

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RATLARA DİETİLNİTROZAMİN VE
FENOBARBİTAL VERİLEREK
OLUŞTURULAN DENEYSEL KARACİĞER
HASARINA KARŞI OLEUROPEİN'İN
KORUYUCU ETKİSİ

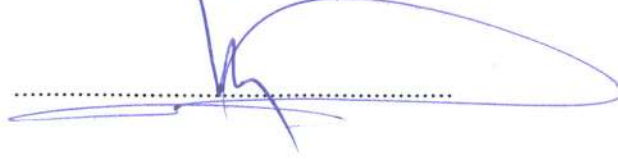
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEZİHE NUREFŞAN ÖZEREN

DANIŞMAN
Prof. Dr. P. SEMA TEMİZER OZAN

ELAZIĞ - 2018

ONAY SAYFASI



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. **Mustafa KAPLAN**
Müdür

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN

Prof. Dr. Nemi ÖZDEMİR

Prof. Dr. Filiz BENZER





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı : Nezihe Nurefşan ÖZEREN

Tarih : 24.07.2018

İmza :

Danışman: Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN

Biyokimya Anabilim Dalı

ELAZIĞ

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

Oturum Tarihi Oturum Sayısı

1 1.03.2016

1 1

Enstitümüz Yönetim Kurulu 1 1.03.2016 Cuma günü saat 09. ⁰⁰ da Müdür Prof. Dr. Mustafa KAPLAN'ın başkanlığında, aşağıda imzaları bulunan üyelerin katılmalarıyla toplanarak gündemdeki konuları görüşmüş ve aşağıdaki kararları almıştır.

11.01. Yüksek Lisans Öğrencisi Nezihe Nurefşan ÖZEREN'in Tez Konusu Önerisi;

Enstitümüz Veteriner Programı Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Nezihe Nurefşan ÖZEREN'in tez konusu önerisi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığının 01.03.2016 tarih ve 134156 sayılı yazısı ve Anabilim Dalı Kurul Kararı görüşüldü;

Veteriner Programı Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Nezihe Nurefşan ÖZEREN'in "Ratlara Dietilnitrozamin (DEN) ve Fenobarbital Verilerek Oluşturulan Deneysel Karaciğer Hasarına Karşı Oleuropein'in Koruyucu Etkisi" başlıklı tez konusu önerisinin kabulüne, oy birliği ile karar verildi.



MÜDÜR	Prof. Dr. Mustafa KAPLAN	İMZA	
Doç.Dr. Mete ÖZCAN	KATILAMADI	Prof.Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU	İMZA
Doç. Dr. Mustafa Issı	İMZA	Prof.Dr. Hasan Basri ERTAŞ	İMZA
Prof.Dr. Gaffari TÜRK	İMZA		

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. P. Sema Temizer OZAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gonca OZAN KACAMÜFTÜOĞLU'na, araştırma görevlisi M. Ali KISAÇAM'a ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim dalındaki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tıp Fakültesi ABD Bşk. Prof. Dr. Enver OZAN'a, araştırma görevlisi Nalan KAYA ve Tıp Fakültesi Histoloji Bölümüne teşekkürlerimi sunarım. Desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen eşim Yunus Emre ÖZEREN'e de teşekkür ederim.

Nezihe Nurefşan ÖZEREN

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR	xi
1.ÖZET.....	xiv
2. ABSTRACT.....	xviii
3. GİRİŞ	1
3.1. Kanserin Tanımı	1
3.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO).....	2
3.3. Serbest Radikaller.....	3
3.3.1. Malondialdehit (MDA).....	5
3.3.2. Katalaz (CAT).....	5
3.3.3. Glutasyon (GSH).....	6
3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)	6
3.4. Kansere Serbest Radikalin Etkisi	6
3.5. Dietilnitrozamin.....	7
3.6. Fenobarbital.....	8
3.7. Oleuropein	9
4. GEREÇ VE YÖNTEM	12

4.1. Gruplar.....	13
4.2. Biyokimyasal Analizler	14
4.2.1. Kanda ve Dokuda Malondialdehit (MDA) Tayini.....	14
4.2.2. Kan ve Dokularda Glutasyon (GSH) Tayini	16
4.2.3. Kan ve Dokuda Katalaz (CAT) Tayini:	17
4.2.4. Kan ve Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:.....	19
4.2.5. Dokuda Protein Tayini:.....	21
4.2.6. Hemoglobin (Hb) Düzey Tayini:	22
4.3. İstatistiksel Analizler	23
4.4. Histolojik Değerlendirmeler.....	23
5. BULGULAR	25
5.1. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	25
5.2. Karaciğer Dokusunda Katalaz (CAT) Düzeyleri	25
5.3. Karaciğer Dokusunda Glutasyon (GSH) Düzeyleri.....	27
5.4. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD)Düzeyleri	28
5.5. Kanda Malondialdehit (MDA) Düzeyi.....	29
5.6. Kanda Katalaz (CAT) Düzeyi	30
5.7. Kanda Glutasyon (GSH) Düzeyi	31
5.8. Kanda Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyi	32
5.9. Histolojik Değerlendirmeler.....	33
5.10. Tunel Analizi	37
6. TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Kanda ve Dokuda Malondialdehit (MDA) Düzeyi	15
Tablo 2: Kan ve Dokularda Glutasyon (GSH) Düzeyi.....	17
Tablo 3: Kan ve Dokuda Katalaz (CAT) Düzeyi.....	18
Tablo 4: Kan ve Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyi	20
Tablo 5: Dokuda Protein Düzeyi	21
Tablo 6: Hemoglobin (Hb) Düzeyi	22
Tablo 7: Histolojik Takip İşlem Basamakları	24
Tablo 8: Tüm Gruplarda Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri Değişimleri.....	25
Tablo 9: Tüm Gruplarda Karaciğer Katalaz Düzeyleri Değişimleri.....	26
Tablo 10: Tüm Gruplarda Karaciğer Glutasyon Düzeyleri Değişimleri	27
Tablo 11: Tüm Gruplarda Karaciğer Süperoksit Dismutaz Düzeyleri Değişimleri	28
Tablo 12: Tüm Gruplarda Kanda Malondialdehit Düzeyleri Değişimleri	29
Tablo 13: Tüm Gruplarda Kanda Katalaz Düzeyleri Değişimleri	30
Tablo 14: Tüm Gruplarda Kanda Glutasyon Düzeyleri Değişimleri	31
Tablo 15: Tüm Gruplarda Kanda Süperoksit Dismutaz Düzeyleri Değişimleri...	32
Tablo 16: Apoptotik indeks (%).....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Oleuropeinin kimyasal yapı formülü (Winkelhausen ve ark. 2005). (41)	10
Şekil 2: Gruplara Göre Karaciğer MDA Düzeyleri	25
Şekil 3: Gruplara Göre Karaciğer CAT Düzeyleri.....	26
Şekil 4: Gruplara Göre Karaciğer GSH Düzeyleri.....	27
Şekil 5: Gruplara Göre Karaciğer SOD Düzeyleri.....	28
Şekil 6: Gruplara Göre Kan MDA Düzeyleri	29
Şekil 7: Gruplara Göre Kan CAT Düzeyleri.....	30
Şekil 8: Gruplara Göre Kan GSH Düzeyleri.....	31
Şekil 9: Gruplara Göre Kan SOD Düzeyleri.....	32
Şekil 10: Kontrol grubu. Normal görünümlü hepatositler ve sinuzoidler. H&E x200.....	33
Şekil 11: DEN grubu. Sinuzoidal dilatasyon (yıldız) ve çift çekirdekli hepatositler (ok). H&E x200.....	34
Şekil 12: DEN grubu. İnflamatuar hücre artışı (ok) ve hafif konjesyon alanları (ok başı).....	34
Şekil 13: DEN + FB grubu. İnflamatuar hücre artışı (ok) ve konjesyon alanları (yıldız). H&E x200.....	35
Şekil 14: DEN + FB grubu. Sinuzoidal dilatasyon (yıldız) ve iri nükleuslu hepatositler (ok). H&E x200	35

Şekil 15: DEN + FB + OLE grubu. Konjesyon (yıldız) ve sinüzoidal dilatasyon (ok), inflamatuvar hücre artışı (kalın ok) ve çift çekirdekli hepatositler (ok başı). H&E x200	36
Şekil 16: OLE grubu. Sinüzoidal dilatasyon (yıldız), inflamatuvar hücre artışı (ok). H&E x200	36
Şekil 17: OLE grubu. Sinüzoidal dilatasyon (yıldız). H&E x200.....	37
Şekil 18: TUNEL pozitifliği (kahverengi boyanmış çekirdekler).....	39



KISALTMALAR

BBCE : Bovine Brain Capiller Endotel

Cu : Bakır

CuCl₂ : Bakır2 klorür

CAT : Katalaz

DEN : Dietilnitrozamin

dl : Desilitre

DTNB : 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoik asit

EDTA : Etilendiamin tetra asetik asit

FB : Fenobarbital

Fe : Demir

GSH : Glutasyon

GPx : Glutasyon peroksidaz

Gr : Gram

Hb : Hemoglobin

HL-60 : Promyelocyticleukemia

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

H₂O : Su

KCI	: Potasyum klorür
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO	: Lipit peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
mM	: Milimol
ml	: Mililitre
NBT	: Nitrobluetetrazolium
nmol	: Nanomol
nm	: Nanometre
Na₂HPO₄	: Di Sodyum Fosfat
OLE	: Oleuropein
OD	: Optik Dansite
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
PBMC	: Preiferal Blood Mononuclear Cells
ROS	: Serbest Radikal Türleri
rpm	: Revolution per minute, Dakikadaki devir sayısı
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbitürik Asit
UV	: Ultraviyole Işını, Mor Ötesi

Ü : Ünite

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

μmol : Mikromol



1.ÖZET

Ratlara Dietilnitrozamin ve Fenobarbital Verilerek Oluşturulan Deneysel Karaciğer Hasarına Karşı Oleuropein'in Koruyucu Etkisi

Kanser; belli bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz biçimde bölünerek bir kitle veya tümör oluşturması, tümörden ayrılan kanserli hücrelerin kan veya lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine ulaşip yeni tümör kolonileri meydana getirmesi ve tedavi edilmez ise ölümle sonuçlanan ciddi bir hastalıktır. Kansere genetik hassasiyetin yanında beslenmenin de etkisi büyüktür. Hava, su, toprak kirliliği ve bu şartlarda yetişen, işlem gören, depolanan ve tüketime sokulan bitkisel ve hayvansal gıdaların tüketilmesi de kansere neden olan çevresel etkenlerin başında sayılabilir.

Oldukça tanınmış karsinojenik bileşikler nitrozaminlerdir. Dietilnitrozamin (DEN) de hepatikkarsinomaya sebep olan bir nitrozamin bileşiğidir. DEN' in metabolitleri, DNA'ya bir ve ya iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör geliştiricilerinin bağlanmasına aracılık etmektedir.

Fenobarbital, generalize ve parsiyel epilepsilerin kontrolünde kullanılan genel merkezi sinir sistemi baskılayıcısı olarak bilinmektedir. Kanda yaklaşık %50 oranında proteinlere bağlı olarak dolaşır. Fenobarbital'in farmakokinetiğini belirgin şekilde etkileyen ilaç etkileşimleri daha az olduğu halde fenobarbital hepatik sitokromP450 enzim sistemini indükleyerek pek çok ilacın farmakokinetiği üzerine metabolizmalarını hızlandırıcı yönde etki yapmaktadır.

Oleuropein, zeytin meyvesi ve zeytin yaprağında önemli biyolojik özelliklere sahip fenolik maddelerce zengin bir bileşiktir. Besinlerde yer alan ve sağlığımız için olumlu etkileri bulunan bileşikler, fenolik bileşiklerdir. Oleuropein'in antimikrobiyal, antiviral ve antifungal etkilerinin olduğu, yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür. Oleuropein maddesi zeytin ağacı veya yaprağından elde edilen toksik özellikte olmayan, kansere engel olan bir etkiye sahiptir. Oleuropein, kanserli hücrelerin çevresini geri dönüşümsüz olarak sarar. Böylece çoğalmalarını, yayılmalarını ve başka bölgelere sıçramalarını engeller. Belirli bir miktarda ilaç halinde alımıyla da, ileri derecedeki kanserli hücrelerin kas liflerini bölerek çoğalmalarını önlemektedir.

Yapılan bu çalışmada, ratlara karsinogenik bir madde olan Dietilnitrozamin (DEN) ve Fenobarbital (FB) verilerek oluşturulacak karaciğer hasarına karşı Oleuropein' in herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmayacağının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 220±20gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 50 adet erkek rat denek olarak kullanılmıştır. Denekler; Kontrol Grubu, Dietilnitrozamin (DEN) grubu, Dietilnitrozamin (DEN) ve Fenobarbital (FB) Grubu, DEN+FB+Oleuropein(OLE) grubu ve Oleuropein(OLE) grubu olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlara ketamin 75 mg/kg+xylazine 10mg/kg intraperitoneal (ip) uygulanmış ve ratlar dekapite edilmiştir. 8 haftalık deney süresi sonunda dekapite edilen ratların kan ve karaciğer dokuları alınmıştır. Kan ve karaciğer dokularında Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon (GSH), protein ve kan dokuda da aynı parametrelerin tayinleri yapılmıştır. İstatistik metodları

kullanılarak gruplar arası farklılık olup olmayacağı saptanmıştır. Karaciğer ve kanda ki değişimler histolojik olarak da incelenmiştir.

Karaciğer MDA düzeyleri kıyaslandığında, tüm gruplarda kontrol grubuna göre artma olduğu gözlenmiştir. DEN+FB grubuyla kıyaslandığında DEN+FB+OLE grubunda anlamlı azalma saptanmıştır. Karaciğer CAT düzeyleri kıyaslandığında, OLE grubu DEN, DEN+FB ve DEN+FB+OLE gruplarına göre anlamlı azalma göstermiştir. Tüm gruplar arasındaki karaciğer GSH düzeyleri kıyaslandığında, DEN ve DEN+FB gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken, OLE ve DEN+FB+OLE grubunun kontrol grubu ile uyumlu olduğu görülmüştür. Karaciğer SOD düzeyleri kıyaslandığında ise gruplar arasında fark tespit edilememiştir.

Kan MDA düzeylerine bakıldığında, DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artma gözlenirken, OLE grubunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. DEN+FB+OLE grubunda ise değerler kontrol değerine yaklaşmış, DEN+FB grubuna kıyasla ise anlamlı bir düşüşe geçmiştir. Kan CAT düzeyleri kıyaslandığında OLE grubunda DEN+FB grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. DEN+FB+OLE grubunda da DEN+FB grubuna göre yine anlamlı bir artış görülmüştür. Tüm gruplar arasındaki kan GSH düzeyleri kıyaslandığında da OLE grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken, DEN ve DEN+FB gruplarında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. DEN+FB+OLE grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kan SOD düzeyleri kıyaslandığında ise DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. DEN+FB+OLE

ve OLE gruplarında SOD değerlerinin kontrol değerleri arasında bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak karaciğer karsinogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğunu ve hepatokarsinogenez ile lipid peroksidasyonu arasında ilişki olduğu söylenebilir. CAT, H₂O₂ 'i zararsız yan ürünlere dönüştürdüğü için hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynamaktadır.

