

# Ratlarda siklofosfamidin sebep olduğu kardiyotoksisitede propolisin koruyucu rolü

Emre KAYA<sup>1</sup>, Seval YILMAZ<sup>1</sup>, Neriman ÇOLAKOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.

**Özet:** Çalışmada, kanser ve malignant olmayan hastalıkların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış geniş klinik kullanımlı alkilleyici kemoterapötik bir ilaç olan siklofosfamid (CP)'in kardiyotoksisitesi üzerine propolisin etkileri incelenmiştir. Ratlar; kontrol grubu, propolis uygulanan grup (200 mg/kg/gün gavaj, 7 gün), CP uygulanan grup (150 mg/kg i.p. tek doz) ve CP+propolis uygulanan grup şeklinde 4 gruba ayrılmıştır. Propolis uygulamasına CP uygulamasından 2 gün önce başlanmış ve 7 gün süre ile devam edilmiştir. Kalp dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için alınmıştır. Kalp dokusunda malondialdehid (MDA), redukte glutatyon (GSH) düzeyleri, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri tayini yapılmıştır. Histopatolojik inceleme için kalp dokusu örnekleri uygun yöntemlerle hazırlanıp Masson'nun Trichrome ve Hematoksilen-Eozin tekniği ile boyandıktan sonra incelenmiştir. CP uygulanan grupta MDA, GSH düzeyleri ve CAT aktivitesinde artış, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde düşüş saptanmıştır ( $p<0.05$ ). CP+propolis uygulanan grupta MDA, GSH düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin normal düzeylere ulaştığı gözlenmiştir. Propolis uygulanan grup ile CP+propolis uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Histopatolojik incelemelerde kontrol grubunda kalp dokusuna ait kesitler normal yapıda gözlenmiştir. Propolis uygulanan grupta kalp dokusu kontrol grubu ile benzer yapı göstermiştir. CP uygulanan grupta kalp kası lifleri arasında bazı alanlarda hemoraji ve vasküler konjesyon gözlenmiştir. CP+propolis uygulaması yer yer vasküler konjesyona yol açmıştır. CP'e bağlı kardiyotoksisitenin patogenezinde oksidatif stresin rol oynayabileceği, propolisin CP'e bağlı yan etkileri azaltabileceği görülmektedir.

Anahtar sözcükler: Antioksidan, kalp, malondialdehid, propolis, siklofosfamid.

## The protective role of propolis in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats

**Summary:** In the study, the effects of propolis on the cardiotoxicity of cyclophosphamide (CP), a broadly clinically used alkylating chemotherapeutic drug proven to be effective in the treatment of cancer and non-malignant diseases, were investigated. Rats were divided into four groups as follows; control group, propolis treated group (200 mg/kg/day gavage for 7 days), CP treated group (150 mg/kg single dose i.p.), and CP+propolis treated group. The application of propolis was started 2 days before CP treatment and continued 7 days. Heart tissue was taken for biochemical and histopathological examinations. Malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) activities were determined in heart tissue. For histopathological examination, heart tissue samples were prepared by appropriate methods and examined after stained with Masson's trichrome and hematoxylin-eosin technique. A significant increase in MDA, GSH levels and CAT activity were detected in the CP-treated group, whereas GSH-Px, GST and SOD activities were decreased ( $p<0.05$ ). MDA, GSH levels and antioxidant enzyme activities in the CP+propolis treated group was observed that reached its normal level. Propolis treated group and CP+propolis treated group observed no statistically significant change. In the histopathological examinations, the sections of the heart tissue in the control group were observed in normal structure. Heart tissue showed a similar structure with the control group in the propolis treated group. Hemorrhage and vascular congestion in some areas of the cardiac muscle fibers were observed in the CP-treated group. CP+propolis administration caused locally vascular congestion. It is estimated that oxidative stress may play a role in the pathogenesis of CP-induced cardiotoxicity and propolis may reduce the side effects related to CP.

Keywords: Antioxidant, cyclophosphamide, heart, malondialdehyde, propolis.

## Giriş

Kemoterapi, birçok kanser tedavisinde neoplastik hastalığın ilerleyişini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla antineoplastik ilaç uygulanmasıdır. Antineoplastik ilaçlardan en fazla kanserojenik olanları

alkilleyici tipte olanlardır. Alkilleyici ilaçların kemoterapi uygulamalarında kullanım dozunu sınırlayan en önemli etken ise çoklu organ toksisitelerine neden olmalarıdır. Bu durum, bu tip ilaçların güçlü bir terapötik etkinliğin sağlanmasını engeller (9).

Siklofosamid (CP) günümüzde en yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardan birisidir. Kronik ve akut lösemilerin, miyelomların, lenfomaların tedavisi ve kemik iliği transplantasyonu için kullanılmaktadır. Ayrıca, CP'in yüksek derecede güçlü bağışıklık baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu da düşünülmektedir (20, 21). Tümör seçici aktivitesi dışında, birçok toksik yan etkiye de sahiptir. Doz bağımlı kardiyotoksiste en önemli toksik etkilerinden biridir. Farklı tedavi rejimleri ve hasta tiplerine bağlı olarak CP'in tek bir yüksek dozunun neden olduğu ölümcül kardiyomiyopati insidansının %17'nin üzerinde olduğu bilinmektedir (54). Diğer antineoplastik ilaçların gecikmiş kardiyotoksik etkilerinin aksine, CP'nin ilk dozu (180-200 mg/kg) uygulandıktan sonraki 1-10 gün içinde ölümcül kardiyomiyopatiye neden olduğu bildirilmiştir (8). Ayrıca sık görülen akut konjestif kalp yetmezliği, hemorajik miyoperikardit ve ani ölüm vakaları da bildirilmiştir (46).

