteye karşı koruduğu vurgulanmaktadır (55). ZYE'nin sahip olduğu güçlü antioksidan etkinlik sayesinde doksorubisinin neden olduğu kalp, karaciğer ve böbrek toksisitesini önlediği ifade edilmektedir (56). Yapılan çalışmalarda ZYE'nin karaciğer hasarında koruyucu etkiler gösterdiğini belirtmektedir (57, 58). Bu çalışmada ZYE uygulamasının serum MDA düzeylerini düşürdüğü, GSH düzeyi ile CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde ise artışlara sebep olduğu ve CP'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak, CP ile oluşturulan deneysel modelinde zeytin yaprağı ekstraktının anemi ve oksidatif hasar oluşumuna karşı koruyucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte zeytin yaprağı ekstraktının farklı çalışmalarda doz ve süre farklılıkları oluşturularak yapılan çalışmalarda etkilerinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Zhang J, Tian Q, Zhou SF. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Current Drug Therapy* 2006; 1: 55-84.
- Dollery C. *Therapeutic Drugs*. Edinburg, UK: Churchill Livingstone, Harcourt Brace and Company, 1999.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, Gallo P. The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. *Expert Opinion on Drug Safety* 2007; 6: 183-190.
- Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: A caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chemico-Biological Interactions* 2002; 139: 79-95.
- Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in wistar rats: Role of NFkB/MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 231: 98-107.
- Pratheeshkumar P, Kuttan G. Ameliorative action of *Vernonia cinerea* L. on cyclophosphamide-induced immunosuppression and oxidative stress in mice. *Inflammopharmacology* 2010; 18: 197-207.
- Ramadan G, Nadia M, Zahra MM. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. *British Journal of Nutrition* 2012; 108: 1059-1068.
- Wang H, Wang M, Chen J, et al. A polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International immunopharmacology* 2011; 11: 1946-1953.
- Vadhan-Raj S. Management of chemotherapy-induced thrombocytopenia: current status of thrombopoietic agents. In *Seminars in hematology*. Elsevier 2009; S26-S32.
- Mansour HH, Hasan HF. Protective effect of N-acetylcysteine on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2015; 40: 417-422.
- Takano F, Tanaka T, Aoi J, Yahagi N, Fushiya S. Protective effect of (+)-catechin against 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. *Toxicology* 2004; 201: 133-142.
- Ikumawoyi V, Awodele O, Rotimi K, Fashina A. Evaluation of the effects of the hydro-ethanolic root extract of *Zanthoxylum zanthoxyloides* on hematological parameters and oxidative stress in cyclophosphamide treated rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2016; 13: 153-159.
- Bhattacharjee A, Basu A, Ghosh P, Biswas J, Bhattacharya S. Protective effect of selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice. *Journal of Biomaterials Applications* 2014; 29: 303-317.
- Cetik S, Ayhanci A, Sahinturk V. Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2015; 58: 569-576.
- Das B, Dash S, Chandra C, Chakraborty J. Synergistic immunostimulatory activity of *Terminalia bellerica* gum polysaccharide with levamisole. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)* 2014; 3: 1367-1384.
- Özsoy N, Okyar A, Arda Piriñçi P. The Protective effect of an aqueous extract from *Smilax excelsa* L. against carbon tetrachloride-induced liver in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2016; 13: 203-208.
- Jänicke C, Grünwald J, Brendler T. *Handbuch phytotherapie: Indikationen, anwendungen, wirksamkeit, präparate*. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2003.
- El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews* 2009; 67: 632-638.
- Sarbishegi M, Gorgich EAC, Khajavi O. Olive leaves extract improved sperm quality and antioxidant status in the testis of rat exposed to rotenone. *Nephrourol Mon* 2017; 9(3): e47127.
- Al-Quraishy S, Othman MS, Dkhil MA, Moneim AEA. Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 91: 338-349.
- El-Sebaey AM, Abdelhamid FM, Abdalla OA. Protective effects of garlic extract against hematological alterations, immunosuppression, hepatic oxidative stress, and renal damage induced by cyclophosphamide in rats. *Environmental Science and Pollution Research* 2019; 26: 15559-15572.
- Guex CG, Reginato FZ, Figueredo KC, et al. Safety assessment of ethanolic extract of *Olea europaea* L. leaves after acute and subacute administration to Wistar rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2018; 95: 395-399.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry* 1966; 16: 359-364.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry* 1968; 25: 192-205.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1976; 71: 952-958.
- Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 1991; 196: 143-151.
- McCarroll N, Keshava N, Chen J, et al. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: Chromium (VI). *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2010; 51: 89-111.
- Haque R, Bin-Hafeez B, Parvez S, et al. Aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L.) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity. *Human & Experimental Toxicology* 2003; 22: 473-480.
- Bhatia K, Kaur M, Atif F, et al. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and

- cyclophosphamide in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 1744-1750.
30. Arafa HM. Uroprotective effects of curcumin in cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis paradigm. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2009; 104: 393-399.
