



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



RATLARDA AKUT KURŞUN ZEHİRLLENMESİNDE
SIZMA ZEYTİNYAĞI VE ZEYTİN AĞACI YAPRAĞI
EKSTRAKTININ KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Can ÖZCAN

VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT

ANKARA

2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA AKUT KURŞUN ZEHİRLENMESİNDE
SIZMA ZEYTİNYAĞI VE ZEYTİN AĞACI YAPRAĞI
EKSTRAKTININ KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Can ÖZCAN

VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum '**Ratlarda Akut Kurşun Zehirlenmesinde Sızma Zeytinyağı ve Zeytin Ağacı Yaprağı Ekstraktının Koruyucu Etkisinin Araştırılması**' başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Can Özcan

27.01.2017

İmza

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalında

Can Özcan tarafından hazırlanan ‘Ratlarda Akut Kurşun Zehirlenmesinde Sızma Zeytinyağı ve Zeytin Ağacı Yaprağı Ekstraktının Koruyucu Etkisinin Araştırılması’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Imza	Imza
Unvanı Adı ve Soyadı	Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi	Üniversitesi
Jüri Başkanı	Jüri Başkanı
Imza	Imza
Unvanı Adı ve Soyadı	Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi	Üniversitesi
Raportör	Üye
Imza	Imza
Unvanı Adı ve Soyadı	Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi	Üniversitesi
Üye	Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii

1.GİRİŞ	1
1.1. Dünyada ve Türkiye' de Zeytin ve Zeytinyağı	1
1.1.1. Sızma Zeytinyağı	3
1.1.2. Zeytin Ağacı Yaprığı ve Özellikleri	13
1.2. Kurşun ve Kurşun Zehirlenmesi	19
1.2.1. Kurşunun Zehirlenme Mekanizması ve Tedavi Yaklaşımları	20
1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi	22
1.3.1. Serbest Radikaller	22
1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	23
1.3.3. Oksidatif Stres	24
1.3.3.1. Kurşun ve Oksidatif Stres	25
1.3.3.2. Sızma Zeytinyağı ve Oksidatif Stres	25
1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	27

2.GEREÇ ve YÖNTEM	28
2.1. Gereç	28
2.1.1. Hayvan Materyali	28
2.1.2. Kurşun	28
2.1.3. Sızma Zeytinyağı	29
2.1.4. Zeytin Ağacı Yaprığı Özütü	30
2.2. Yöntem	30

2.2.1. Sızma Zeytinyağında Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	30
2.2.1.1. Sızma Zeytinyağının Ekstraksiyonu	31
2.2.1.2. Sızma Zeytinyağında Bulunan Toplam Fenolik Madde Analizi	31
2.2.2. Sızma Zeytinyağındaki Fenolik Madde Çeşitlerinin HPLC ile Belirlenmesi	32
2.2.2.1. HPLC Sisteminin Özellikleri	32
2.2.2.2. Kullanılan Kimyasallar	32
2.2.2.3. HPLC Koşulları	32
2.2.3. Zeytin Ağacı Yaprığı Özütünün Elde Edilmesi	33
2.2.3.1. Zeytin Ağacı Yaprığı Ekstraksiyon İşlemi	33
2.2.3.2. Zeytin Ağacı Yaprığı Özütünün HPLC ile Analizi	34
2.2.3.2.1. HPLC Sisteminin Özellikleri	35
2.2.3.2.2. HPLC Analiz Koşulları	35
2.2.3.2.3. Oleuropein Miktarının Hesaplanması	36
2.3. Deney Kurgusu	37
2.4. Kan Alma İşlemleri	38
2.5. Kan Analizleri	39
2.5.1. Serum Lipit Değerlerinin Belirlenmesi	39
2.5.2. Hematolojik Değerlerin Belirlenmesi	39
2.5.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	40
2.5.3.1. Alyuvarlarda Süperoksit Dismutaz Ölçümü	40
2.5.3.2. Alyuvarlarda Katalaz Ölçümü	40
2.5.4. Plazma Malondialdehit Ölçümü	41
2.5.5. Kan Kurşun Düzeyi Ölçümü	41
2.5.5.1. Kullanılan Cihazlar	41
2.5.5.2. Reaktifler	41
2.5.5.3. ICP-MS Koşulları	42
2.6. İstatistik Analizler	42

3. BULGULAR	43
3.1. Sızma Zeytinyağının Bileşimi	43
3.2. Zeytin Ağacı Yaprığı Özütünün İçeriği	44
3.3. Hematolojik Değerler	45
3.3.1. Ortalama Alyuvar Sayıları	45
3.3.2. Hemoglobin Değerleri	45
3.3.3. Hematokrit Değerleri	46
3.3.4. Alyuvar İndeksi	47
3.3.4.1. Ortalama Alyuvar Hacmi (OAH)	47
3.3.4.2. Ortalama Alyuvar Hemoglobini Miktarı (OAHb)	47
3.3.4.3. Ortalama Alyuvar Hemoglobin Derişimi (OAHbD)	48
3.4. Serum Lipit Değerleri	52
3.4.1. Kolesterol Değerleri	52
3.4.2. Trigliserit Değerleri	52
3.4.3. HDL Değerleri	53
3.4.4. LDL Değerleri	54
3.5. Kan Kurşun Düzeyleri	54
3.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	55
3.6.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	55
3.6.2. Katalaz Aktivitesi	56
3.7. Plazma Malondialdehit Düzeyleri	56
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	87
Ek-1. Etik Raporu	87
ÖZGEÇMİŞ	88

ÖNSÖZ

Kurşun insan ve havyan sağlığını etkileyen ağır metaldir. Kurşun toksik etkisini fizyolojik antioksidan kapasiteleri bozarak veya azaltarak gösterir. Zeytin meyvesi (*Olea europaea L*) ve yaprağı yararlı etkileri nedeniyle yüzyıllardır birçok medeniyet tarafından kullanılmıştır. Zeytin meyvesinden elde edilen sızma zeytinyağı içerdiği yüksek polifenolik bileşikler, zeytin ağacı yaprağı ekstraktı içerdiği yüksek oleuropein ile antioksidan etki göstermektedir. Çalışmamızda kurşun toksikasyonlarında sızma zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağı ekstraktının bu toksisiteyi engelleme özelliği olup olmadığı araştırılmıştır.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim doktora eğitimim süresince bana emek veren ve çok değerli katkıları olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT başta olmak üzere Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nesrin SULU' ya, çalışmada ölçümlerin yapılmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Tevhide SEL' e, çalışmada kullandığım zeytin ağacı yaprağı temin eden A.Ü Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mücahit Taha ÖZKAYA 'a, sızma zeytinyağı ölçümlerindeki yardımlarından dolayı A.Ü. Gıda Mühendisliği Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Aziz TEKİN 'e ve Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr Aslı YORULMAZ'a, özüt elde edilmesindeki yardımlarından dolayı A.Ü Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Murat KARTAL ve Dr. Mahmut ASKER'e, çalışmada istatistiksel analizleri yapmamda yardımcı olan Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr.Aykut Göktürk ÜNER'e, tezin düzenlemesindeki katkılarından dolayı Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Süleyman KÖK, Biyoteknoloji ve Genetik Bölümü doktora öğrencisi Uzman Biyolog Gülden VAPUR 'a, deney sürecinde yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Hakan ASLAN ve Veteriner Hekim Hilal BALIKÇI'

ya, Fizyoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı ğretim üyelerine, sızma zeytinyağının teminindeki katkılarından dolayı Laleli Zeytinyağı firmasına, beni destekleyen ve şans getiren Dilek YILMAZ ‘a ve benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.