Karaciğer hasar oluşumu sırasında bu dozlarda ve sürede Oleuropein uygulamasının rat kan ve karaciğer parametre düzeyleri üzerinde oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olabileceği düşünülebilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda oksidatif hasara karşı kullanılan Oleuropeinin farklı doz uygulamalarının yapılması ve en faydalı dozun tesbiti önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Dinitrozamin, Fenobarbital, Oleuropein, Karaciğer, Oksidatif Stres

2. ABSTRACT

The Protective Effects of Oleuropein on Diethylnitrosamine (DEN) and Phenobarbital (FB) induced Liver Damage in Rats

Cancer is the name given to a high mortality risk disease that some of the body's cells begin to divide without control and spread into vascular or lymphatic system than to the other sides of body. Genetic and environmental factors are effective on developing cancer. Exposure to factors such as air pollution water pollution or agricultural items are the first line etiologic factors.

Nitroamines are well known carcinogenic components. Diethylnitrosamine (DEN) is one of the nitroamines that cause hepatic carcinoma, metabolites of DEN helps the covalent binding of the tumor causes to electrons which take role in oxidation.

Phenobarbital is a nonselective central nervous system depressant which is primarily used in partial or generalized epilepsy. It circulates in the blood as 50% bound to proteins. Number of groups effected the pharmacokinetic of phenobarbital is less than the number of drugs are effected by the phenobarbital effects on cytochrome p450 system phenobarbital increases the metabolism rates of these group of drugs.

Oleuropein has important biological properties on olive fruit and its leaves. It has phenolic constituents which have positive effects on human health.

According to the recent studies it has shown that oleuropein has antimicrobial, antiviral and antifungal properties. Oleuropein is nontoxic anticancer substance found in olive itself and its leaves. Oleuropein surrounds the cancer cells irreversibly so prevents their invading and spreading around. In certain doses of oleuropein as medicine prevents mitosis of cancer cells.

The present study aimed to evaluate if oleuropein has a preventive effect on liver injury in rats which has been given diethylnitrosamine (DEN), phenobarbital (PB) In this study 50 Sprague-Dawley type male rats which are 220 ± 20 gr weight are used. They are divided into 5 groups as control group, diethylnitrosamine (DEN) group, diethylnitrosamine (DEN)+ phenobarbital (PB) group, diethylnitrosamine (DEN)+phenobarbital (PB)+oleuropein (OLE) group and oleuropein (OLE) group. At the end of the study all rats are given 75 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine intraperitoneally and they are decapitated. At the end of the 8 week of the study blood and liver samples of the decapitated rats are taken. In these samples malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione(GSH) levels are studied and histological changes are examined.

Although there was a significant difference among the groups in terms of liver GSH and MDA levels and CAT activities, there was no significant difference among the groups in SOD activity. There was a significant decrease in liver GSH levels in the DEN and DEN+PB groups compared to the control group while there was no statistically significant difference between the OLE, and DEN+PB+OLE groups and the control group. In terms of CAT activity of the liver, a significant decrease was observed in the OLE group compared to the DEN, DEN+PB,

DEN+PB+OLE groups. DEN+PB group liver MDA levels were significantly lower than DEN+PB+OLE group liver MDA levels. There was no difference among groups in terms of liver SOD levels.

The application of DEN separately and with PB, and OLE for treatment resulted in a statistically significant difference in blood MDA, GSH levels, and CAT, SOD activities. There was a statistically significant increase in blood MDA levels of the DEN+PB group compared to the control. OLE treatment caused a significant reduction in OLE group MDA levels compared to those of control, just as MDA levels of DEN+PB+OLE group compared to those of DEN+PB group. Blood CAT activity indicated a significant increase in the OLE group compared to the DEN+PB group. Moreover, it showed a significant increase in DEN+PB+OLE group compared to the those of DEN+PB group. Upon blood GSH levels were compared, there was no statistically significant difference between the DEN+PB+OLE group and the control group, while DEN and DEN+PB groups showed a significant decrease compared to the control group. GSH levels in the OLE group were significantly higher than those of control. There was no difference in the blood SOD levels of OLE and DEN+PB+OLE groups compared to the control whereas these levels significantly decreased in the DEN+PB group compared to the control group.

In conclusion we can say that oxidative stress has an important role on liver carcinogenesis and there is a relationship between hepatocarcinogenesis and lipid peroxidation. CAT has an important role on cell damage because of its function of translating H_2O_2 to harmless products.

It seems application of oleuropein in significant dosage and time period has protective effects against oxidative stress on rat blood and liver parameters, during liver damage period. But there is need for further studies about oleuropein for treatment options of damage.

Keywords: Diethylnitrosamine, Phenobarbital, Oleuropein, Liver Oxidative Stress



3. GİRİŞ

3.1. Kanserin Tanımı

Kanser; belli bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz biçimde bölünerek bir kitle veya tümör oluşturmaları, tümörden ayrılan kanserli hücrelerin kan veya lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine ulaşarak yeni tümör kolonilerine neden olması ve tedavi edilmez ise ölümlerle sonuçlanan ciddi bir hastalıktır (1,2,3). Bütün kanser çeşitlerinin ortak özelliği mutasyonların gen yapısını değiştirmesidir. Kanser çeşitlerinin hemen hemen hepsinde değişimler vücut hücrelerinde oluşur, bu değişimler üreme hücreleriyle nesilden nesillere aktarılmaz. Ancak, kanser vakalarının % 1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yakalanma riskini artırır. Kalıtsal mutasyonlar bazen kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için, homolog lokuslarda ilave somatik mutasyonlar gerekir. Hangi durumda olursa olsun, kanser hücre seviyesinde genetik bozukluk olarak kabul edilmektedir (4).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2005 yılında yeryüzündeki ölümlerin %13 ünün kanserden meydana geldiği açıklamıştır. Kanserde morbidite ve mortalitenin yüksek olması hastalığın önemini vurgulamaktadır (5). Kadınlarda sırasıyla meme, serviks, kolon/rektum akciğer ve mide kanserlerine daha çok rastlanırken

erkeklerde de akciğer, prostat, kolon/rektum, mide kanserlerine rastlanmaktadır (6). Kansere genetik hassasiyetin yanında beslenmenin de etkisi büyüktür. Kanser hastalığına yakalanmaya sebep olan bu etkenler hastalığın oluşmasında ve tedavi yöntemlerinde tartışmalara yol açmaktadır (7). Hava, su, toprak kirliliği ve bu şartlarda yetişen, işlem gören, stoklanan ve tüketime sokulan bitkisel ve hayvansal gıdaların tüketilmeside kansere neden olan çevresel etkenlerin başında sayılabilir. Tütün, alkol kullanım alışkanlıkları da bu grup içerisinde önemli bir yere sahip olduğu söylenmektedir. Kanser; hastanın yaşına, cinsiyetine, türüne ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermekle birlikte, insidans hızı toplumda yüz bin de 85 ile 350 arasında değişen bir hastalık olduğu düşünülmektedir (7).

3.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının verilerine göre, 2012 yılında 14.1 milyon kişi kansere yakalanmış ve 8,2 milyon kişi hastalıktan yaşamını kaybettiğini bildirmiştir (8). 2008 yılında kansere yakalanan kişi sayısı 12,7 milyon ve kanserden hayatını kaybedenlerin sayısı ise 7.6 milyon olduğu görülmüştür. Dünyada en az 15 yaşında olupta kanser hastalığına yakalanan ve beş yıl tedavi gören 32,6 milyon insan bulunmaktadır. Akciğer kanseri (1.8 milyon, toplamın %13'ü) dünyada en sık görülen kanser türüdür. Bunu takip eden diğer kanser türleri ise meme kanseri (1.7milyon, %11,9) ve kalın bağırsak kanseri(1.4milyon, %9,7)dir. Ölümle sonuçlanan en çok kanser türleri ise akciğer (1,6 milyon, toplamın %19,4ü), karaciğer (0,8 milyon, %9,1) ve mide (0,7 milyon %8,8) kanserleri olarak sıralanmıştır. Verilerden elde edilen analize göre, 2025 yılına kadar yıllık ortalama 19,3 milyon kişinin kansere

yakalanacağı öngörülmektedir. Artışın, daha çok yaşlanmadan ve nüfus artışından kaynaklanacağı belirtilmektedir. 2012 yılında tüm kanser türlerinin yarısından fazlasının (%56.8) ve kanser kaynaklı ölümlerin (%64.9) az gelişmiş ülkelerde görüldüğü ve bu oranların 2025 yılına kadar artarak devam edeceği hesaplanmaktadır (8). Dünyadaki kanser ölümlerinde üçüncü sırada yer alan ve son on yılda gittikçe artan görünme sıklığına sahip en yaygın kanser türü Hepatosellüler Karsinom olduğu söylenmektedir (9). Dünya genelinde yılda 1 milyona yakın insanın ölümüne neden olan hepatosellüler karsinom, karaciğerin en sık rastlanan primer malign tümörüdür ve en sık görülen beşinci kanser türüdür (10,11).

3.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, ömürleri kısa, kararsız, düşük molekül ağırlıklı, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikal üretimi çoğu olayda, pato-mekanizmanın bir parçasıdır ve serbest radikal üretimi pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi ile ilgilidir. Mesleki nedenlerle uzun süre kurşun ve kadmiyum gibi ağır metallere maruz kalmalar oksidatif strese sebep olabilir ki bu, yaşamsal sistemlerdeki istenmeyen olayların altında yatan bir mekanizmadır (12, 13). Vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanabilir.

Serbest radikaller süperoksit, nitrik oksit, lipid peroksit ve hidroksil radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptirler (14). Oksijenden oluşan

radikaller, biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna ($O_2^{\cdot-}$) flavoproteinlerin etkisiyle ve bazı demir-kükürt bulunduran yükseltgenme-indirgenme enzimleri ile indirgenmektedir. Oldukça etkili olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) çevrilir. Bunu bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Süperoksit grubuna göre etkinliği daha zayıf olan H_2O_2 , dokularda yer alan CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleriyle daha zayıf etkili olan su ve oksijene dönüştürülerek etkisiz kılınmaktadır.

Dietilditiyokarbamat gibi maddeler, SOD etkinliğini sınırlar ve süperoksit gruplarının etkisiz hale getirilmesini engellerken, lipid peroksidasyonu (LPO) hızlandırır. Ayrıca CAT'ın etkinliğini engelleyen maddeler (amino triazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı arttırmaktadırlar (15,16). Singlet oksijeni, süperoksit grupları hızlı bir şekilde oluşturur ve hücre zarlarının gliserid, glikolipid, fosfolipid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek aldehitler, alkoller, peroksitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (17, 18). MDA, LPO'nun en önemli ürünüdür. MDA, en az üç çift bağ bulunduran yağ asitlerinin peroksidasyonundan oluşur. Hücre membranlarından iyon alış-verişini sağlayan MDA, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına sebep olur. Bunun sonucunda enzim aktivitesinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara yol açabilir. MDA bu özelliğinden dolayı DNA'nın nitrojen bazları ile tepkimeye girer ve bu yüzden mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktirler (19, 20, 21, 22).

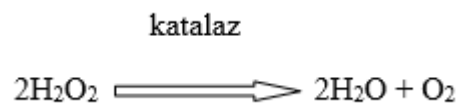
3.3.1. Malondialdehit (MDA)

MDA, serbest radikallerin olumsuz etkileri sonucu membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile meydana gelmektedir. Oksidatif hasarın, sistematik dolaşımda seviyesi belirlenebilen dolaylı bir göstergesidir ve oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılır (23). Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, doku reaksiyon zincir hızının ve serbest radikal türlerinin (ROS) seviyesinin belirlenmesinde önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksid parçalanması sonucu plazma MDA konsantrasyonu meydana gelir. MDA, proteinlerin amino gruplarını fosfolipidler veya nükleik asitlere bağlayarak toksik etkisini göstermektedir (24).

3.3.2. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi her aerobik hücrede bulunur. CAT; %80 oranında peroksisomlarda, %20 oranında da sitozolde bulunur (25). H_2O_2 ; ksantin oksidaz, ürat oksidaz, D-aminoasit oksidazlar veya SOD un katalize ettiği reaksiyonlar sonucu oluşur.

Oluşan H_2O_2 katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile su, oksijen ve ara ürünlere dönüştürülür. Böylelikle hidroksil radikali oluşumu engellenmiş olur (26). Katalazın H_2O_2 'e affinitesi glutatyon peroksidaza göre daha fazladır (27).

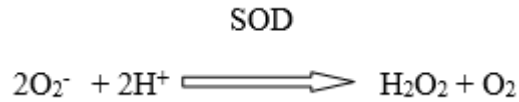


3.3.3. Glutasyon (GSH)

Hayvansal dokularda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan bir bileşiktir. GSH'ın nükleik asit sentezini içeren reaksiyonlara katılmak, hücre içi stabilizasyonu sağlamak, serbest radikalleri ve peroksitleri detoksifiye etmek gibi birçok önemli fonksiyonlara sahiptir (28). Ayrıca bazı enzimatik reaksiyonlarda da koenzim görevi görmektedir.

3.3.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)

McCord ve Fridovich'in 1968 'de keşfettiği bir enzim çeşitidir. SOD, vücudumuzda serbest radikallere karşı ilk savunmayı gerçekleştiren enzimdir. Daha zararlı olan hidroksil radikalının meydana gelmesini engellemek için O_2 radikalini metabolize eden enzim SOD'dur. O_2 radikalini H_2O_2 ye ve moleküler O_2 ye dönüşümünü gerçekleştirir. Tepkime ürünü olan H_2O_2 onu inhibisyona uğratmaktadır (29).



3.4. Kansere Serbest Radikalin Etkisi

Gelişen ve gelişmekte olan teknoloji, radyasyon, çevre kirliliği, tarım ilaçları, kontamine sular, zehirli maddeler ve canlı hücrelerdeki oksijen

metabolizması gibi birçok faktör vücudumuzda serbest radikallerin meydana gelmesine sebep olurlar.

Oksijenin oldukça reaktif formları olan serbest radikaller vücut hücrelerine zarar vermektedirler. Bu da kalp damar hastalıkları, kanser, karaciğer hasarı ve daha birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu gibi kötü hastalıkları yok edebilmek için önce vücut hücrelerini tahrip eden serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak, hastalığın ortaya çıkmasını engelleyebilmek gerekmektedir. Vücudumuzda bunu sağlayabilecek antioksidan savunma sistemi olsa dahi ortaya çıkan çevresel etmenler bu savunma direncini düşürmekte ve çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Serbest radikaller hücre yapısındaki lipitlere, nükleik asitlere, proteinlere, vücut hücrelerinin membranına ve DNA'ya zarar vererek koroner hastalıklara, karaciğer tahribatına ve kanser gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (30).

3.5. Dietilnitrozamin

Oldukça tanınmış olan karsinojen bileşikler nitrozaminlerdir. Hepatik karsinomaya neden olan bir nitrozamin bileşiğide Dietilnitrozamin (DEN) dir. DEN ile tümör oluşumu ve erken safhalarda gelişen serbest radikaller arasındaki klinik belirginlik dikkat çekicidir (31). DEN'in metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasını sağlarlar (32). Bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yapan DEN tümör promotörü, reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit

oluşumunu sağlar böylece süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşmiş olur.

Süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi, koruyucu antioksidan mekanizmanın azalmasını sağlarken yüksek oranda reaktif hidroksil radikalının oluşumunu gerçekleştirir. Bunun sonucunda DNA'nın yapısında deoksiriboz parçalanması ve kopmalar meydana gelir. Reaktif hidroksil radikalleri ayrıca, lipid membran yağ asitlerinin hidrojen atomlarını ayırır. Hidrojen atomları ile doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşen hidroperoksit radikalleri, lipid hidroperoksit düzenlenmesindeki zincir reaksiyonundan hidrojeni ayırır. Bunun sonucunda da süperoksit ve hidroperoksit radikalleri LPO 'nun artmasına neden olur. Böylece hücre membranında hasar artışı ortaya çıkmaktadır (33,34).

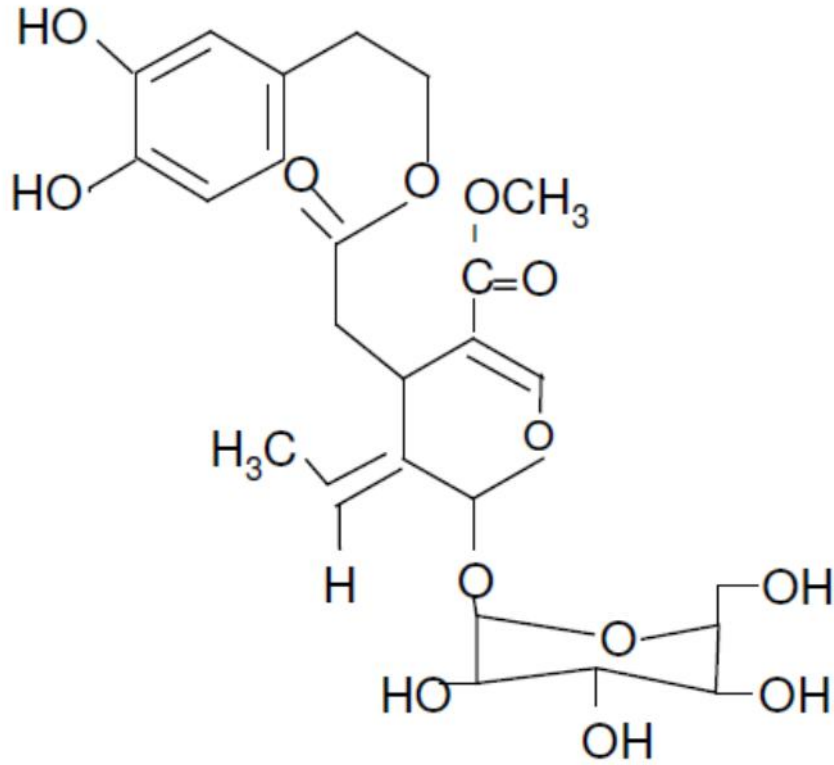
3.6. Fenobarbital

Fenobarbital, generalize ve parsiyel epilepsilerin kontrolünde kullanılan genel merkezi sinir sistemi baskılayıcısıdır. Kanda yaklaşık %50 oranında proteinlere bağlı olarak dolaşır. Plazma yarılanma ömrü 96 saat civarındadır. Fenobarbital'in farmakokinetiğini belirgin şekilde etkileyen ilaç etkileşimleri daha az olduğu halde fenobarbital hepatik sitokromP450 enzim sistemini indükleyerek pek çok ilacın farmakokinetiği üzerine metabolizmalarını hızlandırıcı yönde etki yapar (35). Promotör olarak fenobarbital (FB) kullanılan hepatosit hücrelerinin peroksizomlarında büyüme ve sayıca artış gözlenirken, peroksizomal yağ asit oksidasyonu ve mikrozomal hidroksilasyon aktivitesinde artışa neden olur.

Sonuçta DNA hasarı ve tümör oluşumu ortaya çıkar. Oluşan hasarın giderilmesinde, serbest radikallere karşı, savunma sistemindeki spesifik enzimler rol alır (36,37). DEN ve FB uygulanan sıçanlarla yapılan çalışmada karaciğer de, histolojik olarak; Preneoplastik fokus, nodüller ve hiper plastik kupffer hücrelerinin varlığı belirlenmiştir (36).

3.7. Oleuropein

Oleuropein, zeytin meyvesi ve zeytin yaprağında önemli biyolojik özelliklere sahip fenolik maddelerce zengin bir bileşiktir (38). Yapılmış olan çalışmalar, oleuropein'in antiviral, antifungal ve antimikrobiyal etkilerinin olduğunu göstermektedir. Inouye ve ark. 1970 yılında oleuropein'in kimyasal yapısını elenolik asit ve hidroksitriosolün heterozidik esteri olarak tanımlanmıştır (39). Besinlerde yer alan ve sağlığımız için olumlu etkileri bulunan bileşikler, fenolik bileşiklerdir. Bu fenolik bileşikler, yağ oluşumu esnasında yağa geçerek yağı oksidasyona karşı korurlar ve zeytinyağının lezzetini sağlarlar. Sağlığımız için sakıncalı olan oksidasyon ürünlerinin oluşmasını fenolik bileşikler önler. Oleuropein, reaktif oksijeni ve nitrojen türlerini uzaklaştırır (40,41).



Şekil 1: Oleuropeinin kimyasal yapı formülü (Winkelhausen ve ark. 2005). (39)

Akdeniz ülkelerinde yaşanan kalp damar hastalıkları ve kanser vakalarının giderek azaldığını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Oleuropein maddesi, zeytin ağacı veya yaprağından elde edilir ve toksik özellikte olmadığından kanseri önleyen bir etkiye sahiptir. Kanserli hücreleri geri dönüşümsüz olarak saran Oleuropein, bu hücrelerin çoğalmalarını, yayılmalarını ve başka yerlere sıçramalarını engellemektedir. Sınırlı miktarda ilaç şeklinde alımıyla da, ileri evredeki kanserli hücrelerin kas liflerini parçalayarak çoğalmalarını önlemektedir (42).

Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen deneylerde ekstraktın kullanılmasıyla kanser hücrelerinin 9-12 gün içerisinde gerilediği gözlenmiştir. Fenolik bileşikler,

E vitamininden daha güçlü antioksidan özelliğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde (LDL) düşük dansiteli lipoprotein kolesterolünün bakır sülfatla oksidasyonunu önemli derecede önlemektedirler. Böylelikle oksidasyona bağlı olarak gelişen periferik damar hastalıklarından, enfarktüs ve damar sertliğinden, koroner kalp hastalıklarından da korunma sağlamaktadırlar (43). 19.yüzyılın ortalarında zeytin yaprağının kullanılmasıyla elde edilen öz; şiddetli ve ölümcül hastalıklarda ateş düşürücü olarak kullanılmıştır. Bu özelliğinden ötürü sıtma hastalığından korunmak ve tedavi olmak amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir (44).

Biz de bu projede deneysel olarak oluşturacağımız karaciğer hasarına, ülkemizde oldukça bol yetişen zeytin ve yaprağından elde edilen Oleuropein 'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin olup olamayacağını açıklamaya çalışarak bilim alemine katkıda bulunmak istedik.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, 220±20gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 50 adet erkek rat kullanılmıştır. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık 12 saat karanlık foto periyodunda ve 22-24 derece sabit ısıdaki odalarda barındırılmıştır. Hayvanların beslenmesinde, standart pellet yemi ve çeşme suyu kullanılmıştır. Yem ve su tüketiminde kısıtlama yapılmamıştır.

Çalışmanın tüm aşamalarında 1983 Helsinki deklarasyonun da bildirilen ‘Hayvanlarda Bilimsel Çalışmalar için Etik Kurullar’a uyulmuştur. Denekler; Kontrol Grubu, Dietilnitrozamin (DEN) grubu, Dietilnitrozamin (DEN) ve Fenobarbital (FB) grubu, DEN+FB+Oleuropein(OLE) grubu ve Oleuropein(OLE) grubu olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Deney süresince tüm grupların su tüketimleri günlük olarak kaydedilmiştir, deneyin başlangıcında ve her haftanın sonunda vücut ağırlıkları belirlenmiştir, deney sonunda tüm gruplarda ki ratlara ketamin 75 mg/kg+xylazine 10mg/kg intraperitoneal (ip) uygulanmış ve ratlar dekapite edilmiştir. 8 haftalık deney sonrası dekapite olan ratların kan ve karaciğer dokuları alınmıştır. Dokular hızla çıkarılarak % 0,9 NaCl ile yıkanmıştır ve paketlenerek soğuk zincirde -80 derece derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklanmıştır. Kanlar EDTA içeren biyokimya tüplerine alınmıştır. Alınan kan örnekleri yarım saat içinde 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrılmıştır, ayrılan serumlar -20 derecede saklanarak çalışılmıştır. Kan ve karaciğer dokularında MDA, CAT, SOD, GSH, protein ve kan dokuda da

aynı parametreler tayini yapılmış ve istatistik metotları kullanılarak gruplar arası farklılık olup olmayacağı saptanmıştır.

Dekapitasyon sonrası eksize edilen karaciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonuna alınıp tespit edildikten sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlanmıştır. Bu bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alınarak histokimyasal, immuno histokimyasal boyamalar ve TUNEL analizi yapılmıştır.

4.1. Gruplar

Grup 1: Kontrol grubu (n=7): bu gruptaki ratlara 8 hafta standart beslenme ve içme suyu ad libitum olarak verilmiştir. Deney süresi sonrası anestezi altında dekapitasyon takiben alınan kan ve karaciğer örnekleri biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir.

Grup 2: Dietilnitrozamin (DEN) grubu (n=10): bu gruptaki ratlara tek doz 150mg/kg intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanmıştır (31). 8 hafta sonra dekapitasyonu takiben alınan örnekler biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir.

Grup 3: Dietilnitrozamin (DEN) ve Fenobarbital (FB) (n=10) grubu: Deney başlangıcında tek doz DEN 150mg/kg i.p. olarak uygulanmıştır. Uygulamadan 15 gün sonra 500 ppm FB içme suyuna katılarak 6 hafta uygulanmış (45) ve 8 inci hafta sonrada dekapitasyonu takiben alınan örnekleri

biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir. Ayrıca DEN tek doz 150mg/kg ve DEN verildikten 2 hafta sonra FB 500 ppm dozda içme suyuna 6 hafta süre ile katılmıştır. 8 hafta sonra dekapitasyonu takiben alınan örnekler biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir.

Grup 4: DEN+FB+Oleuropein (OLE) uygulanacak grup (n=10): OLE deneyin başlangıcından itibaren 8 hafta boyunca 10 mg/kg/gün dozda oral gavaj yolu ile uygulanmıştır (46).

Grup 5: Oleuropein(OLE) grubu (n=7): 10mg/kg/gün dozda OLE oral gavaj yolu ile 8 hafta boyunca uygulanmıştır (46). 8 hafta sonra dekapitasyonu takiben alınan örnekleri biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmiştir.

4.2. Biyokimyasal Analizler

4.2.1. Kanda ve Dokuda Malondialdehit (MDA) Tayini

Kan Örneklerinin Hazırlanması: LPO tayini için alınan heparinli kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları alınır.

Doku Örneklerinin Hazırlanması: Süzgeç kağıtları arasında dokuların suyu alındıktan sonra tartılarak %11.15 lik KCI içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, CAT, SOD, GSH ve protein tayini yapılır.

Prensip: MDA tayini Placer ve ark. tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in tepkime esasına dayanmaktadır. MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan MDA karışımı absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunur ve lipid peroksidasyonun derecesi saptanmış olur (47).

Deneyin Yapılışı:

Tablo 1: Kanda ve Dokuda Malondialdehit (MDA) Düzeyi

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0,25
Standart	-	0,25	-
Serum fizyolojik	0,25	-	-
Renk ayırıcı	2,25	2,25	2,25

Tüpler karıştırıldıktan sonra 100 derecede 20 dk bekletilir. Musluk suyu altında soğutma işleminden sonra tüpler 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okunur.

Kanda ve dokuda MDA düzeyinin hesaplanması:

$$MDA = (\text{Örneğin Absorbansı} / \text{Standartın Absorbansı}) \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

Plazmadaki MDA düzeyi nmol/ml, dokudaki MDA düzeyi nmol/g doku olarak hesaplanır.

4.2.2. Kan ve Dokularda Glutasyon (GSH) Tayini

Kan Örneklerinin Hazırlanması: Tam kanın saf su ile 1:10 oranında sulandırılması ile elde edilen hemolizatlarda hemoglobin tayini yapılır, dilüe edilen kanın 1:2.5 oranında çöktürücü solüsyonuyla sulandırılması ile elde edilmiş hemolizatlarda ise GSH tayini yapılır.

Doku örneklerinin alınması, hazırlanması ve homojenizasyon: Süzgeç kağıtları arasında dokuların suyu alındıktan sonra tartılarak %11.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, CAT, SOD, GSH ve protein tayini yapılır.

Prensip: GSH düzey tayini için Chavan ve ark.'nın yöntemine göre tayin edilir. Bu metod 5,5'dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) eklendiğinde sülfidril gruplarının epeyce stabil sarı renk oluşturması esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (48).

Deneyin Yapılışı: Deney esnasında hemolizat üzerine çöktürücü solüsyondan 3 ml konulup, vortekslenir ve 5 dk sonra filtre kağıdından süzülür. Elde edilen süzüntü deney ortamında kullanılır.

Tablo 2: Kan ve Dokularda Glutasyon (GSH) Düzeyi

	Kör (ml)	Örnek (ml)	Standart (ml)
Süzüntü	-	2	-
Standart	-	-	2
Çöktürücü	1.2	-	-
Distile su	0.8	-	-
Na ₂ HPO ₄	8	8	8
DTNB	1	1	1

Deney tüpleri tablo 2’deki gibi hazırlandıktan sonra vortekslenir ve 412 nm’ de okunur.

Kanda ve dokuda glutasyon aktivitesinin hesabı:

$$\text{GSH mg/dl} = \frac{(\text{standartın konsant.}) \times (\text{örneğin OD}) \times (\text{sulandırma katsayısı})}{(\text{standartın OD (optik dansite)})}$$

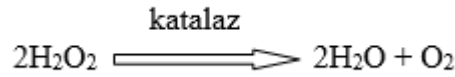
mg/dl olan GSH değerleri μmol ’e çevrilip, sonuçlar kanda GSH $\mu\text{mol/g}$ Hb, dokuda ise GSH $\mu\text{mol/g}$ protein olarak verilir.

4.2.3. Kan ve Dokuda Katalaz (CAT) Tayini:

Kan Örneklerinin Hazırlanması: Plazması ayrılan heparinli kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra eritositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak hemoglobin tayini yapılır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında fosfat tamponuyla (50 mM, pH:7,0) tekrar sulandırılır ve hazırlanmış bu hemolizatlar da katalaz aktivite düzeyleri ölçülür.

Doku Örneklerinin Hazırlanması: Süzgeç kağıtları arasında dokuların suyu alındıktan sonra tartılarak %11.15 lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, CAT, SOD, GSH ve protein tayini yapılır. Eritrosit ve doku katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi metodu kullanılır (49).