Sitotoksik bir ilaç olan CP karaciğerde hidroksilasyona uğrayarak metabolitleri olan fosforamid mustard ve akroleine dönüşmektedir. CP antineoplastik etkilerini fosforamid mustard ile göstermektedir. Fosforamid mustardın organizmada nükleik asitlere bağlanarak hücrenin bölünmesini baskıladığı ve CP'in antitümör etkilerine yardımcı olduğu bilinmektedir. CP'in asıl toksik etkisinin metaboliti olan akroleine bağlı olduğu düşünülmektedir (31). Metabolitler, DNA'yı ve proteinleri alkile ederek sitotoksositeye ve DNA'da çapraz bağların oluşumuna yol açar (42). Sitotoksik etkileri, bünyelerindeki elektrofilik alkil kökü ile hedef makromoleküllerin nükleofilik parçasının geri dönüşsüz bir şekilde kombinasyon yapması ile olmaktadır (57). Akrolein, hücre ve dokularda antioksidan sistem ile etkileşime geçerek serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu metabolitler, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROT)'ni üreten sistemlerle etkileşirler. Ayrıca, artmış ROT, DNA'nın hasar görmesine ve oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına neden olarak hücrel disfonksiyona neden olur (51).

Propolis, bal arısı (*Apis mellifera L.*) tarafından değişik bitki tomurcuklarının yaprak ve gövdelerinden toplanıp biriktirilen, kovani dış etkenlerden, mikroorganizmalardan ve diğer zararlılardan koruyan yapışkan, reçinemi bir maddedir (19). Antioksidatif, sitostatik, antimutagenik ve immünomodülatör, antimikrobiyal, antiviral, serbest radikal süpürücü, anti-inflamatuvar, lokal anestezi, hepatoprotektif, antitümoral ve bağışıklık sistemini uyarması dahil propolisin sayısız biyolojik özellikleri bildirilmiştir. Propolisin bu özellikleri zengin, flavonoid, fenolik asit ve terpenoid içeriklerine dayanmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, propolis, apiterapi ve tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (47, 55).

Çalışmada; kalp dokusunda malondialdehid (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ile antioksidan enzim

aktiviteleri incelenerek, CP ve propolisin biyokimyasal ve histopatolojik olarak etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

**Deney Grupları:** Çalışmada 3 aylık toplam 28 adet Wistar-Albino ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Araştırmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan araştırma için etik kurul onayı (2014/10) alınmış ve deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilmiştir. Deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve  $24\pm 3^\circ C$ ) uygun olarak yürütülmüştür. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve musluk suyu *ad libitum* sağlanmıştır. Kontrol grubu ratlara herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Çalışma grupları ise; propolis uygulanan grup (200 mg/kg/gün gavaj ile, 7 gün), CP uygulanan grup (150 mg/kg/i.p. tek doz), CP (150 mg/kg/i.p. tek doz)+propolis (200 mg/kg/gün gavaj ile, 7 gün) uygulanan grup şeklinde oluşturulmuştur.

CP, serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl)'te, propolis %70'lik etanolde çözülmüştür. CP, 150 mg/kg tek doz i.p. olarak, propolis ise 200 mg/kg/gün dozunda uygulanmıştır. Propolis uygulamasına oral olarak CP uygulamasından 2 gün önce başlanmış ve 7 gün süre ile devam edilmiştir.

**Örnek Toplama ve Biyokimyasal Analiz:** Uygulamaların sonunda ratlar sakrifiye edilerek kalp doku örnekleri alınmıştır. Kalp doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar  $-80^\circ C$ 'de saklanmıştır. Analizler öncesinde kalp dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra distile su ile 1:10 oranda sulandırılarak Potter-elvehjem homojenizatörde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar soğutmalı santrifüjde (NÜVE NF 800R) MDA, GSH, katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) analizleri için 3.500 rpm'de 15 dk, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) analizi için ise 14.000 rpm'de 55 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantlar alınmıştır.

MDA tayini Placer ve ark. (41) tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntem lipid peroksidasyonu (LPO)'nun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. GSH seviyesi, Ellman ve ark. (12) tarafından bildirilen metotla yapılmıştır. Bu yöntem, 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir. CAT aktivitesini ölçmek için Aebi (1) metodu kullanılmıştır. CAT,  $H_2O_2$ 'in yıkımını katalize eder.  $H_2O_2$ 'in CAT tarafından yıkım hızı,  $H_2O_2$ 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. GSH-Px aktivite ölçümü için Beutler (6) metodu kullanılmıştır. GSH-Px, GSH'un okside glutatyon

(GSSG)'a oksidasyonunu  $H_2O_2$  kullanarak katalizler. GSSG'nin oluşum hızı glutatyon redüktaz reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür. GST aktivite ölçümü, GSH ve 1-2 dikloro,4 nitrobenzenin (CDNB) konjugasyonu sonucu oluşan ürünün (1-(S-glutatyonil)-2,4 dinitrobenzen)) 340 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanan Habig ve ark. (23)'ün metoduna göre gerçekleştirilmiştir. SOD aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen  $O_2^{\cdot-}$ 'nin nitroblue tetrazolium (NBT)'ü indirgeyerek renk oluşması esasına dayanan metot ile gerçekleştirilmiştir (52). Homojenatlardaki protein miktarı modifiye Lowry (29) yöntemine göre ölçülmüştür.