SİMGELER ve KISALTMALAR

ALA	Delta Aminolevünilik Asit
ALAD	ALA Dehidrataz
CAT	Katalaz
COX-2	Siklooksijenaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
δ-ALAD	Delta Aminolevunilik Asit Dehidrogenaz
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Fe-NTA	Ferrik-Nitritotriasetat
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon Peroksidaz
Hct	Hemotokrit
Hb	Hemoglobin
HT	Hidroksitirozol
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HIV-1	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
HNO ₃	Nitrik Asit
i.p.	İntraperitoneal

iNOS	İndüklenmiş Nitrik Oksit
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LPO	Lipid Peroksidaz
LOX	Lipoksigenaz
MDA	Malondialdehit
MPC	Minör Polar Komponent
MPO	Miyeloperoksidaz
M.Ö	Milattan Önce
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asiti
NBT	Nitroblue Tetrazoliyumu
NFkB	Nükleer Faktör kappa B
NO	Nitrik Oksit
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
O ₂	Oksijen
OAH	Ortalama Alyuvar Hacmi
OAHb	Ortalama Alyuvar Hemoglobini
OAHbD	Ortalama Alyuvar Hemoglobin Değişimi
OH•	Hidroksil Radikali
PBS	Saline Fosfat Tampon
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asiti
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksid Dismutaz
3-4 DHPEA –EA	3-4 dihidoksipentil etenol-elenolik asit
3-4 DHPEA-EDA	3-4 dihidoksipentil etenol-dialdehit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Polifenolik bileşikler ve yapısı	11
Şekil 1.2. Oleuropeinin kimyasal yapısı	15
Şekil 1.3. Oleuropein vücuttaki metabolizması	16
Şekil 1.4. Oleuropeinin antioksidan metabolizması	18
Şekil 1.5. Kurşunun toksik etki mekanizması	21
Şekil 1.6. Serbest radikal oluşumu	24
Şekil 1.7. Oksidatif stresin hücre zarına zararı	24
Şekil 1.8. LDL oksidasyonu ve köpük hücre oluşumu	26
Şekil 2.1. Ekstraksiyon ve mimispray dryer işlemlerinin gerçekleştirildiği cihazlar	35
Şekil 3.1. Sızma zeytinyağının fenolik madde içeriği kromotogramı	45
Şekil 3.2. Zeytin ağacı yaprağından elde edilen özütteki oleuropein kromotogramı	46
Şekil 3.3. Ortalama alyuvar sayıları	47
Şekil 3.4. Hemoglobin değerleri	48
Şekil 3.5. Hematokrit değerleri	48
Şekil 3.6. Ortalama alyuvar hacimleri	49
Şekil 3.7. Ortalama alyuvar hemoglobin miktarı	50
Şekil 3.8. Ortalama alyuvar hemoglobin değişimi	41
Şekil 3.9. Ortalama kolesterol değerleri mg/dl	52

Şekil.3.10. Ortalama trigliserit değerleri	53
Şekil.3.11. Ortalama HDL değerleri	53
Şekil.3.12. Ortalama LDL değerleri	54
Şekil 3.13. Ortalama kan kurşun düzeyleri	54
Şekil 3.14. Ortalama SOD aktiviteleri	55
Şekil 3.15. Ortalama CAT aktiviteleri	56
Şekil 3.16. Ortalama MDA aktiviteleri	57



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye’de zeytinyağı üretimi, tüketimi ve kişi başı tüketimi	3
Çizelge 1.2. Zeytinyağının bileşimi	4
Çizelge 1.3. Sızma zeytinyağının bileşenleri	5
Çizelge 1.4. Sızma zeytinyağının fenolik bileşimi	8
Çizelge 1.5. Çeşitli bölgelerdeki zeytin ağacı yaprağındaki oleuropein miktarları	15
Çizelge 2.1. Deneme gruplarına verilen yemin bileşimi	30
Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan zeytinyağının 100 gramındaki enerji ve besin değerleri	31
Çizelge 2.3. Sızma zeytinyağının HPLC gradient programı	34
Çizelge 2.4. Minispray Dryer şartları	35
Çizelge 2.5. Zeytin ağacı yaprağı özütü HPLC gradient programı	37
Çizelge 2.6. Deneme Grupları	38
Çizelge 3.1. Sızma zeytinyağındaki fenolik madde miktarları	46
Çizelge 3.2. Hematolojik değerler	49
Çizelge 3.3. Serum lipit değerleri, kan kurşun düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri	58

1. GİRİŞ

1.1. Dünyada ve Türkiye' de Zeytin ve Zeytinyağı

Zeytin Oleaceae ailesine ait zeytin ağacı *Olea europaea L.*'nin meyvesi olup dünyada 80 değişik isimle adlandırılmaktadır. *Olea* genusu içinde 30 tür olmasına rağmen bunlardan en önemlisi *Olea europaea L. dir.* Ülkemizde *Olea europaea L.* türü iki çeşit ile temsil edilmektedir. Bunlar *Olea europaea L. var. zhukovsky* ve *Olea europaea L. var. sylvestri (miller) Lehr'* dir (Altınyay, 2006 ve Hashmi ve ark., 2015).

Oleacea familyası *Olea europaea L.* olarak adlandırılan cinsinin bir türü olan zeytinin ana vatanı Güneydoğu Anadolu bölgesini de içine alan Yukarı Mezopotamya Güney Ön Asya'dır. Zeytin Mısır üzerinden Tunus ve Fas, Anadolu boyunca Ege adalarına, Kuzey İran üzerinden Pakistan ve Çin'e kadar yayılmıştır (Hashmi ve ark., 2015 ve Özkaya ve ark., 2010).

Neolitik dönemde Akdeniz bölgesindeki halklar tarafından zeytinin toplandığı, milattan önce (M.Ö.) 3. yüzyılda halk kültürüne alındığı, farmakolojik ve kozmetik olarak kullanıldığı arkeolojik kanıtlarla gösterilmektedir. Zeytin ağacının kültür yetiştiriciliğinin ilk kez M.Ö. 4000' lerde Anadolu, Doğu Akdeniz ve Güney Ön Asya'da Samiler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Anadolu'da yapılan kazı çalışmaları ile zeytin ve zeytinyağı kullanımının M.Ö. 3000'li yıllara kadar uzandığı ortaya konmuştur. Zeytin ile ilgili bilinen en eski kalıntılara Hatay ve Mardin illerinde rastlanması, zeytinin anavatanın Anadolu olduğu yargısını kuvvetlendirmektedir (Barbaro ve ark., 2014 ve Öztürk ve ark., 2009).

İlk Grek ve Roma yazıtlarında zeytin barış ve birlikteliğin ebedi simgesi olarak birçok efsaneye konu olmuş, eski uygarlıkların yazıtlarında ve kutsal kitaplarda yer almıştır. Eski Yunan metinlerinde zeytin ağacı kesmenin idam cezası ile cezalandırıldığı, Hipokrat'ın zeytinyağını tedavide kullanması ve Romalıların yemeklerinde sadece zeytinyağı kullanmış olmaları ile ilgili bilgilerin bulunması bu medeniyetlerin zeytine verdiği önemin en büyük göstergesidir (Barbaro ve ark., 2014; Hashmi ve ark., 2015 ve Özkaya ve ark., 2010).

Zeytin ağacı 30⁰– 45⁰ enlemler arasında kuzey yarım kürede Akdenize kıyısı olan ülkelerde ve Akdeniz iklimi olan coğrafyalarda yetişen akdenize özgü bir ağaçtır (Öztürk ve ark., 2009).

Türkiye'de zeytincilik Cumhuriyet sonrası tarımın en önemli faaliyet alanlarından biri olmuştur. Mustafa Kemal Atatürk'ün direktifleri ile 1937 yılında Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsü kurulmuş, ilk zeytinyağı ihracatı 1961–1962 döneminde gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde 2000'li yıllardan bu yana özellikle sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminde nitelik ve nicelik olarak ciddi gelişmeler olmuştur. Dünyada en büyük zeytin üreticisi İspanya olup onu İtalya ve Yunanistan takip etmektedir. Ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri ve Arjantin'de de zeytin üretilmektedir. Ülkemiz 2.707 milyon ton zeytinyağı üretimi ile tüm dünyadaki üretim havuzunda %4,7'lik paya sahiptir. Bu rekolte ile dünya da 5. sıradadır. 2007 yılı verilerine göre dünyada 8,3 milyon hektar alanda 17 milyon ton dane zeytin üretiminin %90'ı sekiz Akdeniz ülkesinde gerçekleşmektedir. Türkiye'de zeytin üretim alanı yaklaşık 732,314 hektar olup toplam tarım alanlarının %2,3'ünü, bağ-bahçe alanlarının ise %22'sini oluşturmaktadır. Zeytincilik ülkemizde 36 ilde 270 ilçede yapılmakta olup 155.428.192 zeytin ağacı varlığı ve 1.098.774 ton zeytin üretimi bildirilmektedir (Anonim 2011; Anonim, 2013; ve Hashmi ve ark, 2015).