Prensip: CAT aşağıdaki tepkimeye göre H_2O_2 ’nin yıkımını katalize eder.



H_2O_2 ’in katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 ’in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 3: Kan ve Dokuda Katalaz (CAT) Düzeyi

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat tamponu	1	-
Hidrojen peroksit	-	1
Hemolizat	2	2

240 nm’de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra örneğin 0.(A1) ve 30. (A2) saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle katalaz aktivitesi hesaplanır.

Kan ve doku CAT aktivitesinin hesaplanması:

$$k = (2.3 / 30) \times (\log A1 / A2) \times \text{dilüsyon}$$

Eritrosit için spesifik aktivite: k / g Hb

Doku için spesifik aktivite: k / g protein

4.2.4. Kan ve Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:

Kan örneklerinin hazırlanması: Plazması ayrılan heparinli kan örnekleri, serum fizyolojik ile 3 kez yıkandıktan sonra, eritrositler 1: 5 oranında deiyonize su ile sulandırılarak hemogloblin tayini yapılır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1: 2 oranında kloroform/etanol solüsyonu (3/5 V/V) ile tekrar dilüe edilerek SOD aktivite tayini yapılır.

Doku Örneklerinin Hazırlanması : Süzgeç kağıtları arasında dokuların suyu alındıktan sonra tartılarak %11.15 lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılıp, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilir, 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, CAT, SOD, GSH ve protein tayini yapılır.

Prensip: SOD tayin ölçümü ksantin-ksantin oksidaz yöntemi ile oluşan süperoksit radikalinin nitrobluetetrazolium’u (NBT) indirgemesi sonucu renk oluşumu esasına dayanır ve bu indirgeme olayı 560 nm’ de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlandırılır.

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksite çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve

renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonu 560 nm’ de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir (50).

Deneyin Yapılışı: 1/5 oranında dilüe edilmiş eritrosit hemolizatu eşit hacimde kloroform/etanol (3/5 V/V) ile karıştırılır ve 3000 rpm’de 20 dk santrifüj edilir. En üstteki berrak kısım SOD aktivite tayininde kullanılmak üzere ayrılır.

Tablo 4: Kan ve Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyi

	Kr (ml)	rnek (ml)
Reaksiyon zeltisi	2,85	2,85
Süpernatant	-	0,10
Distile su	0,10	-
Ksantinoksidaz	0,05	0,05

Kr ve örnek tüpleri 25 derecede 20 dk süreyle inkübe edilir. Srenin sonunda her iki tüpe de 1,0 ml CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durdurulur. Distile suya karşı kr ve numunenin absorbanlarının lm spetrofotometrede 560 nm’ de okunur.

Kanda ve dokuda SOD aktivitesinin hesabı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{absorbans (kr)} - \text{absorbans (rnek)})}{\text{Absorban (kr)}} * 100$$

1nite SOD: %50’lik NBT inhibisyonunu meydana getiren enzim miktarıdır.

$$\ddot{U}/\text{ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{\%50 \text{ inhibisyon}}$$

Gram hemoglobin veya protein başına SOD aktivitesi, spesifik aktiviteyi verir ve kanda SOD U/g Hb, dokuda U/g protein olarak hesaplanır.

4.2.5. Dokuda Protein Tayini:

Prensip: Homojenatlardaki protein miktarı modifiye edilmiş Lowry yöntemine göre ölçülmüştür. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom Cu bağlar. Fenol ayırıcı, Cu ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk şiddeti 650 nm dalga boyunda okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapılmıştır (51).

Deneyin Yapılışı:

Tablo 5: Dokuda Protein Düzeyi

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek(ml)
Alkali bakır ayırıcı	1	1	1
Örnek	-	-	1
Distile su	1	-	-
Standart	- Tüpler iyice	1 karıştırılır ve 10dk oda	- Isısında bekletilir.
Fenol ayırıcı	4	4	4

Fenol ayracı ilave edildikten sonra; tüpler hemen vortekste iyice karıştırılmış ve 5 dk 55°C 'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulmuştur. Daha sonra 650nm de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunmuştur.

Protein Düzeyinin Hesaplanması:

Protein (µg/ml) = (Örneğin OD /Standartın OD) x Standartın konsantrasyonu x Dilüsyon

4.2.6. Hemoglobin (Hb) Düzey Tayini:

Prensip: Hb tayini siyanomethemoglobin yöntemi ile yapılmıştır. Ferrisiyanür hemoglobindeki Fe⁺² yi oksitleyerek +2 değerden +3 değerli Fe'e çevirir ve Fe'nin methemoglobine dönüşmesini sağlamaktadır. Daha sonra potasyum siyanid ilavesi ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin meydana gelmektedir. Siyanomethemoglobin absorbansı ise 546nm'de okunmuştur (52).

Deneyin Yapılışı:

Tablo 6: **Hemoglobin (Hb) Düzeyi**

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Drapkin çözeltisi	5	5	5
Hb standartı	-	0,02	-
Hemolizat	-	-	0,02

Tüpler iyice karıştırılıp oda ısısında 20 dk bekletilmiş ve 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbansları okunmuştur.

Hb Düzeyinin Hesaplanması:

$$\text{Hb (g/dl)} = (\text{Örneğin OD} / \text{Standartın OD}) \times 18$$

4.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda istatistiksel analizler için ‘SPSS 15.0 istatistik paket programı’ kullanılmış ve ANOVA testi uygulanmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemler; ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır.

4.4. Histolojik Değerlendirmeler

Karaciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilerek ve daha sonrada akan musluk suyu altında yıkanmıştır. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 7) geçirilerek dehidratasyona tabi tutulmuştur. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklardan yaklaşık 5-6 µm kalınlığında kesitler rodajlı lamlara alınmış ve hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası ile boyanmıştır. Işık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenip fotoğraflanmıştır.

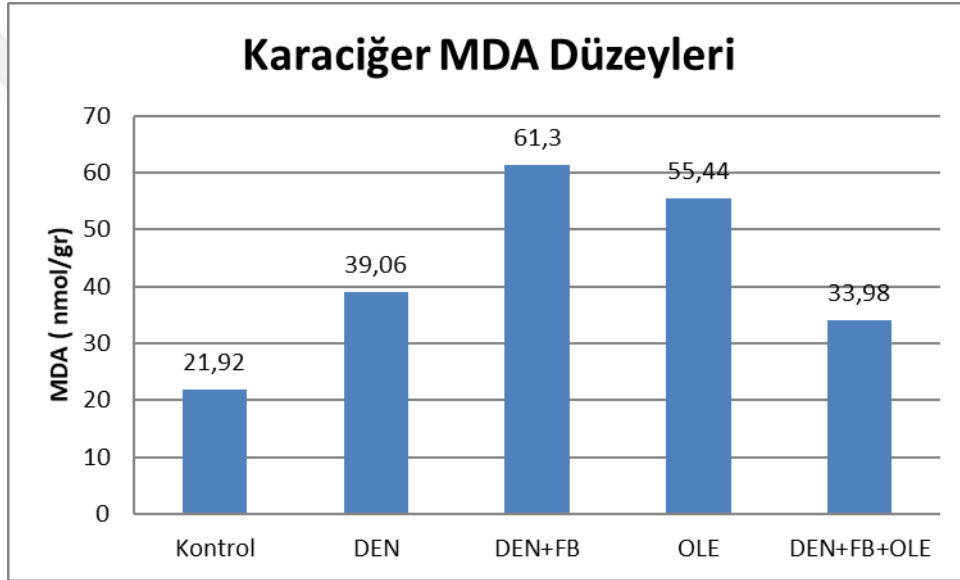
Tablo 7: Histolojik Takip İşlem Basamakları

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol	30 dakika
4	% 96 Alkol	30 dakika
5	% 100 Alkol	30 dakika
6	% 100 Alkol	30 dakika
7	Alkol + Ksilol	15 dakika
8	Ksilol I	10 dakika
9	Ksilol II	20 dakika
10	Yumuşak parafin + Ksilol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

5. BULGULAR

5.1. Karaciğer Dokusunda Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Tüm gruplar arasındaki karaciğer MDA ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 8 ve Şekil 2’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre MDA düzeyleri kıyaslandığında, tüm gruplarda kontrol grubuna göre artma olduğu saptanmıştır. DEN+FB grubuyla kıyaslandığında DEN+FB+OLE grubunda anlamlı bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.



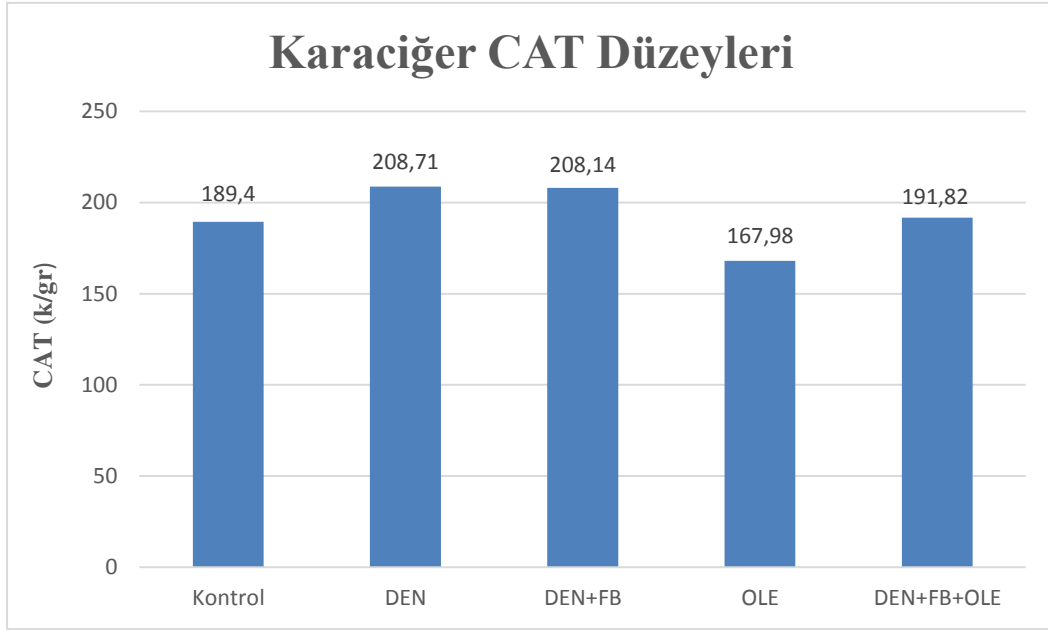
Şekil 2: Gruplara Göre Karaciğer MDA Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
MDA(nmol/g)	21,92±0,93 ^c	39,06±3,25 ^b	61,30±3,95 ^a	55,44±4,87 ^a	33,98±3,26 ^{b,c}	0,000

Tablo 8: Tüm Gruplarda Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri Değişimleri

5.2. Karaciğer Dokusunda Katalaz (CAT) Düzeyleri

Tüm gruplar arasındaki karaciğer CAT ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 9 ve Şekil 3’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre CAT düzeyleri kıyaslandığında, OLE grubunda DEN, DEN+FB ve DEN+FB+OLE gruplarına göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.



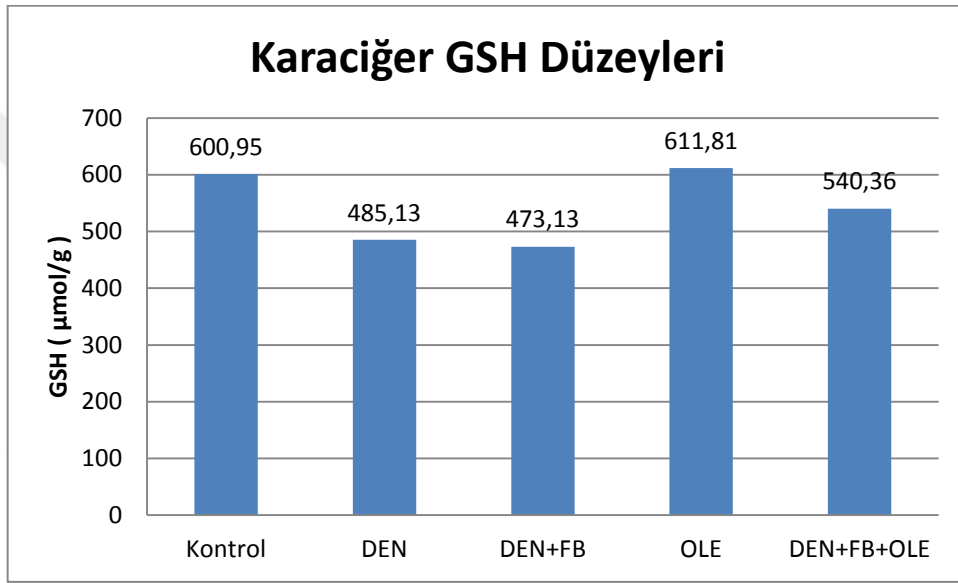
Şekil 3 Gruplara Göre Karaciğer CAT Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
CAT(k / g protein)	189,40±8,82 ^{a,b}	208,71±5,59 ^a	208,14±3,20 ^a	167,98±3,09 ^b	191,82±5,27 ^a	0,001

Tablo 9: Tüm Gruplarda Karaciğer Katalaz Düzeyleri Değişimleri

5.3. Karaciğer Dokusunda Glutasyon (GSH) Düzeyleri

Tüm gruplar arasındaki karaciğer GSH ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 10 ve Şekil 4’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre GSH düzeyleri kıyaslandığında, DEN ve DEN+FB gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken, OLE ve DEN+FB+OLE grubu kontrol grubu ile uyumludur.



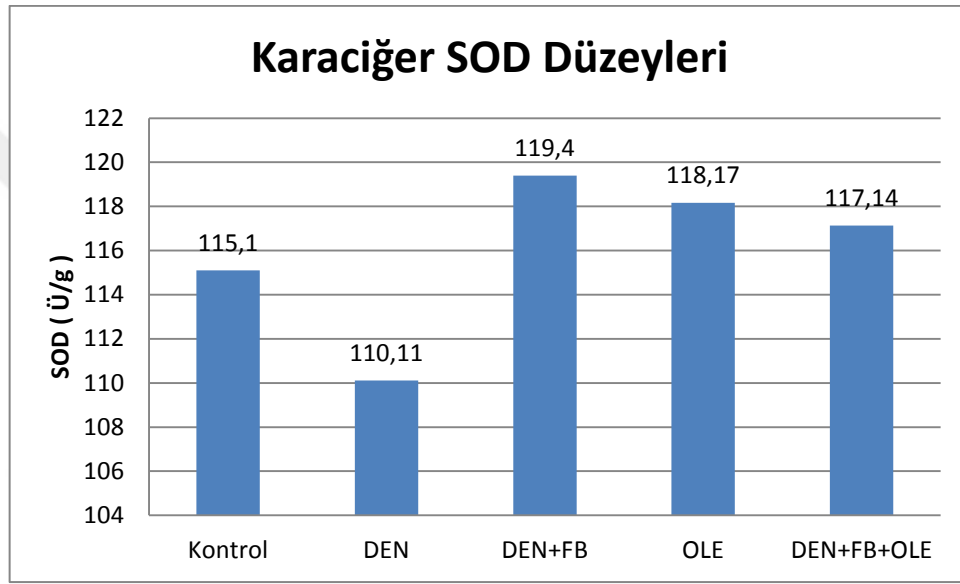
Şekil 4 Gruplara Göre Karaciğer GSH Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
GSH(µmol/g protein)	600,95±17,44 ^a	485,13±36,22 ^b	473,13±13,41 ^b	611,81±27,57 ^a	540,36±14,70 ^{ab}	0,001

Tablo 10: Tüm Gruplarda Karaciğer Glutasyon Düzeyleri Değişimleri

5.4. Karaciğer Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD)Düzeyleri

Tüm gruplar arasındaki karaciğer SOD ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 11 ve Şekil 5’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre SOD düzeyleri kıyaslandığında gruplar arasında fark saptanamamıştır.