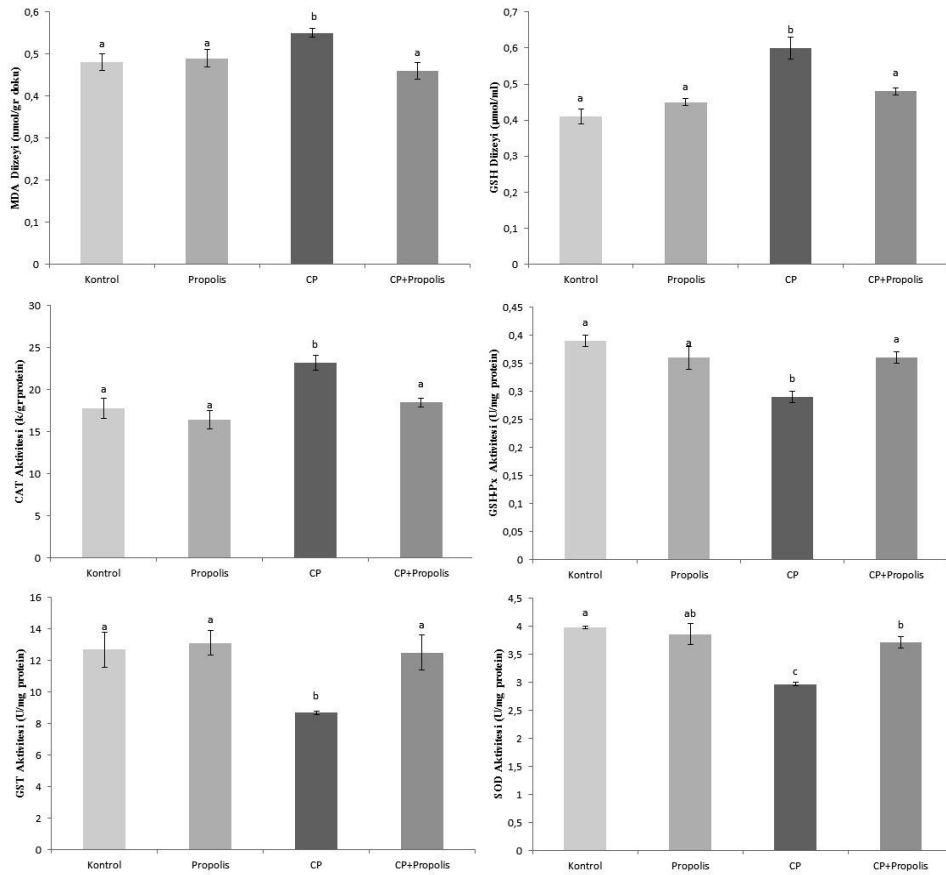
**Histopatolojik İnceleme:** Deneysel çalışmanın sonunda, tüm grupların kalp dokusu örneği alınmış ve %10 formaldehit solüsyonunda tespit edilmiştir. Örnekler parafin içine gömülmüş ve seri olarak 5 µm kalınlığında kesilmiştir. Doku sekansları CP'e bağlı yapısal değişiklikleri belirlemek için Hematoksilin-Eozin ve Masson Trichrome teknikleriyle boyanmıştır. Bütün boyalı doku kesitleri Olympus BH2 fotomikroskobu ile incelenmiştir (30).

**İstatistiksel Analiz:** Ölçülen tüm parametrelere ait ham değerlerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi uygulanmış

ve testin sonucunda tüm parametrelerdeki değerlerin normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bu testin sonucuna istinaden gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalar için de Tukey testi uygulanmıştır. Yapılan tüm istatistik analizlerde farklı gruplar arasında istatistiksel anlamlılık SPSS 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) yazılım paketi kullanılarak yapılmıştır (27). Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel yönden  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