Uluslararası Zeytinyağı Kodeksi ve Avrupa Birliği ile uyumlu Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'ne göre zeytinyağları dört ana gruba ayrılmıştır. Bunlar natürel zeytinyağları (virgin olive oil), rafine zeytinyağı (refined olive oil), riviera (pure olive oil) ve çeşnili zeytinyağıdır. Natürel zeytinyağları kendi içinde üç alt gruba ayrılmış, natürel sızma (extra virgin olive oil), natürel birinci (virgin olive oil), ve ham zeytinyağı (lampant) olarak adlandırılmıştır. Natürel sızma zeytinyağı; kokusu ve tadında kusur olmayan, doğrudan tüketime uygun, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok %0,8 olan doğal zeytinyağıdır (Anonim, 2010).

Çizelge 1.1. Avrupa Birliği ülkeleri ve Türkiye’de zeytinyağı üretimi, tüketimi ve kişi başı tüketimi (kg) (Anonim, 2013a)

Yıl	Üretim /1000 ton		Toplam tüketim /1000 ton		Kişi başı tüketim (kg/kişi)	
	A. B	Türkiye	A. B	Türkiye	A. B	Türkiye
1990	993,7	80	1,2145	55	3,3	1
2013	2,308	180	1,748	150	5	1
2016	2322	177	1,414	130	6,6	2

İstatistiklere (Çizelge 1.1) göre ülkemizde kişi başına tüketilen zeytinyağının tüm bitkisel yağ tüketimi içindeki oranı %8 iken bu oran İtalya’da %52,3 İspanya ’da %36,2’dir. Diğer Akdeniz ülkeleri ile karşılaştırıldığında zeytinyağı tüketiminin az olması, ülkemizde zeytinyağının insan sağlığına katkısı ve diğer bitkisel yağlara daha üstün niteliklere sahip olduğu gerçeğinin yeterince anlaşılmadığının bir göstergesidir (Anonim, 2013).

1.1.1. Sızma Zeytinyağı

Serbest radikaller ve oksidatif stres günümüzdeki birçok kronik hastalığın en önemli araçları olarak bilinmektedir. Bu nedenle insanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen antioksidan özellikteki gıdaları günlük diyetlerinde tüketmeye başlamışlardır. Son yıllarda Akdeniz diyeti ve bu diyetle yer alan gıdalar, sağlık üzerine önemli fizyolojik etkilerinden dolayı kapsamlı olarak araştırılmaktadır. Zeytin ve sızma zeytinyağı Akdeniz tarzı diyetin temelini oluşturmaktadır. Sızma zeytin yağının; lipid profilini, insülin direncini, lipid ve DNA oksidasyonunu, yangıyı, endotelial fonksiyonları, trombotik faktörü ve kan basıncını sağlığa olumlu yönde değiştirdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Barbaro ve ark., 2014; Bozdoğan ve Altan, 2008; Covas ve ark., 2015 ve Omar, 2010a).

Sızma zeytinyağı, zeytin meyvesinin direkt preslenmesi veya santrifugasyonu ile rafinerizasyon gerçekleştirilmeden elde edilir. Beslenme ve sağlık için önemli bir

kaynak olan sızma zeytinyağı, peroksidasyona dirençli oleik asit ve dengeli miktarda çoklu doymamış yağ asidi ve çok miktarda doğal antioksidan içerir. Sızma zeytinyağı polifenoller, α - tokoferol, fosfolipidler, karotenoidler, klorofiller ve steroller gibi çok sayıda yararlı bileşikler ile skualen ve terpenonidler içermektedir (Bozdoğan ve Altan 2008; Kalogeropoulos, 2010).

Çizelge 1.2. Zeytinyağının bileşimi (Türkoğlu ve ark., 2012; Anonim,2013b)

Zeytinyağı 100 gr (109 ml)	
Enerji	885 kcal
Karbonhidrat	0
Yağ	100 gr
- doymuş	14 gr
- tekli doymamış	73 gr
- çoklu doymamış	11 gr
. Omega 3	1,5 gr <
. Omega 6	3,5-10 gr
Protein	0
Vitamin E	14 mg (%93)
Vitamin K	62 μ g (%59)

Zeytinyağının kimyasal yapısı tekli doymamış (MUFA) ve çoklu doymamış (PUFA) yağ asitlerinden oluşur. Bu bileşim kardiyovasküler hastalıklardan koruma ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyonunu azaltır. Zeytinyağının besin değerleri içinde doymuş yağ asidi oranı %11,38 iken, %68,21'lük kısmını MUFA, %9,89 PUFA oluşturmaktadır (Çizelge 1.2.) (Cicero ve ark., 2008; Pedersen ve ark., 2000 ve Penalvo ve ark., 2016).

Zeytinyağı farklı metodlarla üretilmekte ve üretim tekniğindeki farklılık zeytinyağının bileşimini ve sağlık üzerine olumlu etkilerini değiştirmektedir. Mekanik yöntemle elde edilebilmeleri nedeniyle naturel olanlar zeytinyağının en doğal ve en faydalanılabılır halidir. Naturel zeytinyağının %98-99'luk kısmı yağ asitleri ve gliseridlerden, %1-2'lik kısmı sabunlaşmayan ve minör bileşenler olarak ifade edilebilecek yapılardan oluşmaktadır (Çizelge1.3). Rafinasyon sırasında suda çözünen

bileşenler kaybolmaktadır. Oysa naturel zeytinyağında bu bileşenlere yüksek oranda rastlanmakta ve olumlu etkileri ortaya çıkmaktadır (Covas ve ark., 2015; Mackenbach, 2007 ve Omar, 2010b).

Çizelge1.3. Sızma zeytinyağının bileşenleri (Anonim, 2013b ; Cert ve ark., 2000; Kiritsakis ve Min, 1989)

Sızma zeytinyağı		
Major Bileşenler (%99) (Sabunlaşan Maddeler)	Minör Bileşenler (%1) (Sabunlaşmayan Maddeler)	
Yağ asitleri	<u>Fenolik bileşikler (30-500 mg/kg)</u> Hidroksitirozol Tirozol Oleuropein Ligstirozid	<u>Aroma bileşenleri</u> 200-500 mg/kg
<u>Tekli doymamış (MUFA) (%56-83)</u> Oleik asit Palmitooleik asit	<u>Alfa-tokoferol (12-150 mg/kg)</u>	Fosfolipidler (40-135 mg/kg)
<u>Çoklu doymamış (PUFA) (%1,5-20)</u> Linoleik asit Linolenik asit	<u>Steroller (18-26 mg/kg)</u> Beta sitasterol (%96) Kampasterol (%3) Stigmasterol (%1)	Alifatik alkoller (0,29 mg/kg)
<u>Doymuş (%0,5-20)</u> Palmitik asit Stearik asit	<u>Hidrokarbonlar (0,75 mg/kg)</u> Squalen, Beta Karoten	Triterpenik alkoller (0,25 mg/kg) Siklo artenol
Gliseridler Oleik- Oleik- Oleik Palmitik- Oleik-Oleik Oleik-Oleik-Linoleik Stearik- Oleik-Oleik	<u>Pigmentler</u> Klorofil (1-10 mg/kg) Feofitin (0,2-24 mg/kg)	

Depolama sırasında sızma zeytinyağındaki yağ asitleri oksidatif parçalanmaya uğrar ve hidroksiperoksid gibi kokusuz moleküller ve onların ikincil ürünleri ortaya çıkar. Lipit oksidasyonu lipidlerin moleküler oksijen (O₂) ile kendi katalizledikleri mekanizma ile gerçekleşir. Bu reaksiyonun aktivasyon enerjisinin yüksek olması ile birlikte lipit oksidasyonunun başlaması, hidroksiperoksidleri kullanan bakır ve demir gibi metal katalizörlerin ortamda bulunması veya ışığa maruz kalma ile yağın yapısının bozulması hızlanır. Sızma zeytinyağının oksidatif zarara karşı dayanıklılığı başlıca