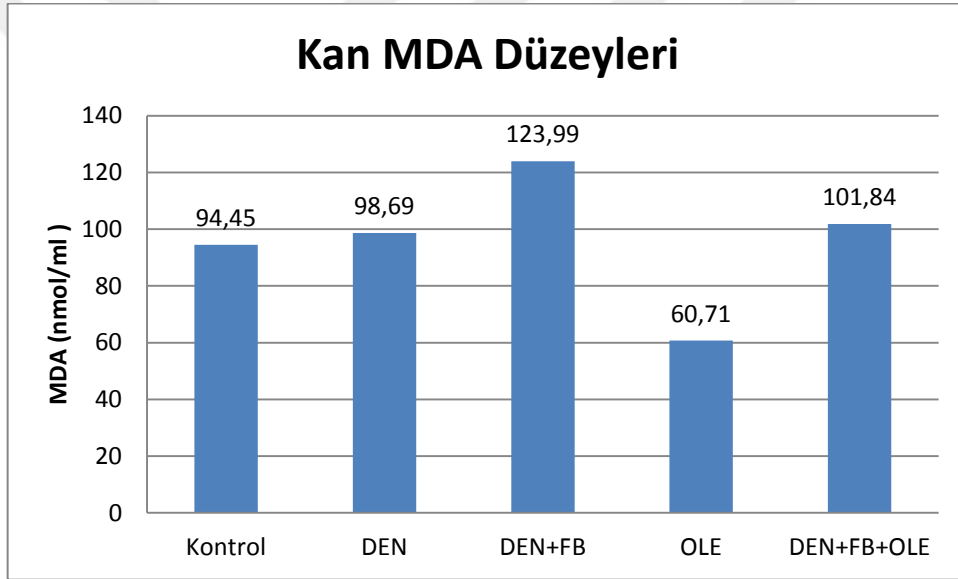
Şekil 5 Gruplara Göre Karaciğer SOD Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
SOD(Ü/g protein	115,10±3,48	110,11±3,91	119,40±3,74	118,17±4,13	117,14±4,98	0,397

Tablo 11: Tüm Gruplarda Karaciğer Süperoksit Dismutaz Düzeyleri Değişimleri

5.5. Kanda Malondialdehit (MDA) Düzeyi

Tüm gruplar arasındaki MDA ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 12 ve Şekil 6’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre kanda ki MDA düzeyleri kıyaslandığında, DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artma gözlenirken, OLE grubunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. DEN+FB+OLE grubunda değerler kontrol değerine yaklaştı, DEN+FB grubuna kıyasla ise anlamlı bir düşüş vardır.



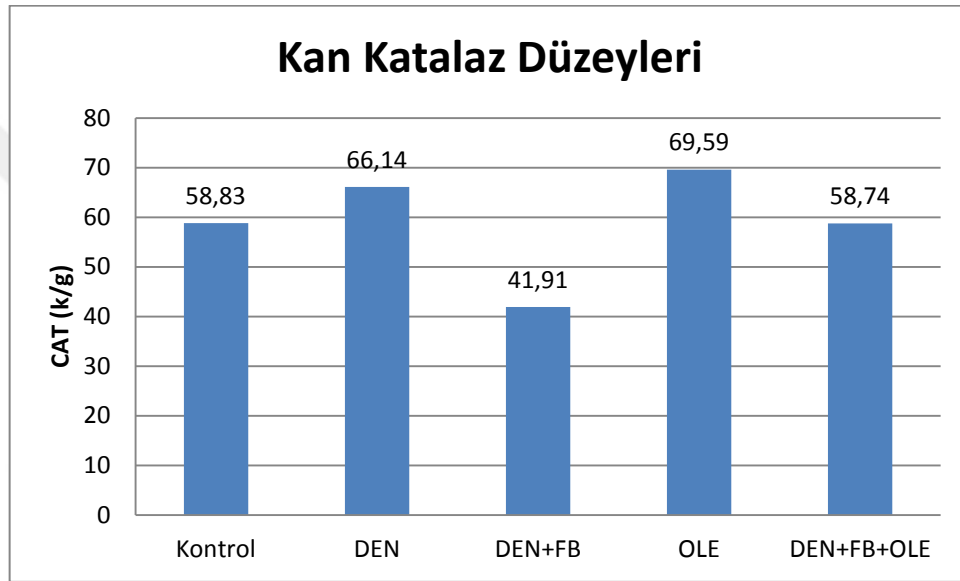
Şekil 6 Gruplara Göre Kan MDA Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
MDA(nmol/ml)	94,45±4,69 ^b	98,69±6,35 ^b	123,99±6,16 ^a	60,71±2,63 ^c	101,84±2,17 ^b	0,000

Tablo 12: Tüm Gruplarda Kanda Malondialdehit Düzeyleri Değişimleri

5.6. Kanda Katalaz (CAT) Düzeyi

Tüm gruplar arasındaki CAT ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 13 ve Şekil 7’da verilmiştir. Bu ortalamalara göre kanda ki CAT düzeyleri kıyaslandığında OLE grubunda DEN+FB grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. DEN+FB+OLE grubunda da DEN+FB grubuna göre yine anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.



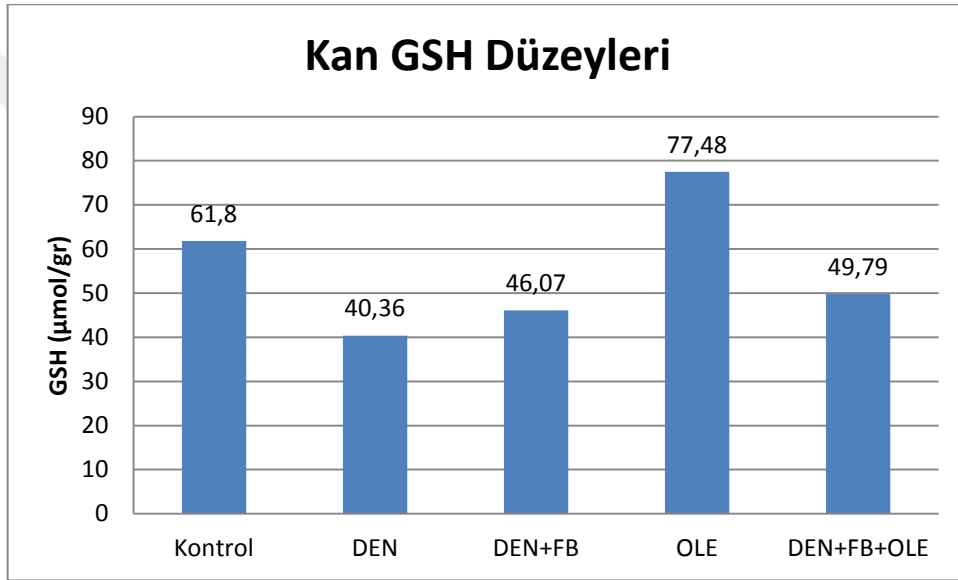
Şekil 7 Gruplara Göre Kan CAT Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
CAT(k/g Hb)	58,83±2,69 ^a	66,14±3,91 ^a	41,91±3,21 ^b	69,59±1,62 ^a	58,74±3,71 ^a	0,001

Tablo 13: Tüm Gruplarda Kanda Katalaz Düzeyleri Değişimleri

5.7. Kanda Glutasyon (GSH) Düzeyi

Tüm gruplar arasındaki GSH ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 14 ve Şekil 8’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre kanda ki GSH düzeyleri kıyaslandığında OLE grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken, DEN ve DEN+FB gruplarında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. DEN+FB+OLE grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.



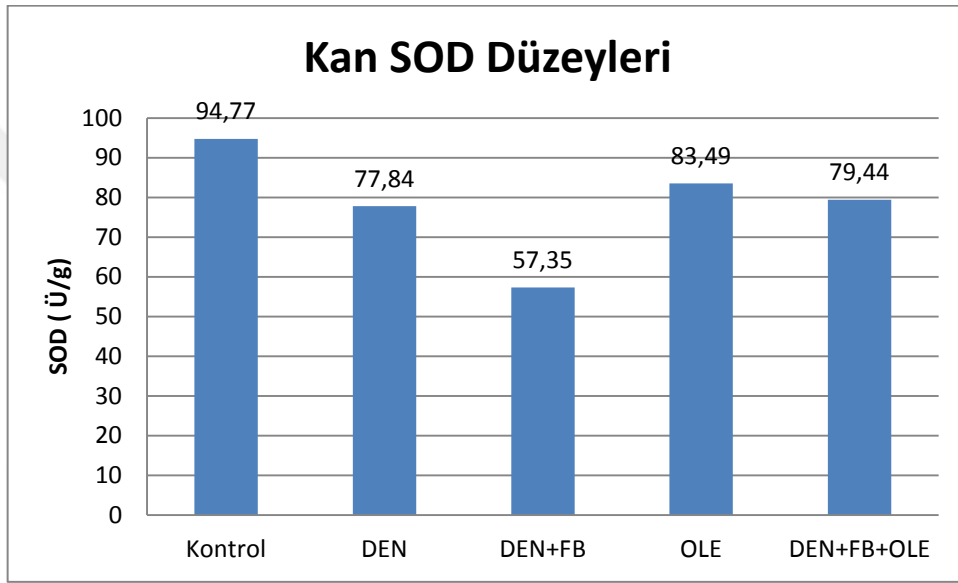
Şekil 8 Gruplara Göre Kan GSH Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
GSH(µmol/gHb)	61,80±4,21 ^b	40,36±3,16 ^c	46,07±2,50 ^c	77,48±3,75 ^a	49,79±2,53 ^{b,c}	0,000

Tablo 14: Tüm Gruplarda Kanda Glutasyon Düzeyleri Değişimleri

5.8. Kanda Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeyi

Tüm gruplar arasındaki SOD ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 15 ve Şekil 9’de verilmiştir. Bu ortalamalara göre kanda ki SOD düzeyleri kıyaslandığında DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. DEN+FB+OLE ve OLE gruplarında SOD değerlerinin kontrol değerleri arasında bir fark bulunamamıştır.



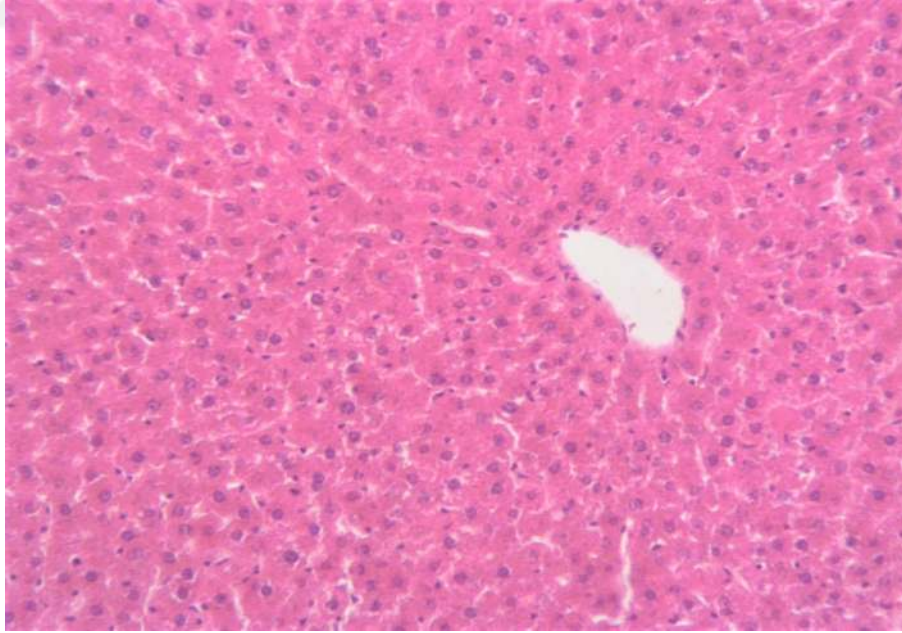
Şekil 9 Gruplara Göre Kan SOD Düzeyleri

Gruplar	Kontrol	DEN	DEN+FB	OLE	DEN+FB+OLE	P
SOD(Ü/gHb)	94,77±11,97 ^a	77,84±6,91 ^{a,b}	57,35±4,02 ^b	83,49±9,50 ^{a,b}	79,44±6,71 ^{a,b}	0,038

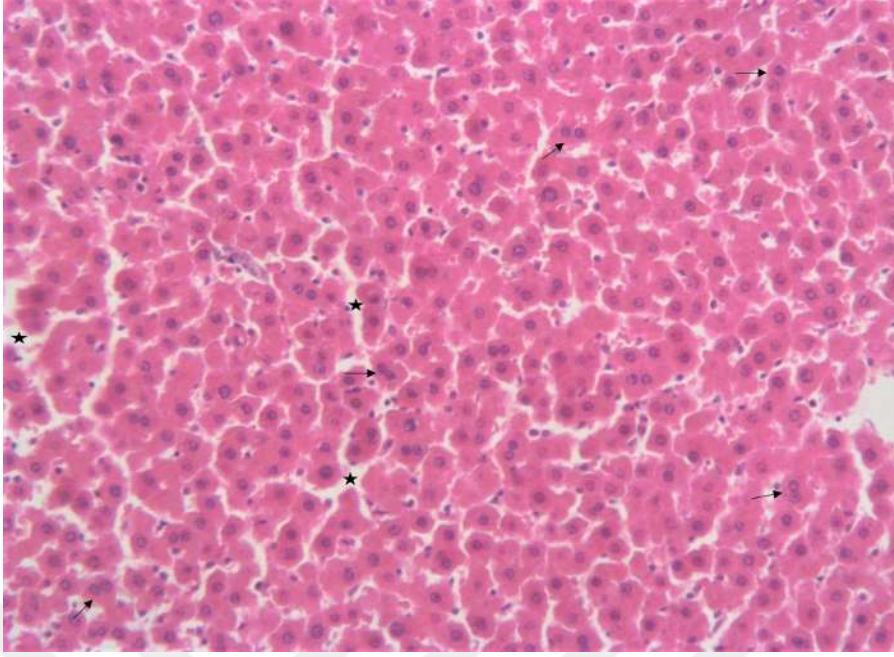
Tablo 15: Tüm Gruplarda Kanda Süperoksit Dismutaz Düzeyleri Değişimleri