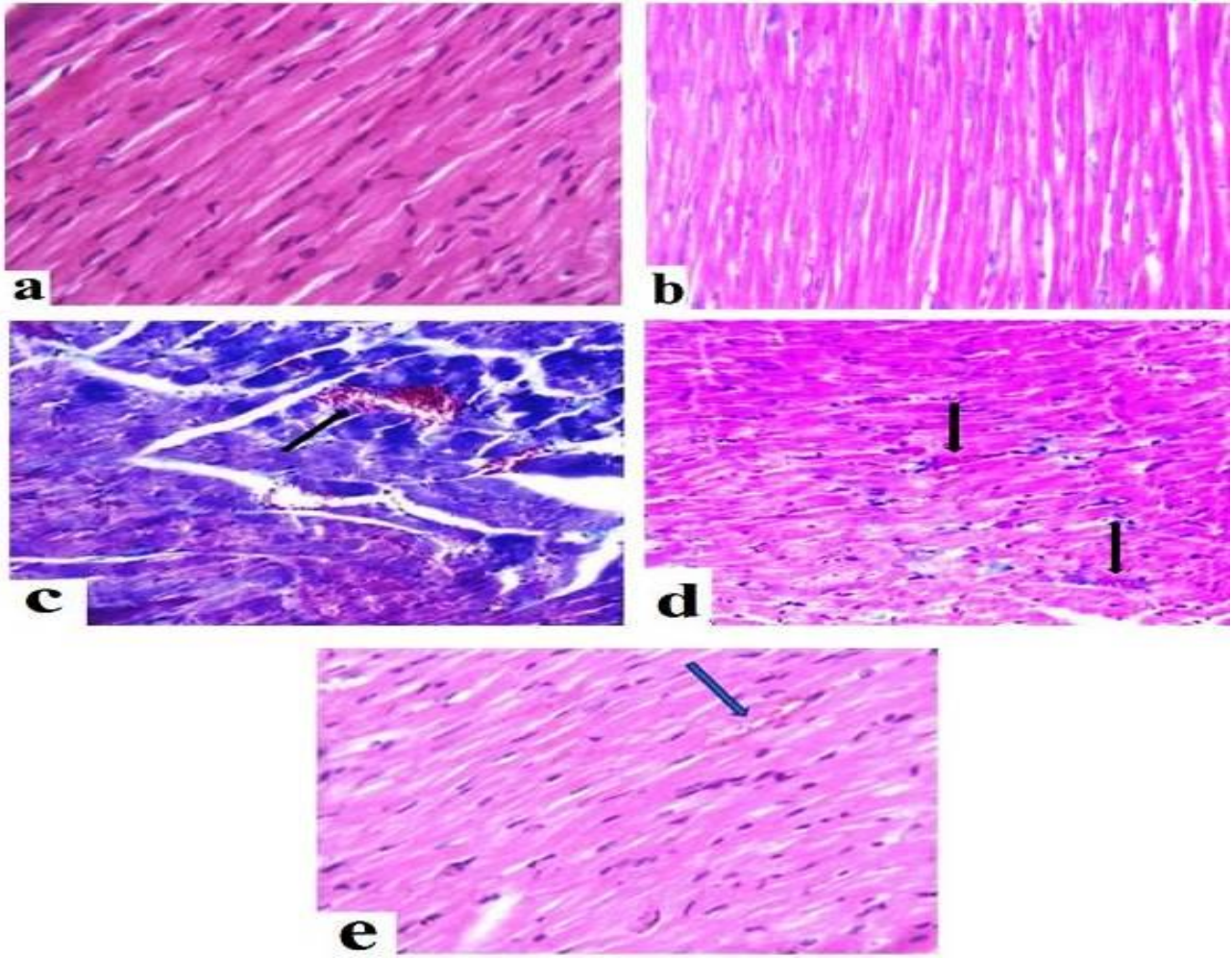
## Bulgular

**MDA, GSH Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri:** Şekil 1, kalp dokusunda kontrol ve deney gruplarında MDA ve GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini göstermektedir. CP uygulanan grupta MDA, GSH düzeyleri ve CAT aktivitesinde artış, GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde düşüş saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Propolis uygulanan grup ile CP+propolis uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. CP+propolis uygulanan grupta MDA, GSH düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri kontrol grubu düzeylerine ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. CP uygulanan ratların kalp dokusunda propolisin MDA, GSH düzeyleri ile CAT, GSH-Px, GST ve SOD aktiviteleri üzerine etkileri

Figure 1. Effects of CP on MDA, GSH levels and CAT, GSH-Px, GST and SOD activities in heart tissue of CP treated rats



Şekil 2. Kontrol grubu (a), Propolis grubu (b), CP grubu (c ve d), CP+Propolis grubu (e). Normal görünümlü kalp kası dokusu (a ve b). Belirgin hemoraji (c) ve konjesyon (d). Hafif şiddette konjesyon (e).

Figure 2. Control group (a), Propolis group (b), CP group (c and d), CP+Propolis group (e). Normal-looking heart tissue (a and b). Significant hemorrhage (c) and congestion (d). Mild severe congestion (e).

**Histopatolojik İnceleme:** Histopatolojik incelemelerde kontrol grubunda kalp dokusuna ait kesitler normal yapıda gözlenmiştir (Şekil 2-a). Propolis uygulanan grupta kalp dokusu kontrol grubu ile benzer yapı göstermiştir (Şekil 2-b). CP uygulanan grupta kalp kası lifleri arasında bazı alanlarda hemoraji ve vasküler konjesyon gözlenmiştir (Şekil 2-c, d). CP+propolis uygulaması yer yer vasküler konjesyona yol açmıştır (Şekil 2-e).

### Tartışma ve Sonuç

Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücrelerine karşı olan seçicilikleri, antibiyotiklerin bakteri hücrelerine karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal hücre arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur; mevcut fark daha çok kantitatif yöndedir. Bu nedenle çoğu kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu

üzerine de yan etkileri vardır. Kanser hastalarında, kanser ilaçlarının yapmış oldukları kardiyotoksik yan etkiler gittikçe artan çalışma konusu olmuştur (2, 14).

Kanser ve malignant olmayan hastalıkların (lupus eritematozus, behçet hastalığı, vaskülit, bağışıklık hastalıkları, sistemik bağ dokusu hastalığı, romatizmal artrit, otoimmün hemolitik anemi, nefrotik sendrom gibi) tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış geniş klinik kullanımlı kemoterapötik bir ilaç olan CP'nin antitümoral etkinliği, yüksek dozda kullanılabilmesine bağlanmaktadır. CP gibi yüksek doz alkilleyici (DNA'yı etkileyen) ajanlar kanser hücrelerini yok ederken, normal dokuları olumsuz biçimde etkilemektedirler (40).

Özellikle yüksek doz CP (120-200 mg/kg) kullanımından sonra kardiyak etkiler gelişebildiği bildirilmiştir. Kardiyak semptomlar; aritmi (taşikardi, atriyo-ventriküler tam blok), akut fulminant kalp yetersizliği ve hemorajik miyoperikardiyum ve bunun neden olduğu perikardiyal efüzyon, kardiyak tamponat ve hatta ölüm olarak sayılabilir.