MUFA/PUFA oranı ve minör komponentlerin varlığı ile ilgilidir. Minör polar komponent (MPC) varlığı zeytinyağını oksidasyona karşı korur. Bu özellik diğer yağlara göre sızma zeytinyağının daha uzun raf ömrü olmasını, besleyici ve lezzetsel özelliklerini daha uzun süre korumasını sağlar. Yağın içeriğindeki fenolik maddeler radikal bağlama, hidrojen atom transferi, metal şelasyon gibi çeşitli mekanizmalar ile oksidasyonu engeller. Ortamda bakır gibi metallerin bulunması dekarboksimetil oleuropein aglikonun izomer formlarında önemli bir azalmaya neden olarak zeytinyağının antioksidan özelliğine zarar verir. Depolama sırasında zeytinyağının metal kaplarda saklanması olumsuz bir duruma neden olur. Bu nedenle zeytinyağının cam kaplarda saklanması oleuropein aglikon düzeyinin korunmasını sağladığı için daha güvenlidir (Bendini ve ark., 2006; Covas ve ark., 2015 ve Deiana ve ark., 2007).

Zeytinyağında bulunan o-difenolik ve monoterpenik çoklu fonksiyona sahip fenolik bileşikler lezzetsel ve duyuşsal özellikleri etkiledikleri gibi ürünün tazeliğini de etkilemektedirler. Biofenoller zeytin tanesinin ve zeytinyağının stabilitesini ve organoleptik özelliklerini sağlar (Bianco ve Uccella, 2000). Monoterpenler içeren bileşiklerin antibakteriyel etkileri olduğu bildirilmektedir (Kubo ve ark., 1995).

Zeytinyağında bulunan yağ asitleri ve gliserol suda hemen hemen hiç çözünmeyen nonpolar hidrokarbon taşıyan hidrofobik lipitlerdir. Adipoz dokuda depolanırlar ve biyolojik zarların önemli yapı taşları olarak görev yaparlar (Harper, 2004). Epidemiyolojik çalışmalar Akdeniz tarzı beslenmenin kardiyovasküler hastalık riskinde azalma ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Covas ve ark., 2015 ve Hashmi ve ark., 2015).

Doymuş yağ içeren diyetle karşılaştırıldığında, Akdeniz tipi yemeklerin hazırlanmasında kullanılan yağın oleik asitten zengin sızma zeytinyağı olduğu görülür. Akdeniz tarzı diyetle özellikle sızma zeytinyağının çiğ olarak sıkça tüketilmesinin içeriğindeki oleik asit ve benzeri doymamış yağ asitlerine bağlı olarak kan lipit düzeylerini dengelediği ve kan basınçlarını düşürdüğü bildirilmektedir (Castaner ve ark., 2012; Covas ve ark., 2006; Fito ve ark., 2007; Hashmi ve ark., 2015 ve Priora ve ark., 2008). Trichopoulou ve ark. (1995), Yunanistan 'da yaptıkları bir çalışmada her gün bir kereden fazla sızma zeytinyağı tüketen kadınlarda meme kanseri riskinin %25'den az olduğunu bildirmişlerdir.

Sızma zeytinyağı diğer bitkisel yağlara göre yüksek miktarda MPC içerir. Minör polar komponentler iki şekilde sınıflandırılır. Bunlar 1- saponize edilemeyen (sabunlaşmayan) bileşikler (skualen, steroller, triterpenenler ve pigmentler) 2- yağın saponifikasyondan sonra solventinden elde edilen fenolik komponentler'dir.

Zeytinyağındaki fenolik madde miktarları elde edildiği zeytin ağacının türü, yetiştiği yer, tarımsal yetiştirme şekli, hasat zamanı, iklim koşulları, olgunlaşma ve depolama koşulları ve işleme yöntemi gibi birçok faktör ile yakından ilgilidir. Zeytinyağlarının kalitesine etki eden faktörlerin etki derecesine bakıldığında zeytinin olgunluk derecesinin %50, zeytinin hasat tekniğinin %30, yağ çıkarma sisteminin %15, muhafaza şeklinin ise %5 etkili olduğu görülür. Bunun yanı sıra yağın fenollerden zengin olması besinsel ve biyolojik etkinliğini artırıcı bir özelliktir (Alkın, 2003; Covas ve ark., 2015 ve Öztürk ve ark., 2009). Sızma zeytinyağındaki toplam fenolik bileşenlerin miktarı değişik yazarlar tarafından bildirilmiştir (Çizelge 1.4).

Sızma zeytinyağında en az 30 farklı fenolik bileşik vardır. Başlıca fenolik bileşikler; tirosol (p-hidroksi-fenil etanol), hidroksitirosol (HT) [2, (3, 4-dihidroksyfenil) –etanol] bu fenollerin konjuge ürünleri ile elenolik asit, ligstrozit ve oleuropeindir. Bitkisel polifenollerin temel karakteristik yapısı bu bileşiklerin bir veya daha fazla hidroksil gruplarını bağlayan aromatik halka içermeleridir. Bitkisel polifenoller flavonoid ve flavonoid olmayanlar olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Polifenoller bitki tarafından sentezlenen ve bitkiyi enfeksiyona, strese, ultraviyole ışına, patolojik veya fiziki zarara karşı koyucu etki gösteren bileşiklerdir (Stagos ve ark., 2012). Sızma zeytinyağındaki toplam sterol miktarı rafinerizasyon işlemi ile 1/3 oranında, fenolik bileşiklerin ise %80 oranında azaldığı bildirilmektedir (Boskou 1996; Owen ve ark., 2000a ve Owen ve ark., 2000b).

Çizelge 1.4. (^a Owen ve ark., 2000b, ^b Prioara ve ark., 2008, ^c Bendini ve ark., 2006, ^d Patrick L 2006, ^e Kelebek ve ark., 2012, ^f Tanilgan ve ark., 2007 [gallik asit eşdeğeri])

Toplam fenolik bileşen (mg/kg)	130-350 ^a	213 ^b	171 ^c	62 ^d	63,3-97,1 ^f
Hidroksitirozol	14,42 ^a	5,4 ^b	5,93 ^c	1,74 ^d	3,21 ^e
Tirozol	27,45 ^a	4,0 ^b	3,40 ^c	2,98 ^d	0,85 ^e
Sekoiridoidler	27,72 ^a	67,3 ^b	72,8 ^c	9,30 ^d	-
Lignanlar	41,53 ^a	36,1 ^b	7,29 ^d	-	-
Kafeik asit	0,08 ^e	-	-	-	-
Apigenin	5,40 ^e	-	-	-	-
Luteolin	1,28 ^e	-	-	-	-

Bunun yanı sıra yağın fenollerden zengin olması besinsel ve biyolojik etkinliğini artırıcı bir özelliktir. Son yıllarda araştırmacılar fenollerin reaktif O₂ aracılı dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkisi üzerine odaklanmışlardır. Fenolik komponentlerin serbest radikalleri bağlama kapasiteleri oldukça yüksektir. Özellikle kimüs ile bağırsağa ulaşan moleküllerin serbest radikal üretici bir ortam oluşturması, zeytinyağının içerisindeki emilemeyen fenolik bileşiklerin lokal bir antioksidan görevi görerek reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürücü etkinliği ile giderilir. Emilemeyen fenolik bileşenler intestinal epitel hücrelerini de etkilerler, böylece gastrointestinal sistemde antioksidan etki gösterirler (Andreadou ve ark., 2007; Carluccio ve ark., 2003; Fito ve ark., 2007; Manna ve ark., 1999; Omar, 2010b ve Owen ve ark., 2000a).

Zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler şunlardır: (Fito ve ark., 2007; Owen ve ark., 2000b; Serra ve ark., 2012 ve Stagos ve ark., 2012)

- ❖ Basit fenoller (fenil alkoller); [HT, (3,4-dihidroksifeniletanol)] ve tirozol,
- ❖ Polifenoller; zeytin ve zeytin ürünlerinde bulunan Oleuropein glikozidleri,

- ◆ Flavonoidler: (Flavon grubu) (Apigenin, luteolin, apigenin 7-O-glikozid, rutin ve luteolin 7-O-glikozid) dir.
 - Sekoiridoid (SID) ler: Elenolik asit, Oleuropeinin dialdehidik formu (SID1, 3, 4-DHPEA-EDA), karboksimetil grubu eksik ligstrozit (SID2), oleuropeinin aglikon formu olan oleuropein glukozid (SID3, 3,4-DHPEA--EA), ligstrozit (SID4) ve oleasin,
 - Lignanlar; (+)-pinorezinol ve (+)-1-asetoksipinorezinol
- ◆ Flavonoid olmayanlar: Bir ya da daha fazla hidroksil grubu bulunduran aromatik halka içerirler.
 - Fenolik asitler: Vanilin, p-kumarik asit, vanilnik asit, gallik asit, kafeik asit ve sirinjik asit

Ülkemizde yetişen en önemli zeytin çeşitlerinden biri olan Gemlik zeytininden elde edilmiş olan sızma zeytinyağında HT, 4-hidroksibenzoik asit, tirozol, 2,3-dihidroksibenzoik asit, kafeik asit, vanilik asit, sirinjik asit, vanilin, p-kumarik asit, ferulik asit, luteolin, apigenin ve sinamik asit gibi antioksidan maddelerin varlığı bildirilmiştir. Gemlik sızma zeytinyağındaki tirozolün 9,85 mg/kg, apigeninin 5,40 mg/kg ve HT'nin 3,21 mg/kg olduğu ve bu fenolik bileşiklerin sızma zeytinyağında antioksidan kapasiteyi artırdığı saptanmıştır (Goncalves ve ark., 2016 ve Kelebek ve ark., 2012).

Depolama sırasında sızma zeytinyağının içerisindeki SID'ler hidrolize olarak HT ve tirozol moleküllerini oluştururlar. HT etkili bir antioksidan olup LDL'yi oksidasyondan korur, Deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarını engeller, prostaglandin E₂ sentezini bloke ederek siklooksigenaz (COX-2) ve 5-lipoksigenaz aktivitesini durdurur ve kronik inflamasyonla ilgili hastalıkları ve kanseri önleyici etki gösterir (Warleta ve ark., 2011).

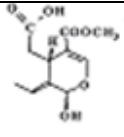
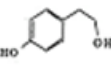
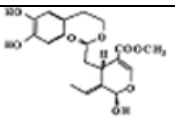
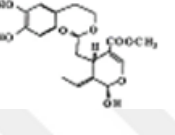
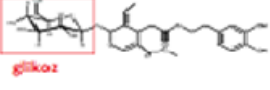
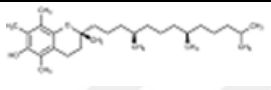
Beyinin yaşlanma süreci, nöron yangısı ve mikrogial aktivasyonun seviyesinin azalması ile karakterizedir. Tüm bu değişiklikler motor ve bilişsel performansın zayıflaması ile ilgilidir. Oksidatif stres ve yangı gibi patolojik süreçler farmakolojik tedaviler ve potansiyel aktif komponentlerle desteklenmiş gıdalarla engellenebilir.

Sızma zeytinyağında bulunan fenolik bileşenler ve MUFA gibi bileşenlerin yaşlanma ile ilgili süreçleri düzenleme özelliğine sahip oldukları, sızma zeytinyağı ve bileşenlerinin COX-1 ve COX-2 inhibisyonu yolu ile prostaglandin sentezini engelledikleri ve LDL'yi oksidasyondan korudukları belirlenmiştir (Pitozzi ve ark., 2012 ve Virruso ve ark., 2014).

Polifenollerle beslenme kanser ve koroner kalp hastalıkları ile ilgili mortalite oranlarını düşürmektedir. Antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri; endotelial disfonksiyonun ve lipit profilinin düzeltilmesi diyetle alınan polifenollerle ilgilidir. Son çalışmalar Akdeniz tarzı sağlıklı yaşamın fitokimyasallar ve yağ asitlerinin sinerjik kombinasyonu ile ilgili olabileceğini ortaya koymaktadır (Covas ve ark., 2006 ve Hashmi ve ark., 2015).

Ek olarak 3,4-dihidroksifenil-etanol (hidroksitirozol), luteolin ve oleuropein gibi MPC, trombosit agresyonunu farklı oranlarda inhibe ettikleri in vitro olarak gözlenmiştir. Son zamanlarda fenolik bileşikler gibi vitamin olmayan antioksidanlar üzerine olan çalışmalar artmıştır (Covas ve ark., 2015 ve Priora ve ark., 2008). Bu fenolik bileşikler çok sayıda bitki türünde bulunmakla beraber daha yüksek oranda sızma zeytinyağında bulunmaktadır (Çizelge 1.4). Akdeniz tarzı beslenmenin karakteristik özelliği kullanıma uygun hale getirilmiş zeytinyağıdır ve bunun kolorektal karsinom oluşumunu azalttığı bilinmektedir. İnsan ve hayvan hücre kültürü ile yapılan çalışmalar da sızma zeytinyağının çeşitli seviyelerde hücre kültürüne eklenmesinin karsiyogenesiz ve metastazı durdurma etkisi olduğu gösterilmiştir. HT115 insan kolon karsinoma hücreleri ile yapılan çalışmada sızma zeytinyağının anti-invazif etki gösterdiği bildirilmiştir (Antunes ve ark., 1999 ve Hashim ve ark., 2008).

Bazı çalışmalarda fenollerden zengin sızma zeytinyağının ılımlı dislipidemik hastalarda serum tromboksan B₂ seviyesini azalttığı bu etkinin sağlıklı bireylerde gözlendiği ve bu etkinin oluşmasında sızma zeytinyağının içeriğindeki fenollerin yoğunluğunun önemli olduğu bildirilmiştir. MPC yoğunluğundaki kalitatif ve kantitatif farkların sızma zeytinyağının farklı biyolojik etkilerinden sorumlu olduğu gözlenmiştir. Farklı bölgelerden elde edilen sızma zeytinyağının farklı fenol konsantrasyonuna sahip olduğu bilinmektedir (Priora ve ark., 2008).

YAPI	ISIM	ANTIOKSIDAN ÖZELLİK
	Elenolik asit	Yok
	Tirozol	Yok
	Hidroksitirozol	Kuvvetli antioksidan
	Oleuropein aglikan	Kuvvetli antioksidan
	Oleuropein	Antioksidan
	α-tokoferol	Antioksidan

Şekil 1.1. Polifenolik bileşikler ve yapısı (Omar , 2010a)

Hidrojen peroksidaz ve ksantin oksidazla oluşturulan oksidatif stres, 100-500 µmol/L konsantrasyonda HT tarafından tamamen inhibe edilir, aynı dozda (500 µmol/L) tirozol ise etki göstermemiştir. HT antioksidan etkisinin fenol halkasındaki iki adet hidroksi grubundan kaynaklı olduğunu bildirmektedirler (Şekil 1.1) (Owen ve ark., 2000a). Yapılan çalışmalarda HT oleuropein aglikon ve dekoaboksimetil-oleuropein aglikonun α-tokoferolden daha etkili antioksidan özelliğe sahip olduğu önerilmektedir (Bendini ve ark., 2006; Owen ve ark., 2000a). HT, oleuropein ve bunların aglikon şekilleri 3-4 DHPEA –EA (3-4 dihidroksipentil etenol-elenolik asit) ve 3-4 DHPEA-EDA (3-4 dihidroksipentil etenol-dialdehit) sızma zeytin yağında önemli miktarda bulunur ve bunlar toplam fenolik bileşiğin % 55’ini oluştururlar (Pavia-Martins ve ark., 2009). Zeytin ağacı yaprağı doğal olarak antimikrobiyal ve böcek saldırılarına dirençli olarak bilinir. Bu sebeple araştırmacılar zeytin ve zeytinyağının anti-mikrobiyolojik etkilerine odaklanmışlardır. Oleuropein ve HT’nin

bakteriyel ve mantarsal büyümeyi geciktirdiği veya inhibe ettiği bilinmektedir. Bisignano (1999), çalışmada insan solunum yolları ve özellikle intestinal kanalında oluşabilecek bakteriyel enfeksiyonların engellenmesinde zeytin ve zeytinyağından yararlanılabileceğini göstermiştir.