5.9. Histolojik Değerlendirmeler

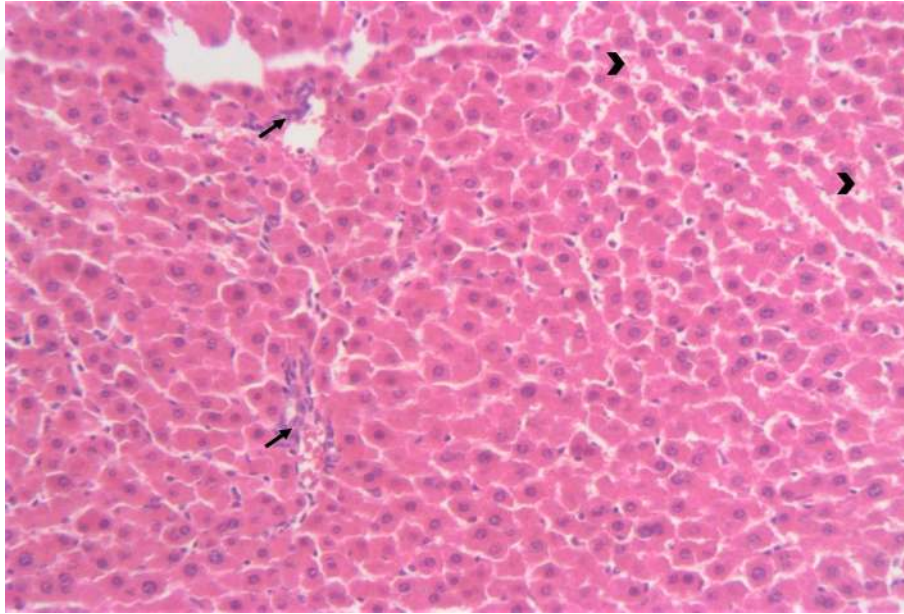
Kontrol grubuna ait ratların karaciğer dokuları incelendiğinde hepatositler ve sinuzoidler normal yapıda izlenmiştir (Şekil 10). DEN grubuna ait kesitlerde çift çekirdekli hepatosit sayısında artış, hafif konjesyon, periportal alanda inflamatuvar hücre artışı ve sinüzoidal dilatasyon tespit edilmiştir (Şekil 11). DEN+ FB grubuna ait kesitlerde ise DEN grubu ile kıyaslandığında tüm histopatolojik bulgulara artış ve iri nükleuslu hepatositler gözlenmiştir (Şekil 12). DEN+ FB+ OLE grubunda dilatasyonda azalma gözlenirken diğer histopatolojik değişiklikler açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 13). Yalnızca OLE uygulanan grupta ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sinüzoidal dilatasyonun yaygın olduğu bunun yanı sıra peripotal alanlarda inflamatuvar hücre artışı gözlenmiştir (Şekil 14).



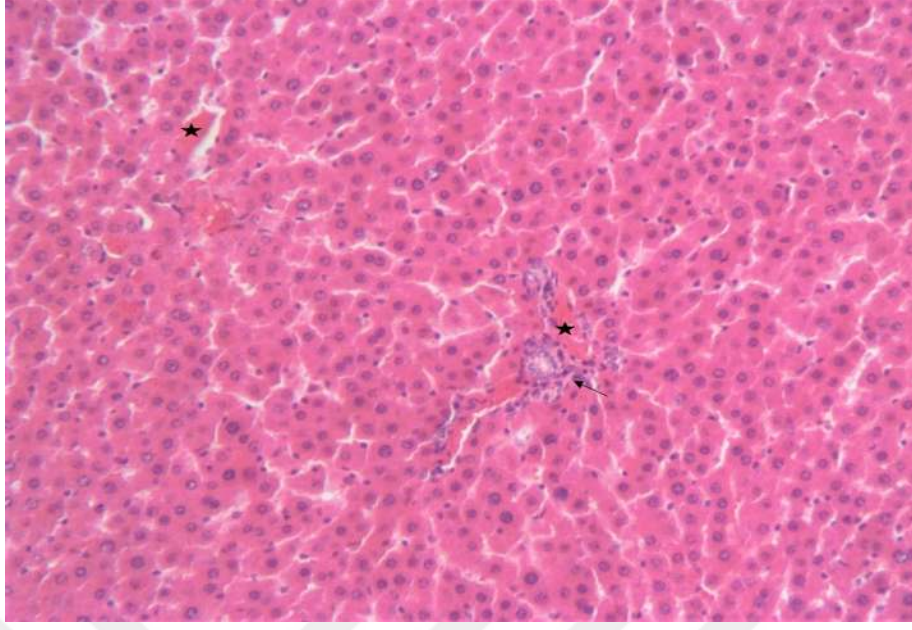
Şekil 10 Kontrol grubu. Normal görünümlü hepatositler ve sinuzoidler. H&E x200.



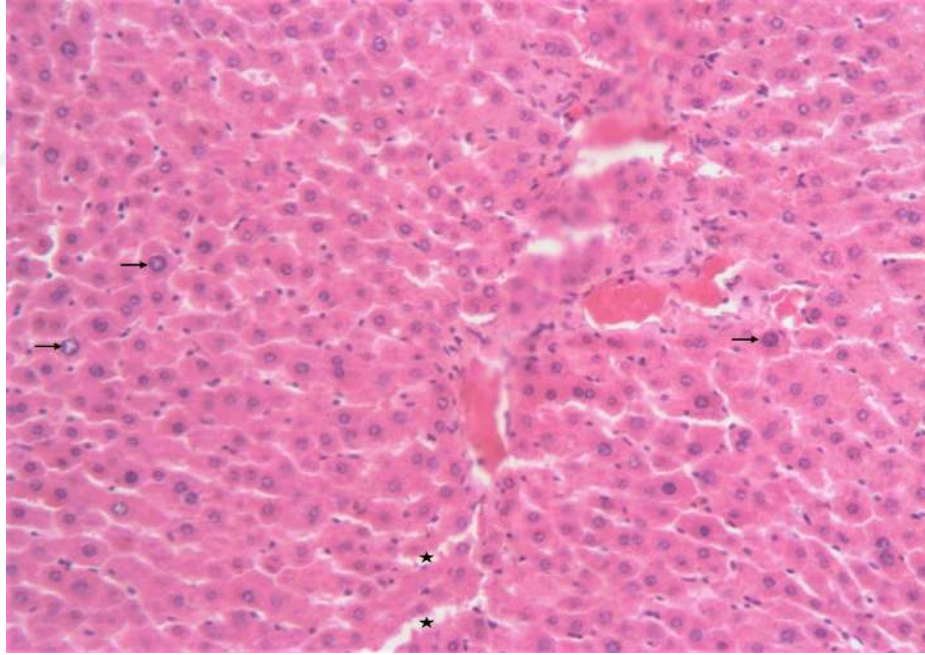
Şekil 11 DEN grubu. Sinuzoidal dilatasyon (yıldız) ve çift çekirdekli hepatositler (ok).
H&E x200



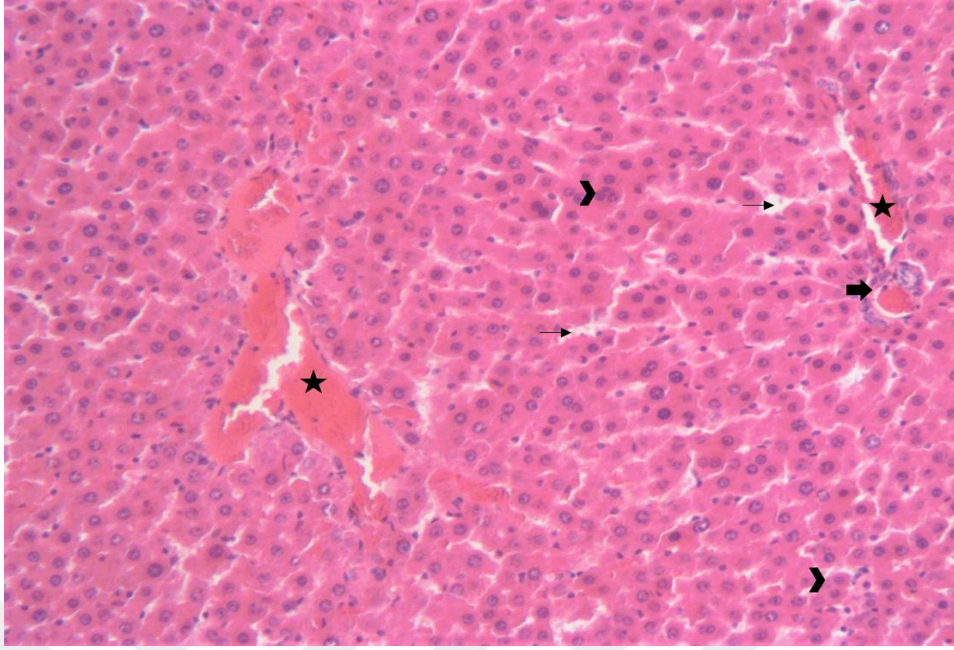
Şekil 12 DEN grubu. İnflamatuar hücre artışı (ok) ve hafif konjesyon alanları (ok başı).
H&E x200



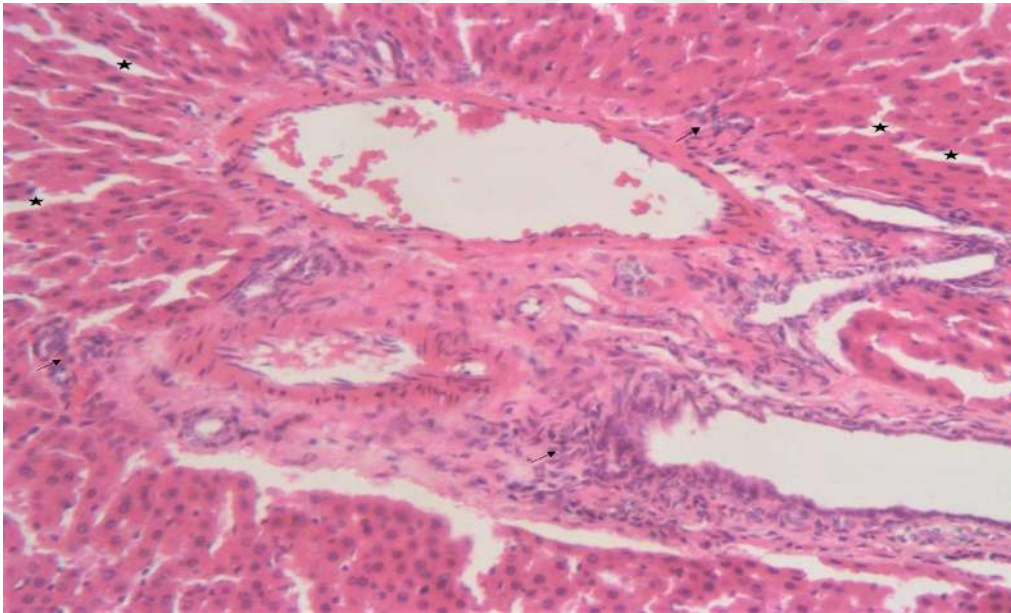
Şekil 13 DEN + FB grubu. İnflamatuar hücre artışı (ok) ve konjesyon alanları (yıldız).
H&E x200



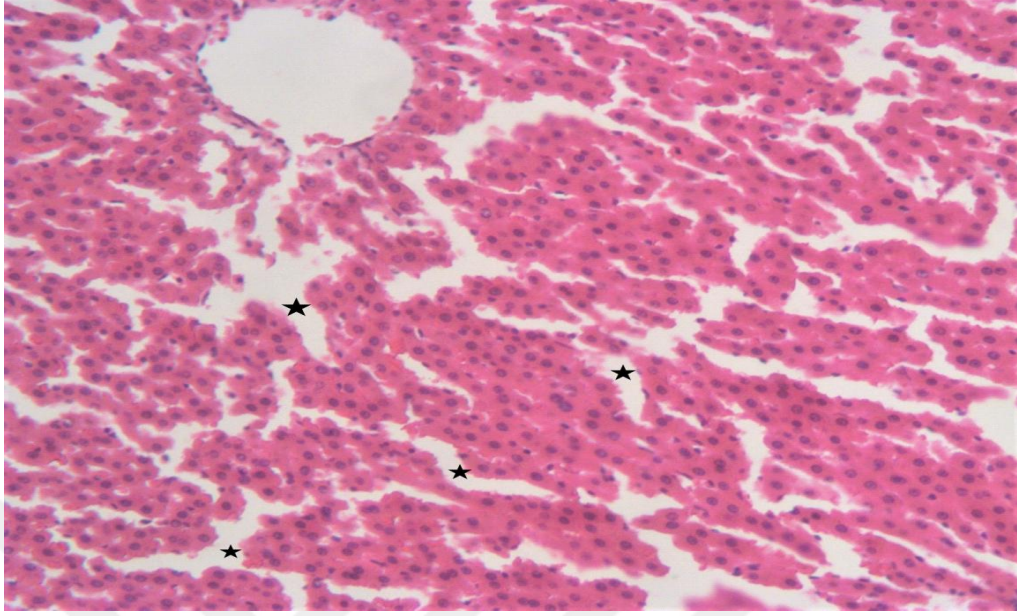
Şekil 14 DEN + FB grubu. Sinuzoidal dilatasyon (yıldız) ve iri nükleuslu hepatositler (ok). H&E x200



Şekil 15 DEN + FB + OLE grubu. Konjesyon (yıldız) ve sinüzoidal dilatasyon (ok), inflamatuvar hücre artışı (kalın ok) ve çift çekirdekli hepatositler (ok başı). H&E x200



Şekil 16 OLE grubu. Sinüzoidal dilatasyon (yıldız), inflamatuvar hücre artışı (ok). H&E x200



Şekil 17 OLE grubu. Sinüzoidal dilatasyon (yıldız). H&E x200

5.10. Tunel Analizi

Parafin bloklardan polilizinli lamlara 5 mm kalınlığında kesitler alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda TUNEL Kiti (Lot No:2470976, ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Millipore) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi boyanma gösterenler ise apoptotik hücreler olarak değerlendirildi. Boyanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik İndeks (Aİ) hesaplandı. Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği tespit edildi

(Şekil18). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DEN ve DEN+ FB gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$). DEN+ FB grubu ile karşılaştırıldığında ise DEN + FB + OLE grubunda istatistik olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p< 0.05$) (Tablo 16).