Akut semptomlar genellikle ilaç verildikten 1-2 hafta sonra görülür, yan etki gelişirse %11 ölümcül olabilir (17, 50). Yine Horacek (24) kardiyotoksisite ve kardiyomyopatinin CP kemoterapisinin komplikasyonu olabileceğini bildirmiştir.

Birçok araştırmada kansere karşı tedavinin muhtemel bir komplikasyonunun kardiyovasküler toksisite olabileceği ve akut kardiyomyopatinin kullanılan yüksek doz CP ile oluşabileceği bildirilmiştir (37, 58). Sayed-Ahmed ve ark. (44) tarafından ratlarda yapılan bir çalışmada akut kardiyotoksisite ve kardiyomyopatinin 200 mg/kg dozda uygulanan CP ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda CP'in LPO ve oksidatif stres oluşturabileceği (15) ve artan oksidatif stresin, azalmış enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların kardiyotoksisiteye sebep olabileceği rapor edilmiştir (16, 25). Tripathi ve Jena (56) farelerde yaptıkları çalışmada CP sitotoksisitenin serbest radikalleri aşırı bir şekilde arttırdığını ve oksidatif strese sebep olabileceğini göstermişlerdir. Janero ve ark. (26) tarafından neonatal rat kalp dokusu hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada CP uygulaması sırasında ROT'un aşırı üretimini LPO'na neden olduğu ve meydana gelen membran hasarının miyokardiyal membranın bütünlüğünü bozduğu ve disfonksiyona neden olduğunu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, araştırmacılar CP'in dozuna bağlı olarak artan MDA düzeyinin hücre hasarı ve oksidatif stresi şiddetlendirdiğini göstermişlerdir (39). Shanmugarajan ve ark. (48) ratlarda 200 mg/kg dozda i.p. olarak uygulanan CP'in neden olduğu oksidatif miyokardiyal hasara karşı *Ficus hispida*'nın yaprak ekstresinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında CP uygulamasına bağlı olarak MDA düzeyinin arttığını gözlemlemişlerdir. Çalışmada; uygulanan CP'in kalp dokusunda LPO'nun göstergesi olan MDA düzeylerinde önemli derecede artışa neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmadaki bulgular birçok araştırmacının bulgularına paralel olarak CP'in oluşturduğu oksidatif stresteki artışa bağlı olarak etkin oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olduğunu düşündürmektedir. Bu değişiklikleri CP tarafından oluşan metabolitler ve bu metabolitlerin oluşumu sırasında üretilen serbest radikallerin tetiklenmiş olduğu düşünülebilir. CP ile muamele edilmiş ratların kalp dokusunda MDA düzeylerindeki artış CP'nin toksik özelliği nedeniyle olabilir. CP, LPO'nun dolayısı ile de onun bir ürünü olan MDA miktarının artmasına sebep olabilmektedir. MDA düzeylerindeki artış CP'nin hücresele antioksidan savunma sistemi tarafından tolere edilemeyen yüksek düzeyde serbest radikallerin oluşumuna neden olduğunu göstermektedir.

Bazı araştırmacılar (4, 59) oksidatif strese bağlı olarak dokularda GSH düzeylerinde azalma gözlemlerken, bazı araştırmacılar (5, 32) ise oluşan hasarın GSH düzeylerini değiştirmedeğini ve hatta artırabileceğini belirlemişlerdir. Ratlarla yapılan deneysel bir çalışmada yüksek doz CP

(200 mg/kg) verilen ratların kalp dokusunda GSH düzeyinin azaldığı, kreatin kinaz ve laktat dehidrogenaz düzeyinin arttığı ve miyokardiyal disfonksiyonun olduğu gösterilmiştir (3). Yapılan çalışmada CP uygulaması ile kalp GSH düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiş olup GSH düzeylerindeki bu artışın dokuların oksidatif strese karşı bir tepkisi olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen deneysel bir çalışmada, CP uygulanan ratların farklı dokularında GSH düzeylerinin farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. CP uygulaması ile böbrek GSH düzeyinin arttığı, karaciğer, pankreas ve kalpte ise azaldığı belirlenmiştir (18). Gunes ve ark. (22) çalışmalarında, CP (100 mg/kg) verilen deney gruplarında MDA, total oksidan seviyesi ve oksidatif stres indeksi düzeylerinde artma, GSH, SOD, CAT ve total antioksidan seviye düzeylerinde ise kontrol grubuna göre azalma olduğunu saptamışlardır. Yine ratlarda CP (200 mg/kg) kaynaklı oksidatif kalp hasarına karşı  $\alpha$ -lipoik asidin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada CP uygulanan grupta MDA düzeylerinde anlamlı bir artış, GSH düzeyi ve CAT, GSH-Px, GST ve SOD gibi bazı antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı düşüş tespit edilmiştir (35). Swamy ve ark. (53) ratlarda *Saraca indica* kabuğunun alkollü ekstraktının 200 mg/kg dozda uygulanan CP kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı etkinliğini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırdıkları çalışmalarında CP uygulanan grupta MDA düzeylerinde anlamlı bir artış, GSH düzeyi ve CAT ve SOD gibi bazı antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı düşüş tespit etmişlerdir. CP'in, miyokarda histopatolojik olarak büyük değişiklikler meydana getirerek, esas olarak miyokard dokusunun bozulması şeklinde kalp kası liflerinde vakuolar değişiklikler, miyokard dokusunun dejenerasyonu, kardiyomyositlerin vakuolizasyonu, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve miyofibril kaybı değişiklikler meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Chakraborty ve ark. (10) ratlarda yeşil çay ekstraktının doza bağlı olarak CP kaynaklı miyokard toksisitesini azalttığını ortaya koydukları çalışmalarında CP uygulanan grupta tiyobarbitürat reaktif maddeler (TBARS) düzeyinde artış, CAT ve SOD aktivitelerinde anlamlı azalmalar belirlemeleri yanında histopatolojik olarak CP uygulamasının kalp dokusunda yaygın miyofibriller dejenerasyon, belirgin diffüz inflamasyon ve artmış interstisyel boşluklara neden olduğunu göstermişlerdir. Motawi ve ark. (34)'nın CP (200 mg/kg) verilen ratlarda yaptıkları çalışmanın histolojik bulguları miyokarda hemorajik odakların, miyokardiyal lifler bozulma ve hiyalinleşme olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızda tek doz CP uygulanan ratlarda histopatolojik olarak kalp kası lifleri arasında hemoraji ve vasküler konjesyon gözlenmiş olup bu değişiklikler CP uygulamasının kalp dokusunda bir hasar meydana getirdiğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, araştırmacıların bulgularına benzer şekilde CP uygulanan grupta MDA düzeylerinde anlamlı bir artış,

GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinde ise anlamlı düşüş tespit edilmiştir. Diğer araştırmacılardan farklı olarak GSH düzeyi ile CAT aktivitelerinde anlamlı artışlar belirlenmiş olup bu değişim etkin oksijen radikallerine karşı dokularda koruyucu bir etkinlik oluşturabileceğini düşündürmektedir. Nagi ve ark. (36) gerçekleştirdikleri bir çalışmada *Nigella sativa*'nın ana bileşeni olan timokinonun, 200 mg/kg i.p. dozda uygulanan CP ile indüklenen kardiyotoksositeye karşı muhtemel koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Kalp dokusunda CP'in, TBARS ve toplam nitrat/nitrit oranında belirgin bir artışa, GSH, CAT, GSH-Px ve SOD enzim aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, akroleinin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı antioksidan ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antioksidanların kemoterapiye bağlı toksisite şiddetini ve sıklığını azaltarak, daha yüksek ve etkin dozların kullanılmasının sağlanabileceği ileri sürülmüştür (7, 49).

Propoliste bulunan flavonoidler ve diğer bazı bileşenlerin serbest radikallerin etkisini önleyici önemli bileşikler olduğu bildirilmektedir. Bazı flavonoidler doymamış yağ asitlerinin peroksi radikalleri ile etkileşime geçerek LPO'nun başlangıç aşamasına etki edebilmektedir. Flavonoidlerin antioksidan etkileri peroksit iyonları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroksit ve singlet oksijen radikallerini uzaklaştırma aktiviteleri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında flavonoidlerin lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek antioksidan etki gösterdikleri bildirilmektedir (38, 45).

El-Naggar ve ark. (13), farelerde CP kaynaklı değişikliklere karşı propolis koruyucu etkilerini aydınlatmak için gerçekleştirdikleri çalışmada 200 mg/kg dozda i.p. olarak CP uygulanan farelerde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve kreatinin düzeylerinde bir artış ve beyaz kan hücreleri (WBC) ve trombosit sayısının azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca, karaciğer ve böbreklerin histolojik yapısında önemli değişiklikler gözlemlenmişlerdir. CP ile birlikte propolis uygulanan farelerde ise ALT, AST aktiviteleri, üre, kreatinin, WBC ve trombosit seviyelerinde iyileşme saptamışlardır. Bunun yanında, karaciğer ve böbreklerin histolojik yapısının önemli ölçüde düzeldiğini belirlemişlerdir. Chunyi ve ark. (11) farelerde gerçekleştirdikleri bir çalışmada propolis ekstraktının, kemoterapötik maddenin neden olduğu lökositopeni ve trombositopeni hafifletebileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Santos ve Cruz (43), propolis antioksidan özelliklerinin, kemoterapi ilaçlarının neden olduğu yan etkileri, terapötik etkilere herhangi bir zarar vermeden azaltabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, Mokhtar ve Afrah (33) propolis alüminyum klorürün testis üzerindeki zararlı etkilerine karşı antagonist etkisini bildirmişlerdir.

Genellikle, anti kanser ilaçlarının toksik yan etkilerini gidermek için, bazı antioksidan ajanlar oksidatif stresi modüle etmek için faydalı kabul edilir. Buna göre, potansiyel antioksidan ajanlar içeren bir tedavi rejimi, kemoterapötik toksisitenin iyileştirilmesi için bir yaklaşım olabileceği düşünülebilir (28, 43).

Propolis uygulaması ile artmış olan MDA, GSH düzeyleri ile CAT aktivitesinin azalması, düşmüş olan GSH-Px, GST ve SOD aktivitelerinin artması propolisin serbest radikal üretilmesini sınırlayarak oksidatif stres ve serbest radikalleri önleme yeteneğine sahip olması ile açıklanabilir. Propolisin LPO'nu inhibe ederek hücre zarını koruyucu rolünün yanı sıra antioksidanlarla etkileşimi sayesinde CP gibi sitotoksik ajanların toksik yan etkilerini azaltabileceği söylenebilir.