Zeytinyağında yüksek dozda oleasin bulunur. Olesaein, zeytin meyvesinin ezilmesi sırasında ortaya çıkan iç glikozidazlar sayesinde oleuropeinin hidrolizlenmesi ile oluşur. Czerwinska ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada daha önce antioksidan özelliği bilinmeyen oleuropein derivatı olan olesasein antioksidan etkisi olduğunu in vitro olarak ortaya koymuşlardır. Lipopolisakkartillerle uyarılan monositlerde oleuropein ve oleasin moleküllerinin süperoksit anyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve peroksi nitrit ROS oluşumunu antioksidatif etkinlik göstererek engellediğini bildirmişlerdir. Sızma zeytinyağındaki çok sayıda sekoiridoid derivatları ve onların basit fenolik şekilleri olan HT ve tirozol halinde polifenoller bulunmaktadır. HT, oksidasyondan in vitro ve in vivo koşullarda LDL'yi farklı tip hücreleri ve H_2O_2 ile oluşturulmuş oksidatif stresten insan alyuvar ve renal epitelyum hücrelerini koryuduğu gösterilmiştir (Deiana ve ark., 2010).

Bitkisel yağların içeriğindeki squalen ve fitositerol miktarları yağın, insan ve hayvanlardaki biyolojik etkinliğini belirleyen önemli bileşiklerdir. Sızma zeytinyağının bir diğer önemli bileşeni hidrokarbonlar grubundaki bir triterpen olan squalendir. Squalen zeytinyağında %0,2-0,7 oranında bulunur. Squalen miktarı zeytinyağında 3651 mg/kg (Pedersen ve ark., 2000), 2900 mg/kg (Owen ve ark., 2000b) ile 5732 mg/kg (Mangas-Cruz ve ark., 2001) iken diğer bitkisel yağlarda 175 mg/kg (Mangas-Cruz ve ark., 2001) ile 10-134 mg/kg (Pedersen ve ark., 2000) arasında değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde squalen tüketimi günlük 30 mg iken zeytinyağı tüketen toplumlarda 200-400 mg kadardır. Çeşitli kanser türlerinin bu toplumlarda görülme sıklığının az olmasının squalen tüketimiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Chugh ve ark., 2003). Squalenlerin çeşitli hayvan modellerinde kolon, akciğer ve deri tümörlerini inhibe edici rol oynadığı gösterilmiştir (Waterman ve Lockwood, 2007). Squalenlerin kolesterol sentezinde önemli bir rol oynaması sebebiyle squalen epoksidaz veya squalen sentetazı inhibe ederek kolesterol sentezinin azaltılabileceği değerlendirilmiştir (Chugh ve ark., 2003).

Sızma zeytinyağında bulunan steroller bağırsak duvarından kolesterol emilimini engelleyerek plazma LDL ve kolesterol konsantrasyonlarını azaltırlar. Günde 2 gr sterol alımının plazma LDL düzeyini % 9-14 seviyesinde düşürdüğü bildirilmiştir (Covas ve ark., 2006). Sızma zeytinyağında bulunan bir diğer bileşen tokoferollerdir. E vitamini olarak da bilinen α -tokoferolün beslenmede önemli bir role sahip olduğu, kanser ve arteroskleroz gibi serbest radikal hasarıyla oluşan dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Bozdoğan Konuşkan ve Altan, 2007).

Sızma zeytinyağında bulunan polifenollerin kemik metabolizmasını etkiledikleri bildirilmiştir. Osteoporez, kemik dokusundaki mikro yapının bozulması ve kemik kütlesinin azalması ile sonuçlanan sistemik bir kemik hastalığıdır. Overiohisteroktemi yapılmış farelere verilen sızma zeytinyağı ve vitamin D'nin oksidatif hasarı ve kemik mineral yoğunluğunu korumada yardımcı olduğu ortaya konmuştur (Tagliaferri ve ark., 2014).

Tüm dünyada görülen Vitamin D eksikliği için sızma zeytinyağı ile zenginleştirilmiş yağların omega 3 takviyesinden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Buna rağmen CaCo-2 hücre kültürü ile yapılan çalışmada sızma zeytinyağının vitamin D' nin alımını azalttığı gösterilmiş olup bu etkinin polifenollerden olmadığı, pinorezinolden kaynaklandığı bildirilmiştir (Goncalves ve ark., 2016).

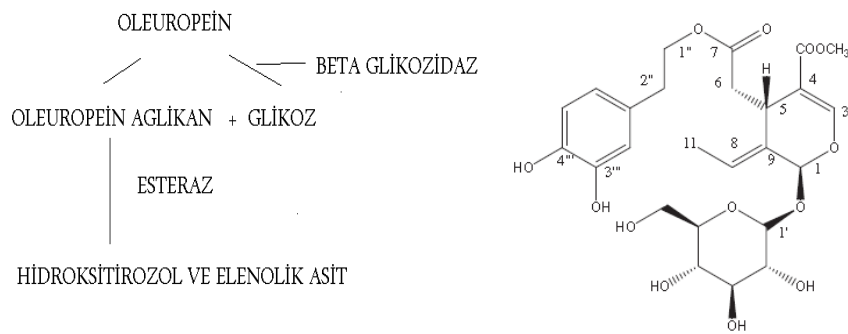
1.1.2. Zeytin Ağacı Yaprığı ve Özellikleri

Zeytin ağacı yaprağı özütü, belirgin fenolik kompozisyonun etkin biyolojik aktivitesi sebebiyle farklı disiplinlerden çok sayıda bilim adamı tarafından araştırılmaktadır. Zeytin ağacı yaprağı ilk olarak antik mısırdaki medikal amaçlı kullanılmıştır. Mide bulantısına karşı kuvvetli savunma etkisinin olmasıyla tanınmış ve çok sayıda bilimsel çalışmada bu özütün faydalı özellikleri bildirilmiştir. Zeytin ağacı yaprağı özütünün yararları hakkındaki yayınlarda kan basıncını düzenlediği, kardiyovasküler sistemi ve immun sistemi desteklediği belirtilmektedir (Kontogianni ve Gerothanassis, 2012; Lepore ve ark., 2015 ve Marchetti ve ark., 2015).

Akademik bulgular zeytin ağacı yapraklarının terapötik özellikleri ile ilgili çalışmaların 19. yüzyılın 2. yarısına kadar uzandığını göstermiştir. Zeytin ağacı özütünün hipertansiyonda pozitif etkisinin olduğu Scheller tarafından ortaya konmuştur. Geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalar polifenollerin kansere karşı koruyucu etkisinin olduğuyla ilgili kanıtlar sunmaktadır (Boualluga ve ark., 2011 ve Roleira ve ark., 2015). On dokuzuncu yüzyılın sonlarında fenolik bileşik olan oleuropein, zeytin ağacı yaprağından izole edilmiştir. Zeytin ağacının hastalıklara kuvvetli direnç göstermesinin kaynağı olarak düşünüldü. Akdeniz bölgesinde, zeytin ağacı yaprağı zeytin üreticilerinin bir yan ürünüdür. Zeytin ağacı yaprağı miktarı ağacın meyvesinin %10'nu kadardır. Zeytinyağı endüstrisinde zeytinyağı kadar zeytin ağacı yaprağı bol miktarda elde edilmektedir (Jemai ve ark., 2009).