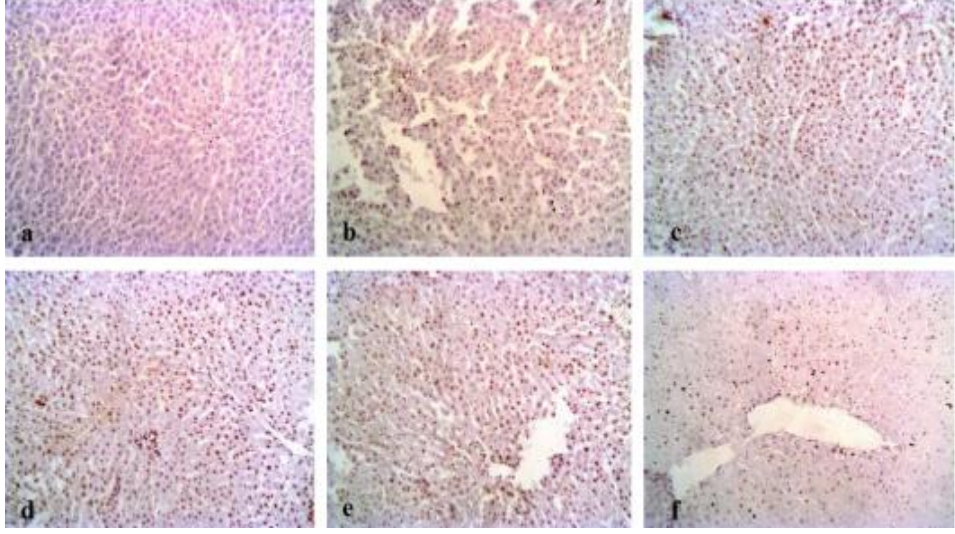
Tablo 16: Apoptotik indeks (%)

GRUP	APOPTOTİK İNDEKS (%)
Kontrol grubu	4.66 ± 2.73
Oleuropein grubu	$11.33 \pm 3.55^{a,b}$
DEN grubu	$17.16 \pm 3.18^{a,b}$
DEN + FB grubu	24 ± 4.6^a
DEN + FB + OLE grubu	$10.83 \pm 2.48^{a,b}$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında,

b:DEN+FB grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).



Şekil 18: TUNEL pozitifliği (kahverengi boyanmış çekirdekler).

(a) Kontrol grubu, (b) OLE grubu, (c) DEN grubu, (d) ve (e) DEN+FB grubu, (f) DEN+FB+OLE grubu. TUNEL x200.

6. TARTIŞMA

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesi olayıdır. Hastalık tek bir dokuya zarar verebileceği gibi uzaktaki dokulara da yayılarak etkisini gösterebilir. İnsan vücuduna zarar verdiği bilinen 100'den fazla kanser türü mevcuttur. Ayrıca her kanser türüne özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır (53, 54).

Ratta karaciğer tümörü oluşumunda, oksidatif stresin karsinojen metabolizma süresince etkili olduğu bilinmektedir. DEN verilmesinden 3 ile 24 saat sonra LPO düzeyleri yükselmektedir (55). Serbest radikaller hücre membranında hasar oluştururarak hücrenin fonksiyonel içeriğinin hasarlı membrandan sızmasına izin vermektedir. Serbest radikaller ile bozulan DNA, hücrenin normal yapısını değiştirir. Serbest radikallere maruz kalan hücreler mutasyona uğrar, kontrolsüz çoğalır ve kanseri oluşturur.

Serbest radikaller lipidler ile reaksiyona girer ve LPO' ya sebep olur. Bu serbest radikal parçaları proteinlerin okside sülfidril kısımlarına meyillidir, böylece protein fragmentasyonuna neden olur ve sonuçta hücreler yaşamını kaybeder (56).

Yapılan bir çalışmada Sanchez- Perez ve ark. (2004) , Chakraborty ve ark. (2000) tek doz 200 mg/kg ip. ve Atakişi ve Özcan (2005) tek doz 150 mg/kg ip. DEN vermişler, DEN verilmesinden 3-24 saat içinde MDA düzeylerinde artma tespit etmişlerdir. Karaciğer karsinogenezisinde oksidatif stresin önemli bir role

sahip olduğunu ve hepatokarsinogenez ile LPO arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir (57).

Thirynavukkarasu C. ve arkadaşları ise (2003) DEN ve FB ile oluşturdukları hepatik tümör oluşumu ile antioksidantlar arasındaki ilişkiyi şu şekilde açıklamışlardır; DEN'in metabolitleri DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık ederler. Tümör promotörü, bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumuna sebep olur. Bunun sonucunda $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidant mekanizmanın azalmasını ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşmasını sağlar. Oluşan hidroksil radikalleri deoksiribozda parçalanmalara dolayısıyla DNA kırıklarına neden olur. Reaktif hidroksil radikalleri, lipid membranda yer alan yağ asitlerindeki hidrojen atomlarını ayırır. Bu hidrojen atomları da doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşerek hidroperoksi radikallerini meydana getirir. Hidroperoksi radikalleri, lipid hidroperoksit oluşumu sırasında hidrojeni ayırırlar. Bu durum, süperoksit ve hidroperoksit radikallerinin LPO artışına, dolayısıyla hücre zarında hasara neden olduklarını ortaya koymaktadır (58). Conklin K. A. (2002) hazırlamış olduğu derlemede MDA'nın LPO'nun ikinci ürünü olduğunu ve onun belirleyicisi niteliğini taşıdığını bildirmiştir (59). Banakar M. C. ve arkadaşları (2004) da sıçanlara DEN ve FB uyguladıkları sıçanların karaciğer doku hücrelerinde, radikal oluşumu sonucunda oluşan LPO'nun ikinci ürünü olan MDA'da artış olduğunu bildirmişlerdir (36). Bizim çalışmamızda da karaciğer MDA düzeyleri kıyaslandığında, tüm gruplarda kontrol grubuna göre artma olduğu gözlenmiştir.

Araştırmacıların bu sonuçları, çalışmamızda tespit ettiğimiz MDA düzeyinin artışı ile paralellik göstermektedir.

Kan MDA düzeyleri gözlemlendiğinde ise DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artma saptanmış ve sonuçların hidroperoksi radikallerinin, lipid hidroperoksit oluşumu sırasında hidrojeni ayırmasından, süperoksit ve hidroperoksit radikallerinin LPO artışını gerçekleştirmesinden kaynaklanabileceğini akla getirmektedir.

Lipid hidroperoksidin taşınmasında glutatyon peroksidaz önemli bir rol oynar. Peroksidatif hasarı redükte glutatyon ve tüm tiyoller önler (60). Glutatyon, tiyol grubunun önemli bir üyesidir ve primer hücre içi antioksidanıdır, ayrıca önemli bir serbest radikal aktivatörüdür. ROS toplayıcısı olarak görev yapan GSH, içerdiği tiyol grupları sayesinde antioksidan savunmaya katkıda bulunan bir tripeptiddir (61).

Chakraborty ve ark. (2000) ratlara 200 mg/kg ip. DEN, Atakişi ve Özcan (2005) ratlara tek doz 150 mg/kg ip. DEN vererek yaptıkları çalışmalarda GSH seviyelerinde düşme saptamışlardır. Atakişi ve Özcan koruyucu olarak antioksidan omega-3, Chakraborty ve ark. vanadyum vererek GSH seviyelerinde yükselme tespit etmişlerdir (62, 63). Yapılan bir başka çalışmada da DEN'in meydana getirdiği GSH azalmasını güçlü bir antioksidan olan α - lipoik asidin düzelttiği görülmüştür (31). Bahsettiğimiz çalışmada ise karaciğer ve kan GSH düzeyleri kıyaslandığında her iki dokuda da DEN ve DEN+FB gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Buda GSH'nin antioksidan ve önemli serbest radikal inhibitörü olduğundan kaynaklanabileceği gibi DEN veya reaktif ürünleri ile eşleşmede GSH'nin artan gereksinimi ile de ilişkili

olabilir (61). Banakar M. C. ve arkadaşları (2004) DEN ve FB uygulanan sıçanların karaciğerinde SOD aktivitesinde azalma belirmişlerdir. SOD'un savunma sistemi için çok önemli olduğunu ortaya koymuşlar ve SOD'un, antioksidan olarak görev yaparak, zar ve sitozolde serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı savunma yaptığını belirtmişlerdir. SOD ve CAT, oksijen radikalini hidrojen peroksit ve su haline dönüştürdüğünü ve oluşan hidrojen peroksitin glutatyon peroksidaz tarafından yakalanarak, katalaz veya diğer enzim sistemleri tarafından yok edildiğini bildirmişlerdir. Kanseri hücrelerde, normal hücreye göre SOD miktarının daha yüksek olmasının nedeni olarak, tümör hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin aşırı derecede üretilmesi olduğunu belirtmişlerdir (62). Chakraborty T. ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları farklı bir çalışmada, DEN ve 2-AAF'nin sıçan karaciğeri hücrelerinde SOD aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir (64). Bu çalışmamızda ise karaciğer SOD düzeyleri kıyaslandığında gruplar arasında fark tespit edilememiştir. Kanda ki SOD düzeyleri kıyaslandığında ise DEN+FB grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir.

Fernandez ve ark. tarafından yapılan çalışmada DEN ve FB kullanılarak tümör oluşturulduğunda CAT ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (65). Santos ve ark. sekiz hafta boyunca tekrarlanan DEN uygulamasının ardından SOD ve CAT düzeylerinde artış olduğunu bildirmiştir (66).

Çalışmamızda ise karaciğer CAT düzeyleri karşılaştırıldığında DEN, DEN+FB ve DEN+FB+OLE gruplarında kontrole göre fark gözlenmemiştir. Kanda ki CAT düzeyleri kıyaslandığında ise DEN+FB grubunda tüm gruplara göre anlamlı azalma gözlenmiştir. CAT aktivitesi açısından bu değerler karaciğer hücrelerinin

oluşan oksidatif stresle başa çıkmaya devam edebildiğini, kanda ise bu süreçte oksidatif stresin arttığı şeklinde değerlendirilebilir. Ayrıca H_2O_2 'nin GPx aktivitesi ile GSH tüketerek su ve oksijene dönüştürülebileceğini düşündürmektedir. Waris ve Ahsan ayrıca H_2O_2 'nin GSH varlığında GPx aktivitesi ile detoksifiye olabileceğini öne sürmüşlerdir (66).

Oleuropein maddesi, zeytin ağacı ve yaprağında bulunur. Toksik özellikte değildir ve kanseri önleyen bir etkiye sahiptir. Kanserli hücrelerin etrafını geri dönüşümsüz olarak saran Oleuropein, bu hücrelerin çoğalmalarını, yayılmalarını ve başka yerlere sıçramalarını engellemektedir (42). OLE, farklı toksik kimyasalların neden olduğu karaciğer hasarını azaltmak amacıyla kullanılabilen güçlü bir bileşiktir ve OLE, bu ajanların etkilerini azaltmak için antioksidan aktivite göstermektedir (67).

Zeytin ve zeytinyağında bulunan antioksidanlar arasında anti-tümör aktiviteden sorumlu ana bileşik oleuropeindir. Barbaro ve ark. (2014) bir antioksidan olarak hücreleri tümör oluşumundan koruduğu ve bir anti anjiyogenik olarak da tümör yapısının yayılmasını engellediğini bildirmişlerdir. Birçok faydası bulunan ve toksik bir etki yaratmayan oleuropeinin kansere etkisi üzerine son yıllarda pek çok çalışmaya rastlanmaktadır. Yapılan araştırmalarda oleuropeinin hücre büyümesini ve dağılmasını baskıladığı tespit edilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalarla da oleuropeinin tümör büyümesini hızla geriletmediği bildirilmektedir. Köçkar ve ark. (2010) meme, deri, kolon ve prostat gibi kanser türleri üzerindeki araştırmalarda oleuropeinin koruyucu ve tedavi edici özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hayvanlar üzerinde denenen farklı çalışmalarda da ekstraktın kullanılmasıyla kanserli hücrelerin 9-12 gün içerisinde gerilediği gözlenmiştir. Oleuropein, radyasyona uğrayan ve gen değişikliği sonucu oluşan kötü huylu tümörlerin oluşumunu önleyen etkili bir maddedir. Oleuropein, X ışınlarının zararlı etkileri altında kalınmasının öncesinde ve sonrasında kromozom yapısını koruduğu ve kanser oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (42).

Klinik bir çalışma olan Lyon Heart Çalışması, Akdeniz diyetiyle beslenmenin kanser riskini %61, ölümü ise %56 oranında azalttığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmadaki olumlu gelişmeler Akdeniz diyetinde yüksek oranda tüketilen zeytinyağı ile ilişkilendirilmektedir (68).

Fabiani ve arkadaşları 2008 yılında, zeytinyağı etken maddelerinin PBMC (Preiferal blood mononuclear cells) ve HL-60 (promyelocyticleukemia) hücrelerinde DNA hasarına karşı hücreleri koruduğunu bildirmişlerdir (69).

Ayrıca Han ve ark. tarafından (2009), oleuropeinin meme kanseri modeli olan MCF-7 hücre hattında hücre canlılığını azalttığı hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (70).

Ayrıca, 2009 yılında Kimura ve ark. yapmış olduğu UV ışığı ile irrite olmuş deri kanseri modelinde, oleuropein uygulamasının MMP-2, MMP-9, MMP13, VEGF ve COX2 genlerinin ifadesini azalttığını bulmuşlardır (71). Goulos ve ark. 2009 yılında, MCF-7, T 24 (insan idrar kesesi karsinoma) ve BBCE (Bovine Brain Capiller Endotel) hücrelerinde zeytin yaprak ekstresinin, güçlü antioksidant özelliği gösterdiği ve hem kanser hem de endotel hücrelerinde hücre proliferasyonunu önlediğini bulmuşlardır (72).

Sedef Ziyankok (2014) tarafından yapılan çalışmada Diyabet + Oleuropein ekstraktı gruplarında karaciğer dokusu ve plazma MDA seviyelerinde gözlenen azalma, Oleuropeinin antihiperglisemik, antihiperlipidemik etkisinden kaynaklanabileceği gibi antioksidan özelliğinden de kaynaklanabileceğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar Oleuropeinin bir antioksidan olarak dokuları toksik ajanlara karşı koruduğunu ve MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğunu bildiren Manna ve ark. (1999), Chtourou ve ark. (2010), Zhang ve ark. (2013)' nın yapmış olduğu çalışmalarla uyumludur.

Bizim çalışmamızda ise karaciğer MDA düzeyinde OLE grubunda artma gözlenmiştir. DEN+FB grubuyla kıyaslandığında da DEN+FB+OLE grubunda anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Bu durum OLE'nin karaciğer hasarına karşı etkili olabileceğini öngörmektedir. Kan MDA düzeyinde OLE grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken DEN+FB+OLE grubunda değerler kontrol değerine yaklaşmıştır.

OLE' nin apoptozu aktive ettiği bildirilmiştir (73). Dahası, OLE kanser hücrelerinde bir antioksidan görevi görür, ancak OLE'nin antioksidan ve oksidan aktiviteleri üzerinde bir çelişki olan apoptosisi artırır (73). Bir antioksidan olmasına rağmen OLE, bu çalışmada tek başına verildiğinde LPO üretimini ve apoptosisi arttırmış ve bu nedenle karaciğer hücrelerinde bir kusura neden olmuştur. Katsoulis ve ark. 'na göre, OLE' nin kendisinin oksidasyonu ve peroksid oluşumu nedeniyle OLE'ye bağlı artmış LPO üretimi olabilir (73).

Manna ve ark. (1999), Alazzawie ve ark. (2006), Katsiki ve ark. (2007) oleuropeinin radikal süpürücü etkilerinden de söz etmişlerdir. Çalışılmış olan

Diyabet + Oleuropein ekstraktı grubunda antioksidan enzim seviyelerinde (SOD, GSH-Px) gözlenen artışın bu çalışmaları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda ise kanda ki SOD düzeyleri kıyaslandığında OLE grubunun kontrole yaklaştığı görülmektedir. Karaciğer SOD düzeyleri kıyaslandığında ise gruplar arasında fark tespit edilememiştir. Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada karaciğer CAT düzeyleri karşılaştırıldığında, OLE grubunda DEN, DEN+FB ve DEN+FB+OLE gruplarına göre anlamlı azalma göstermiştir. Kan CAT değerlerinde OLE grubunda DEN+FB grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. DEN+FB+OLE grubunda da DEN+FB grubuna göre yine anlamlı bir artış görülmüştür. Karaciğer ve kanda CAT düzeyleri OLE uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Bu sonuç OLE'nin DEN+FB grubunda oluşan hasarı azalttığıнын bir göstergesi olabilir.