Hem enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların düzeylerindeki değişiklikler hem de histopatolojik bulgulardaki değişiklikler CP'in ratların kalp dokusunda bir hasar meydana getirebileceğini, propolisin ise bu hasarı azaltabileceğini düşündürmektedir. Başta kanser tedavisi olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan CP'in yüksek dozlarda kullanılabilmesine olanak sağlamak ve CP'in yan etkilerinin azaltılması noktasında antioksidan özelliği bilinen propolisin tedaviye destek olarak kullanılabilmesi kanısına varılabilmektedir. Ancak bu konuda özellikle kullanılacak doz miktarı yönünden daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

### Kaynaklar

1. **Aebi H** (1974): *Catalase*. 673-678. In: Bergmeyer HU (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. 2<sup>nd</sup> English ed. Weinheim: Verlag Chemie.
2. **Aktürk E, Kurtoğlu E, Harputluoğlu H** (2011): *Kanser ilaçlarının kardiyovasküler yan etkileri: bu yan etkiler nasıl belirlenmeli, tedavi ve takip nasıl yapılmalı?* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2011; **18**(2), 137-142.
3. **Asiri Y** (2010): *Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and bax signal expression in rat cardiac tissues*. *Oxid Med Cell Longev*, **3**(5), 308-316.
4. **Bansal AK, Bansal M, Soni G ve ark.** (2005): *Modulation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes*. *Hum Exp Toxicol*, **24**(6), 297-302.
5. **Bansal AK, Bansal M, Soni G ve ark.** (2005): *Protective role of vitamin E pre-treatment on Nnitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver*. *Chem Biol Interact*, **156**(2-3), 101-111.
6. **Beutler E** (1984): *Red cell metabolism*. 160. A manual of biochemical methods. Grune and Starton (Editors) 2<sup>nd</sup> Edition, New York.
7. **Block KI, Koch AC, Mead MN ve ark.** (2007): *Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials*. *Cancer Treat Rev*, **33**(5), 407-418.
8. **Braverman AC, Antin JH, Plappert MT ve ark.** (1991): *Cyclophosphamide cardiotoxicity in bone marrow*

- transplantation: a prospective evaluation of new dosing regimens. J Clin Oncol*, **9**, 1215-1223.
9. **Cetik S, Ayhancı A, Şahintürk V** (2015): *Protective effect of carvacrol against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. Br Arch Biol Technol*, **58**(4), 596-76.
  10. **Chakraborty M, Kamath JV, Bhattacharjee A** (2014): *Pharmacodynamic interaction of green tea extract with hydrochlorothiazide against cyclophosphamide-induced myocardial damage. Toxicol Int*, **21**(2), 196.
  11. **Chunyi, G, Jian, Z, Yueran ve ark.** (2000): *Experimental and clinical studies on the effect of extract of propolis on decreasing the toxicity of chemotherapeutant. Chinese J Biochem Pharm*, **2**, 90-92.
  12. **Ellman GL, Courtney KD, Andres V ve ark.** (1961): *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol*, **7**, 88-95.
  13. **El-Naggar SA, Alm-Eldeen AA, Germoush MO ve ark.** (2015): *Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. Pharm Biol*, **53**(2), 235-241.
  14. **Erkurt ME, Kuku İ, Kaya E ve ark.** (2009): *Kanser kemoterapisi ve böbrek. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **16**(1), 63-68.
  15. **Fatani AG, Darweesh AQ, Rizwan L ve ark.** (2010): *Carnitine deficiency aggravates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. Chemotherapy*, **56**(1), 71-81.
  16. **Fisher-Wellman K, Bell HK, Bloomer RJ** (2009): *Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. Oxid Med Cell Longev*, **2**, 43-51.
  17. **Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL ve ark.** (2005): *Cardiotoxicity of cancer therapy. J Clin Oncol*, **23**, 7685-7696.
  18. **Friedman HS, Colvin OM, Aisaka K ve ark.** (1990): *Glutathione protects cardiac and skeletal muscle from cyclophosphamide-induced toxicity. Cancer Res*, **50**(8), 2455-2462.
  19. **Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H ve ark.** (2005): *Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitu. Pharmacol Res*, **51**(2), 147-152.
  20. **Gershwin ME, Goetzl EJ, Steinberg AD** (1974): *Cyclophosphamide: use in practice. Ann Intern Med*, **80**, 531-540.
  21. **Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC ve ark.** (1986): *Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. Blood*, **68**, 1114-1118.
  22. **Gunes S, Ayhancı A, Sahinturk V ve ark.** (2017): *Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney. Can J Physiol Pharmacol*, **95**(7), 844-849.
  23. **Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB** (1974): *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem*, **249**, 130-139.
  24. **Horacek JM** (2011): *Biomarkers of cardiac injury in detection of cardiotoxicity induced by chemotherapeutic agents. Mil Med Sci Lett*, **80**, 103-117.
  25. **Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH ve ark.** (2014): *Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. Chemosphere*, **108**, 197-204.
  26. **Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM** (1991): *Hydrogen peroxide- induced oxidative stress to the mammalian heartmuscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. J Cell Physiol*, **149**, 347-64.
  27. **Karagöz Y** (2015): *Etkileşimli (İnteraksiyonlu) Varyans Analizi. 277-284. Güncellenmiş 2. Basım, SPSS 22 Uygulamalı Biyoistatistik. Nobel, Ankara.*
  28. **Liu CC, Hsu JM, Kuo LK ve ark.** (2013): *Caffeic acid phenethyl ester as an adjuvant therapy for advanced prostate cancer. Med Hypotheses*, **80**, 617-619.
  29. **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL ve ark.** (1951): *Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem*, **193**, 265-257.
  30. **Luna LG** (1968): *Manuel of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 1-36, McGraw-Hill Book Co, New York.*
  31. **Masuda H, Chancellor MB, Kihara K ve ark.** (2006): *15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 attenuates development of cyclophosphamide-induced Cystitisin rats. Urology*, **67**, 435.
  32. **Mizuoka H, Shikata N, Yang J ve ark.** (1999): *Biphasic effect of colchicine on acute liver injury induced by carbon tetrachloride or by dimethylnitrosamine in mice. J Hepatol*, **31**(5), 825-833.
  33. **Mokhtar IY, Afrah FS** (2009): *Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. Food Chem Toxicol*, **47**, 1168-1175.
  34. **Motawi TM, Sadik NA, Refaat A** (2010): *Food and Chemical Toxicology. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide induced oxidative injury: An experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. Food Chem Toxicol*, **48**(8-9), 2326-2336.
  35. **Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E ve ark.** (2004): *Protective effect of DL-alpha-lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. Chem Biol Interact*, **151**(1), 13-19.
  36. **Nagi MN, Al-Shabanah OA, Hafez MM ve ark.** (2011): *Thymoquinone supplementation attenuates cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats. J Biochem Mol Toxicol*, **25**(3), 135-142.
  37. **Özkocaman V** (2007): *Ekstramedüller toksisite: Değerlendirme, derecelendirme, prognostik faktörler. THD 2007*, 22-32.
  38. **Pascual C, Gonzales R, Torricella RG** (1994): *Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J Ethnopharmacol*, **41**, 9-13.
  39. **Pascual C, Karzai W, Meier-Helmann A ve ark.** (1998): *Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. Crit Care Med*, **26**, 705-709.
  40. **Perini P, Calabrese M, Rinaldi L ve ark.** (2007): *The safety profile of cyclophosphamide in multiple sclerosis therapy. Expert Opin Drug Saf*, **6**, 183-190.
  41. **Placer ZA, Cushman L, Johnson BC** (1966): *Estimation of products of lipid peroxidation in biological fluids. Anal Biochem*, **16**, 359-364.
  42. **Povirk LF, Shuker DE** (1994): *DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. Mutat Res Genet Toxicol*, **318**, 205-226.