Zeytin ağacı yaprakları, büyük antioksidan kapasiteye sahip olmasına rağmen zeytincilik endüstrisinde ve tarımda değerlendirilemeyen bir yan üründür. Son çalışmalar zeytin ağacı yaprağı özütünün tek başına ya da diğer fenolik bileşikler ile antioksidan ve anti-mikrobiyal (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*) aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Zeytin ağacı yaprağı Avrupa ve Akdeniz adaları ile şehirlerinde yüzyıllardır geleneksel tıp ürünü olarak kullanılmıştır. Zeytin ağacı yaprağı tarihte sıtma ateşinin tedavisinde kullanılmıştır (Lee ve ark., 2010). Oleuropein sekoiridoid grubuna ait olup *Oleaceae*, *Gentianaceae comalea*, ailelerinin yanı sıra çok sayıda bitki türünde bulunur. *Oleaceae* ailesindeki sekoiridoidler bir tür glikozid oleosidir. Bunlar elenolik asit ve glikozidik kalıntıların birleşimidirler. Oleuropein [2-(3,4 dihidroksifeniletanol)] etanol esteri olan hidroksitirozol, *Oleacea* familyasındaki bitkilerde bulunan sekoiridoid glikozidlerinde ortak olan oleosidik iskeletten oluşmuştur (Omar, 2010b ve Roleira ve ark., 2015).

Zeytin ağacı yaprağı özütünün temel aktif komponenti, sekoroid grubunun doğal üyesi olan oleuropeindir. En önemli fenolik komponent olup kuru meyvenin yaklaşık %14' ünü oluşturur. Oleuropeinin hidrolizi ile diğer elenolik asit ve 3-4 dihidroksi feniletanol gibi biyoaktif substratlar oluşur. Oleuropeinin hidrolizi elenolik asit ve HT'yi içeren iki biyoaktif ürün oluşturur (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Oleuropein kimyasal yapısı (Al-Azzawie ve ark.,2007; Omar 2010)

Oleuropein, fenolik bir antioksidan olmakla birlikte zeytin ağacı yaprağı ve zeytinyağında yüksek miktarda bulunur. Bu karmaşık fenol; hidroksitirozol ve elenolik asit glikozid ya da olureupein aglikon ve glikoza hidrolize edilebilir. Oleuropein ve oleuropein derivatları çeşitli biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Antiinflamatuvar ve antitrombolitik aktivite gösterirler. Bu polifenoller LDL'yi oksidasyondan korur, trombosit agresyonunu inhibe eder ve lipooksijenaz enzimini inhibe ederek eikosanoid üretimini baskılar. Yaprakta bulunan bu maddeler zeytinin çeşidine, yetiştiği bölgeye ve hasat zamanına göre farklılıklar gösterirler (Hashmi ve ark., 2015 ve Jemai ve ark., 2009).

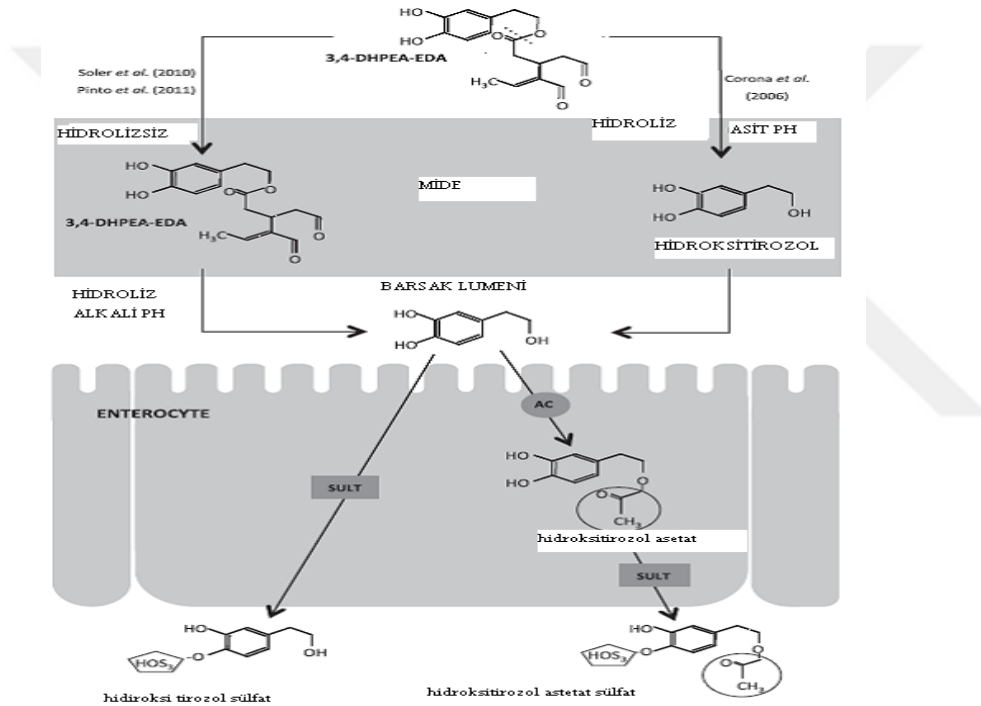
Oleorupenin, zeytin ağacı yaprağındaki miktarı ağacın bölgesine, türüne, hasat zamanına göre değişiklik göstermekte olup zeytin ağacı yaprağında farklı miktarlarda bulunmaktadır (Çizelge 1.5.).

Çizelge 1.5. Çeşitli bölgelerdeki zeytin ağacı yaprağındaki oleuropein miktarları (Bendini ve ark., 2006; Kelebek ve ark., 2012)

Ülke	Zeytin ağacı yaprağındaki oleuropein miktarı (mg/kg)
Fransa (Aglandau)	9,27
Fransa(Lucques)	13,43
Tunus	12,91
Türkiye	20.01

Bitkilerde bulunan beta glikozidazlar glikosidik bağları hidrolize ederek temel biyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Özellikle beta glikosidaz /beta glikozid sistem bitkinin böceklere ve strese karşı etkili kimyasal savunmasıdır. Bitki yaprağı

herbivorlar tarafından yenilip dokusu yıkımlandığında organellerdeki özgün beta glikozidazlar oleuropeini aktive ederler. Kuvvetli bir denaturant olan oleuropein proteinlerle çapraz bağ yapıp lizin aktivitesini azaltır. Yağdaki beta glikozidaz ve beta glikosidazlar etkileşen oleuropeinin taze zeytin meyvesindeki ve yağdaki acı tadı ortadan kaldırdığı bulunmuştur (Wang ve ark., 2009). Sızma zeytinyağında bulunan oleuropein derivatı olan 3-4 DHPEA-EDA diyetle alındığında sindirim kanalında hidrolize edilerek HT'ye dönüşür. Enterositlerde sulfotransferaz enzimi ile faz II konjugasyon sonucu barsak ve karaciğerde HT sülfata dönüşür, hidroksitirozolasetat sülfat HT'nin plazmadaki ana metabolitidir (Şekil 1.3.) (Rubio ve ark., 2012).



Şekil 1.3. Oleuropeinin vücuttaki metabolizması (Rubio ve ark., 2012)

Yaprakta bulunan fenolik ve flavanoid bileşikler vücudun bağışıklık sistemini güçlendirip hastalıklara karşı dirençli olmasını sağlar. Oleuropein yaprağın en etken fenolik bileşiğidir. Bu bileşik aynı zamanda terapötik etkiye sahip sekoiridoit bir glikozittir (Owen ve ark., 2000a). Fenolik bileşiklerin kuvvetli hipotansif, hipoglisemik ve anti-oksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Oleuropeinin ROS'u temizlediği anti-tümöral etkili olduğu ve çok sayıda çalışmada hayvanlarda toksik etkisinin olmadığı ortaya konmuştur (Andreadou ve ark., 2007 ve Roleira 2015).

Zeytin ağacı yaprağının en etkili fenolik bileşeni olan oleuropein' in, malign mezotelyoma hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} düzeyini etkilediği gözlenmiş olup, oleuropein ile zenginleştirilmiş bileşenlerin farmakolojik olarak malign mezotelyoma hücrelerinde terapötik olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir (Marchetti ve ark., 2015).

Son zamanlarda polifenollerden zengin meyve, sebze, şarap, çay, kahve, çikolata ve meyve sularının insan sağlığı için önemi olan antioksidanlar için önemli bir kaynak olduğu kabul edilmiştir. Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada polifenollerden zengin diyet ile beslenmenin düşük mortalite ve koroner kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Jemai ve ark., 2009; Lepore ve ark., 2015 ve Omar 2010a; Patrick Lyn 2006a ve Pisoschi ve ark., 2015).