Karaciğer GSH düzeylerinde OLE ve DEN+FB+OLE grubu kontrol grubu ile uyumludur. Kanda ki GSH düzeylerinde OLE grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken, DEN+FB+OLE grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanılmamıştır.

DEN ve FB uygulanan sıçanlarla yapılan çalışmada karaciğer de, histolojik olarak; preneoplastikfokus, nodüller ve hiperplastikkupffer hücrelerinin varlığı belirlenmiştir (36) .

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da kontrol grubuna ait ratların karaciğer dokuları incelendiğinde hepatositler ve sinuzoidler normal yapıda izlenmiş, DEN grubuna ait kesitlerde çift çekirdekli hepatosit sayısında artış, hafif

konjesyon, periportal alanda inflamatuvar hücre artışı ve sinüzoidal dilatasyon tespit edilmiştir. DEN+ FB grubuna ait kesitlerde ise DEN grubu ile kıyaslandığında tüm histopatolojik bulgulara artış ve iri nükleuslu hepatositler gözlenmiş, DEN+ FB+ OLE grubunda dilatasyonda azalma gözlenirken diğer histopatolojik değişiklikler açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Yalnızca OLE uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sinüzoidal dilatasyonun yaygın olduğu bunun yanı sıra periportal alanlarda inflamatuvar hücre artışı izlenmiştir.

Apoptotik hücreleri belirlemek için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu

altında incelenmesi sonucunda ise karaciğer dokusunda TUNEL pozitifliği tespit edilmiş, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DEN ve DEN+ FB gruplarında TUNEL pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

DEN+ FB grubu ile karşılaştırıldığında ise DEN + FB + OLE grubunda istatistik olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Sonuç olarak, karaciğer karsinogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğunu ve hepatokarsinogenez ile LPO arasında ilişki olduğu söylenebilir. CAT, H_2O_2 'i zararsız yan ürünlere dönüştürdüğü için hücresel hasarın şiddetinde önemli rol oynayabilir. OLE'nin hasar oluşturulan gruplarda uygulanması oluşan hasarın azaltılmasında etkiliyken hasar yokken kullanılması karaciğer MDA düzeylerini arttırmaktadır. Karaciğer hasar oluşumu sırasında bu dozlarda ve sürede Oleuropein uygulamasının rat kan ve karaciğer parametre düzeyleri üzerinde oksidatif strese karşı koruyucu etkilerinin olabileceği düşünülebilir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda oksidatif hasara karşı kullanılan Oleuropeinin farklı doz uygulamalarının yapılması ve en faydalı dozun tesbiti önerilebilir.



KAYNAKLAR

1. Hanahan D and Weinberg R A. The hallmarks of cancer. 2000; Cell 100: 57- 70
2. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer: The next Generation. 2013; Cell 2011.02.013
3. Cantor JR. And Sabatini DM Cancer Metabolism: One Hallmark, Many Faces 2012
4. Ass. Prof. Dr. Mehmet TOPÇUL. “Kanser” [www.sb.k12.tr/ IMG /pdf/kanser.pdf](http://www.sb.k12.tr/IMG/pdf/kanser.pdf)
5. Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri (1995-1999). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı Bakanlık Yayın No: 618, Ankara: s. 2002.
6. Preventing cronic diseases: A vitalinvestment, Genova, WHO, 2005
7. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancerstatistics, 2002; CA Cancer J Clin 2005;55(2):74-108.
8. “En son Dünya İstatistikleri” www.losev.org.tr/ 30.01.2014
9. Xu Y, Long L, Yang C, Lu Y, Cheng M, Maotai Ameliorates Diethylnitrosamine-Initiated Hepatocellular Carcinoma Formation in Mice. 2014; PLoS ONE 9(4): e 93599
10. Munoz, N, Bosch, X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Neoplasms of the Liver, Okuda, K, Ishak, KG (Eds), Springer, Tokyo 1989
11. Okuda, K. Epidemiology of primary liver cancer. In: Primary Liver Cancer in Japan, Tobe, T (Ed), Springer-Verlag, Tokyo 1992.

12. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafariet K, (2003): IncreasingintracellularcAMPandcGMPinhibitscadmium-inducedoxidativestress in rat submandibularsaliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336.
13. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A, (2004) : Pesticides and oxidative stress: areview. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
14. Cochran CG, (1991) : Cellular injurybyoxidants. *Am. J. Med.*, 92: 235-305.
15. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A, (1998) : Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*: 35, Ankara, s. 222, 232, 273, 276, 355.
16. Matés JM, (2000) : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen speciestoicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
17. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM, (1998) : Freeradicals as mediators of neuronalinjury. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 18: 667-682.
18. Güven A, Erginsoy S, Kaya N, (2003) : Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9: 131-136.
19. Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F, (2002) : Endosulfan-induced cardio toxicity and free radical metabolism in rats : the protectiv eeffect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227-235.
20. Niki E, (1987) : Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids*, 44: 227 253.
21. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC, (1990): Estimation of product of lipid peroxidation (MalondyDialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16:259-264.
22. Porter NA, (1984) : Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105: 273-283.

23. Koca HB.(2007). Koroner Arter Hastalarında Lipit ve Protein Oksidasyonu ile Selenyum İçeren Antioksidanların Düzeyi. Kocatepe Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
24. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z, Delibaş N. (2003). Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri; 10: 65 – 67.
25. Özkan, A. Gündüz, G. Çıplak, B., Fışkın, K. (2000). ”Kimyasal mücadele uygulanmış *Dociostaurus Maroccanus* epidemik popülasyonundan alınan örneklerde antioksidan enzim aktiviteleri” , Turkish Journal of Biology:24, 141-149.
26. Gutteridge J.M.C.(1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. ClinChem, 41; 1819-1828.
27. Karabulut, A. Ozerol, E (2002). Yas ve Sigara İçiminin Eritrosit Katalaz Aktivitesi ve Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.9(2): 85-88.
28. Van Bladeren, P. J. (2000). “Glutathion conjugation as a bioactivation reaction.” Chemico-Biological Interactions 129(1-2):61-76.
29. Cuzzocrea S.Reiter RJ.(2001).Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharmacol;426(1-2):1-10
30. Velioğlu S. Doğal Antioksidanların İnsan Sağlığına Etkileri. 2000; Gıda 25: 167-176)
31. Ken-ichi Y, Ikvo Y, Hideo U. In vivo detection of free radical induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. Free Radic . Biol. Med, 2006; 40(11): 2040-2046.
32. Ma X, Ma X, Sui Y, Wang W L, Wang C. Signal Transduction of Gap Junctional Genes, Connexin 32, Connexin43 In Human Hepatocarcinogenesis. World J Gastroenterol, 2003; 9(5):946-950.

33. Liu L, Gong L, Qi X, Cai Y, Wang H, Wu X, Xiao Y, Ren J. Altered Expression of Cytochrome P450 and Possible Correlation with Preneoplastic Changes in Early Stage of Rat Hepatocarcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005; 26(6): 737-744.
34. Thirynavukkarasu C, Sakthisekaran D. Stabilization of Membrane Bound Enzyme Profiles by Sodium Selenite in N-nitrosodiethylamine Induced and Phenobarbital Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003; 57: 117-123.
35. Braeuning A, Gavrilov A, Geissler M, Wenz C, Colnot S, Templin MF, Metzger U, Römer M, Zell A, Schwarz M. [Epub ahead of print] Tumor promotion and inhibition by phenobarbital in livers of conditional Apc-deficient mice. 2016; *Arch Toxicol*.
36. Banakar M, Paramasivan S, Chattopadhyay M, Datta S, Chakraborty P, Chatterjee M, Kannan K, Thygarajan E. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Prevents DNA Damage and Restores Antioxidant Enzymes in Rat Hepato carcinogenes is Induced by Diethylnitrosamine and Promoted by Phenobarbital. *World J. Gastroenterol*. 2004; 10(9): 1268-1275.
37. Goeptar A, Groot E, Scheerens H, Commandeur J, Vermeulen N. Cytotoxicity of Mitomycin C and Adriamycin in Freshly Isolated Rat Hepatocytes: The Role of Cytochrome P450. *Cancer Res*, 1994; 54: 2411-2418.
38. Malik, N.S.A. and J.M. Brandford. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Hort*. 2006; 110:274-278.
39. Winkelhausen, E.R. Pospiech and G. Laufenberg. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Techn. Macedonia*. 2005; 24(1):41-46.
40. Benavente-García, O. Castillo, J. Lorente, J. Ortúño, A. Del Río, J.A. Antioxidant activity of phenolic sex tracted from *Olea europaea* L. leaves. *FoodChem*. 2000; 68, 457–462.]

41. M. Bonoli, A. Bendini, L. Cerretani, G. Lercker, T.G. Toschi, Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques, *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52, 7026–7032.]
42. Benavente-Garcia, O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M,. Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves against X-ray-induced chromosomal damage. *J Med Food*, 2002; 5(3): 125-35.
43. Ferreira, I.C.F.R, Barros, L, Soares M.E, Bastos, M.L, Pereira, J.A. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 2006; 103: 188-195.
44. Olive Leaf Extra Strong Tincture Dosage <http://www.advance-health.com/oliveleaf.html>
45. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Ali S, et al. Orally administered lycopene attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats by modulating Nrf-2/HO-1 and Akt/mTOR pathways. *Nutr Cancer* 2014;66(4):590-8.
46. M. Alirezai. A. Kheradmand. R. Heydari. N. Tanideh. Sh. Neamati. M. Rashidipour. Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012; Volume 5, Issue 3, pp 205-211.
47. Placer, Z.A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C.: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 1966;16:359–364.
48. Chavan S, Sava L, Saxena V, Pillai S, Sontakke A and Ingole D. Reduced Glutathione: Importance of specimen collection. *I J of Clin Biochem.* 2005; 20(1): 150-152.
49. Aebi, H.: Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic press, London, pp. 1984; 671-684.

50. Sun ve ark. 1988. (Sun, Y. Oberly L.W. Ying, L.A. ‘‘Simple method for clinical assay of superoxide dismutase’’. Clin Chem. 1988; 34: 497-500
51. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
52. Fairbanks VF, Klee GG .Haemoglobin (Hb) concentration was determined according to cyanmethaemoglobin method Biochemical aspects of hematology. In: Tietz NW (Ed.): Textbook of clinical chemistry. WB Saunders Company, Philadelphia,1986. pp. 1532- 1534 .
53. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C ve ark. The Global Burden of Cancer 2013. JAMA Oncol. 2015;1(4):505-27.
54. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases (review). Oncol Rep. 2015 Jan;33(1):3-18.
55. David Wolfson N.D. (2000). Lipoic acid: The universal antioxidant. Nutrition Science News.
56. Arivazhagan P., Juliet P., Panneerselvam C.(1999). Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. Pharmacological Research. 41:3.
57. Yesennia S.P. Claudia C.L. Claudia G.C. Julio P.C. Sergio H.G. Martha S.N. Leticia A.L. Saul V.T.(2004). Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. Cancer Letters. 217(2005): 25-32.
58. Thirynavukkarasu C. Sakthisekaran D. Stabilization of Membrane Bound Enzyme Profiles by Sodium Selenite in Nnitrosodiethylamine Induced and Phenobarbital Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats. Biomedicine a Pharmacotherapy, 57: 117-123, 2003.
59. Conklin K.A.:Dietary Polyunsaturated Fatty Acids: Impact on Cancer Chemotherapy and Radiation. Altern Med Rev.7(1): 4-21, 2002.

60. Arivazhagan P. Juliet P. Panneerselvam C.(1999). Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacological Research*. 41: 3.
61. Sherif IO. The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway. *Int Immunopharmacol* 2018; 61:29-36.
62. Emine Atakişi, Ayla Özcan (2005) Dietilnitrozamin verilen ratlarda omega-3 yağ asitlerinden zengin balık yağının koruyucu etkilerinin araştırılması. *Türk Biyokimya Dergisi* 2005;30(4);279-284.
63. Chakraborty A. Selvaraj S. Sudarshan M. Dutta R.K. Ghugre S.S, Chintalapudi S.N.(2000). Modulatory role of vanadium on trace element profile in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 170(1-2):156-162.
64. Chakraborty T. Ghosh S. Datta S. Chakraborty P. Chatterjee M. Vanadium Supresses Sister-Chromatid Exchange and DNAProtein Crosslink Formation and Restores Antioxidant Status and Hepatocellular Architecture during 2-Acetylaminofluorene Induced Experimental Rat Hepatocarcinogenesis. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 3: 346-362, 2003
65. Fernandez C, Sanz N, Alvarez A, Wolf A, Cascales M. The Effect of Non Genotoxic Carcinogens, Phenobarbital and Clofibrate, onThe Relationship between Reactive Oxgen Species, Antioxidant Enzyme Expression and Apoptosis. *Carcinogenesis*, 1998; 17:15-1722.
66. Paula Santos N, Colaço A, Gil da Costa RM, Manuel Oliveira M, Peixoto F, et al. N-diethylnitrosamine mouse hepatotoxicity: time-related effects on histology and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 2014;66(9-10):429-36.
67. Maalej A, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Fki I, Marrekchi R, Sayadi S. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and

kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food Chem Toxicol* 2017;106(Pt A):455-465.

68. Edgecombe S. C. Stretch G. L. Hayball P. J. Oleuropein, an Antioxidant Polyphenol from Olive Oil, Is Poorly Absorbed from Isolated Perfused Rat Intestine, *American Society for Nutritional Sciences*, 2000; 2996-3002.
69. Fabiani, R. Rosignoli, P. Bartolomeo, A. Fuccelli, R. Servili, M. Montedoro, G.F. Morozzi, G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells, *Journal of Nutrition*, 2008; 138, (8): 1411-1416
70. Han, J. Talorete, T.P.N. Yamada, P. Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, *Cytotechnology*, 2009; 59 (1):45-53
71. Kimura, Y. Sumiyoshi, M. Olive Leaf Extract and Its Main Component Oleuropein prevent Chronic Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Damage and Carcinogenesis in Hairless Mice, *Journal of Nutrition*, 2009; 139 (11): 2079-2086
72. Goulas, V. Exarchou, V. Troganis, AN. Psomiadou, E. Fotsis, T. Briasoulis, E. Gerothanassis, IP, Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells, *Mol. Nut. And Food Research*, 2009; 53 (5): 600-608
73. Katsoulieris EN. The olive leaf extract oleuropein exerts protective effects against oxidant-induced cell death, concurrently displaying pro-oxidant activity in human hepatocarcinoma cells. *Redox Rep* 2016;21(2):90-7.

ÖZGEÇMİŞ

1988 tarihinde Elazığ’da doğdum. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun oldum. Evliyim ve bir çocuğum var. Fırat Üniversitesi Hastanesi Onkoloji Gündüz Tedavi Ünitesinde çalışmaktayım.