43. **Santos HD, Cruz WS** (2001): *A terapia nutricional com vitaminas, antioxidantes e o tratamento quimioterapico oncolgico*. Rev Bras Cancerologia, **47**, 303-308.
44. **Sayed-Ahmed MM, Aldelemy ML, Al-Shabanah OA ve ark.** (2014): *Inhibition of gene expression of carnitine palmitoyltransferase I and heart fatty acid binding protein in cyclophosphamide and ifosfamide-induced acute cardiotoxic rat models*. Cardiovasc Toxicol, **14**(3), 232-242.
45. **Scheller S, Wilczok T, Imielski S ve ark.** (1990): *Free radical scavenging by ethanol extract of propolis*. Int J Radiat Biol, **57**(3): 461-465.
46. **Senkus E, Jassem J** (2011): *Cardiovascular effects of systemic cancer treatment*. Cancer Treat Rev, **37**, 300-311.
47. **Seven I, Aksu T, Seven PT** (2012): *The effects of propolis and vitamin C supplemented feed on performance, nutrient utilization and carcass characteristics in broilers exposed to lead*. Livestock Sci, **148**(1), 10-15.
48. **Shanmugarajan TS, Arunsundar M, Somasundaram I ve ark.** (2008): *Cardio protective effect of Ficus hispida Linn on cyclophosphamide provoked oxidative myocardial injury in a rat model*. Int J Pharmacol, **1**, 1-10.
49. **Simone CB, Simone NL, Simone V ve ark.** (2007): *Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2*. Altern Ther Health Med, **13**(2), 40-47.
50. **Slordal L, Spigset O** (2006): *Heart failure induced by non-cardiac drugs*. Drug Saf, **29**, 567-86.
51. **Souid AK, Tacka KA, Galvan KA ve ark.** (2003): *Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption*. Biochem Pharmacol, **66**, 977-987.
52. **Sun Y, Oberly LW, Ying LA** (1988): *Simple method for clinical assay of superoxide dismutase*. Clin Chem, **34**, 497-500.
53. **Swamy AV, Patel UM, Koti BC ve ark.** (2013): *Cardioprotective effect of Saraca indica against cyclophosphamide induced cardiotoxicity in rats: A biochemical, electrocardiographic and histopathological study*. Indian J Pharmacol, **45**(1), 44-48.
54. **Taniguchi I** (2005): *Clinical Significance of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity*. Intern Med, **44**, 89-90.
55. **Toreti VC, Sato HH, Pastore GM ve ark.** (2013): *Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Evid Based Complement Alternat Med*, **2013**, 1-13
56. **Tripathi DN, Jena GB** (2009): *Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice*. Chem Biol Interact., **180**, 398-406.
57. **Wang L, Albasi C, Faucet-Marquis V ve ark.** (2009): *Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane*. Water Res, **43**, 4115-4122.
58. **Yahalom J, Portlock CS** (2008): *Cardiac Toxicity*. In: Devita VT, Hellman TS and Rosenberg's SA (Eds). Cancer, Philadelphia 8th edition, Chapter 63, 2678-2688.
59. **Yılmaz S, Kaya E, Comaklı S** (2017): *Vitamin E,  $\alpha$  tocopherol, attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats*. Adv Clin Exp Med, **26**(6), 907-917.

Geliş tarihi: 18.10.2017 / Kabul tarihi : 04.06.2018

**Yazışma Adresi:**

Dr. Emre KAYA

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Telefon: 90-542 658 53 41

Fax: +904242388173

e-mail: emrekaya@firat.edu.tr