 31. Chabner B, Myers C. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 1989; 1: 287-328.
 32. Gamal-Eldeen AM, Abo-Zeid MA, Ahmed EF. Anti-genotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: Prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013; 65: 27-34.
 33. Hsu HY, Ho YH, Lin CC. Protection of mouse bone marrow by Si-WU-Tang against whole body irradiation. *Journal of ethnopharmacology* 1996; 52: 113-117.
 34. Du Q, He D, Zeng HL, et al. Siwu Paste protects bone marrow hematopoietic function in rats with blood deficiency syndrome by regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 2020; 262: 113160.
 35. Xiong L, Ouyang KH, Chen H, et al. Immunomodulatory effect of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide in cyclophosphamide induced immunocompromised mice. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2020; 24: 100224.
 36. Eltantawy FM, Sobh MAA, EL-Waseef AM, Ibrahim R-AA, Saad MA. Protective effect of *Spirulina* against cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2018; 5: 191-196.
 37. Ferdousi F, Araki R, Hashimoto K, Isoda H. Olive leaf tea may have hematological health benefit over green tea. *Clinical Nutrition* 2019; 38: 2952-2955.
 38. Samet I, Villareal MO, Motojima H, et al. Olive leaf components apigenin 7-glucoside and luteolin 7-glucoside direct human hematopoietic stem cell differentiation towards erythroid lineage. *Differentiation* 2015; 89: 146-155.
 39. Mohamed AK, Zaahkouk S, Abo-Elnaga N, Mousa E. Ameliorating effect of olive leaf extract on testes of diabetic young male rats: Histopathological and hematological studies. *Adv Biol Res* 2017; 11: 56-63.
 40. Berköz M, Kahraman T, Shamsulddin ZN, Krośniak M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of olive leaf extract treatment in diabetic rat brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2021; 34(2): 187-196.
 41. Alenzi F, El-Bolkiny YE-S, Salem M. Protective effects of *Nigella sativa* oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide. *British Journal of Biomedical Science* 2010; 67: 20-28.
 42. Khorwal G, Chauhan R, Nagar M. Effect of cyclophosphamide on liver in albino rats: A comparative dose dependent histomorphological study. *International Journal of Biomedical and Advance Research* 2017; 8: 102-107.
 43. Khan JA, Shahdad S, Makhdoomi MA, et al. Effect of cyclophosphamide on the microanatomy of liver of albino rats. *Int J Res Med Sci* 2014; 2: 1466-1469.
 44. Mohammad MK, Avila D, Zhang J, et al. Acrolein cytotoxicity in hepatocytes involves endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012; 265: 73-82.
 45. Ozcan A, Korkmaz A, Oter S, Coskun O. Contribution of flavonoid antioxidants to the preventive effect of mesna in cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Archives of Toxicology* 2005; 79: 461-465.
 46. Souliotis VL, Dimopoulos MA, Sfikakis PP. Gene-specific formation and repair of DNA monoadducts and interstrand cross-links after therapeutic exposure to nitrogen mustards. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 4465-4474.
 47. Becker K, Schöneich J. Expression of genetic damage induced by alkylating agents in germ cells of female mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1982; 92: 447-464.
 48. Adekunle A, Kamdem J, Rocha J. Antioxidant activity and HPLC analysis of *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Report and Opinion* 2012; 4: 6-13.
 49. Becker EW. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
 50. Sun WJ, Pang YW, Liu Y, et al. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 2015; 84: 716-723.
 51. Zhang L, Gong AG, Riaz K, et al. A novel combination of four flavonoids derived from *Astragalus Radix* relieves the symptoms of cyclophosphamide-induced anemic rats. *FEBS Open Bio* 2017; 7: 318-323.
 52. Rostampur S, Hosseinpour Feizi MA, Banan Khojasteh SM, Daluchi F. *Heracleum persicum* extract improves cyclophosphamide-induced liver toxicity and oxidative stress in male rats. *Future Natural Products* 2017; 3: 29-35.
 53. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 247: 60-64.
 54. Waterman E, Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev* 2007; 12(4): 331-342.
 55. Tavafi M, Ahmadvand H, Toolabi P. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Kidney Dis* 2012; 6(1): 25-32.
 56. Kumral A, Soluk Tekkeşin M, Olgaç V, et al. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology* 2015; 22: 117-123.
 57. Shaker NS, Hussein ZA, Tahseen NJ, Al-Musalahi AS, Sahib HB. Hepatoprotective effect of *Olea europaea* L. seeds extracts against methotrexate induced liver injury in mice. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 2022; 12: 113-121.
 58. Fadil HAE, Behairy A, Ebraheim LL, Abd-Elhakim YM, Fathy HH. The palliative effect of mulberry leaf and olive leaf ethanolic extracts on hepatic CYP2E1 and caspase-3 immunoexpression and oxidative damage induced by paracetamol in male rats. *Environmental Science and Pollution Research* 2023: 1-18.