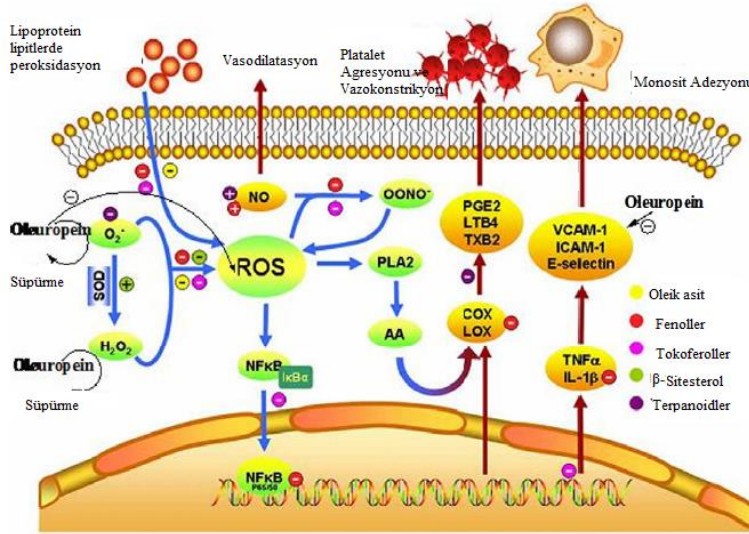
Son çalışmalarda zeytin ağacı yaprağının insan bağışıklık yetmezlik virüsüne (HIV-1) karşı güçlü engelleyici etkisinin olduğu bildirilmiştir. Oleuropein ve onun ana metaboliti olan HT anahtar anti-HIV bileşenidir. Bunlar HIV-1'in hayat siklusunda birçok evreye karşı etkilidir, hücreden hücreye HIV-1 geçişini ve viral kor antijen olan p24 üretimini engellediği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2007). Oleuropein O_2 temizleme kapasitesi ile ilişkili olarak çok çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir. Oleuropein'in *in vivo* olarak alkol kaynaklı olmayan yağlı karaciğer hastalığına karşı koruyucu etkisinin olduğu ortaya konmuştur.

Ayrıca oleuropein'in oksidatif strese cevap verdiği, lipit peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu sağladığı ve proinflamatuvar sitokin genlerinin ifadesini azalttığı görülmüştür (Kim ve ark., 2010). Son çalışmalarda oleuropeinin yüksek yağ asidi diyeti ile şekillendirilmiş hepatik steozda ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalıklarında hepatoprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur. Oleuropein ve onun derivatı olan HT'nin rat mikrozomlarında lipit peroksidasyonunu engelleyebildikleri gösterilmiştir (Barbaro ve ark., 2014 ve Domitrovic ve ark., 2012).

Yapılan çok sayıdaki çalışmada, oleuropein ve derivatlarının dejeneratif hastalıkların gelişmesinde koruyucu etkisinin olabileceği değerlendirilmiş olup, bu etkisini mitokondirial DNA'yı oksidatif hasardan koruyarak gerçekleştirdiği ileri

sürülmüştür. Oleuropeinin dopaminerjik nöron kaybını engellediği ve bu durumun Parkinson hastalığı için yeni bir umut olabileceği bildirilmiştir. Oleuropeinin altı ay boyunca ağız yoluyla 50 mg /kg olarak verildiği ratlarda, ortabeyindeki lipid peroksidasyon, ile birlikte aynı zamanda süperoksit dizmutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) seviyesini de kontrol grubuna göre artırdığı gözlemlenmiştir. (Barbaro ve ark., 2014; Pitozzi ve ark., 2012; Sarbishegi ve ark., 2014 ve Virruso ve ark., 2014).

Stresle diyabet oluşturulmuş ratlarda oleuropeinin hiperglisemiye inhibe ettiği, LDL oksidasyonuna direnci artırdığı, MCF-7 kanser hücrelerinde apoptopsizi artırarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, osteblastogenesizi artırdığı ve insan hepatoma hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğu ortaya konmuştur (Drira ve ark., 2011).



Şekil 1.4. Oleuropeinin antioksidan metabolizması (Omar 2010a)

Oleuropeinin önemli antioksidan etkinlik gösterdiği ve bu özelliğini bakır ve demir gibi metal iyonlarını bağlama, serbest radikal oluşturan reaksiyonları katalizleme ve çeşitli inflamatuvar enzimleri engelleme yoluyla gösterdiği ortaya konmuştur (Şekil 1.4.). Zeytinyağındaki oleik asit, oleuropein, β-sitosterol SOD aktivitesini artırarak hücre içindeki ROS ve NO· radikallerinin süpürülmesini sağlar. Serbest oksijen radikalleri plazmada inaktif halde bulunan NFkB (Nükleer faktör

kappa B) aktive olmasını sağlayarak çekirdekte gen aktivitesinin değişmesine sebep olur. α - tokoferol, suksinat ve fenolik bileşikler NFkB' in harekete geçmesini engeller. Harekete geçen NFkB' in DNA' ya bağlanarak gen ifadesini başlatması çeşitli sitokinler lipoksigenaz (LOX) ve siklooksigenaz (COX) adezyon moleküllerini ve eikozanoid düzeylerini artırır (Bluota ve ark., 2011; Omar 2010a).

Akdeniz tarzı beslenme metabolik hastalıkları önlerken, oleuropeininde hepatik steozu önlediği belirlenmiştir. Standart, kafeterya ve oleuropein ile zenginleştirilmiş diyetlerle 15 hafta boyunca beslenen ratlarda, HDL seviyesindeki artışın düşük kaldığı, buna karşın LDL ve kolesterol seviyesi ile insülin duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir (Lepore ve ark., 2015).

1.2. Kurşun ve Kurşun Zehirlenmesi

Son yüzyıl süresince kayıtsız madencilik endüstrisi, fosil yakıtların kullanımı, üretimsel ve kentsel atıklar çok miktarda ağır metalin biyosfere salınmasına sebep olmuştur. Kurşun atmosferde indirgenemediği için atmosferde, yiyeceklerde ve organizmalarda birikerek çevreyi kontamine eder. Kurşun tüm memeliler için yüksek toksik etki gösteren bir ağır metaldir. (El Sokkary ve ark., 2005 ve He ve ark., 2016).

Kurşun nörolojik, hematolojik, gastrointestinal, reproduktif, vasküler, immünolojik, renal fonksiyon ve iskelet sisteminde patolojilere sebep olan ağır bir metaldir. Tüm toksik ağır metaller etkilerini oksidatif hasar verme şeklinde gösterirler. Çevresel ağır metallere maruz kalan ve gelişim bozukluğu gösteren çocukların kanların bu ağır metaller çok düşük düzeyde olsa dahi, zihinsel, işitsel ve bedensel gelişim bozukluğunun yanı sıra çocukların davranış problemleri ve hiperaktivite sorunu yaşadıkları gözlemlenmiştir. (Burm ve ark., 2016; Hızel ve Şanlı, 2006 ve Ravibabu ve ark., 2015).

Son in vivo çalışmalar kurşuna maruz kalan insanlarda veya hayvanlarda, lipit peroksidasyonun uyarıldığı ve anti-oksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin azaldığı ve ROS'un üretildiği gösterilmiştir. Bu durum oksidatif stresin kurşun

zehirlenmesindeki rolünü desteklemektedir (Gao ve ark., 2015 ve Haleagrahara ve ark., 2010).

Sonuç olarak ROS'un üretiminin kurşun zehirlenmesinde artması, zehirlenmenin uzun dönem zararlı etkisini ortadan kaldırmaya yardımcı olmak için vücutta antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğinin artırılması terapötik bir yaklaşım olarak benimsenmiştir. Bu anti oksidanların lipid peroksidasyonunu inhibe etmek ve serbest radikal ürünlerini temizlemek yolu ile hücreyi oksidatif zarardan koruduğuna inanılmaktadır (Haleagrahara ve ark., 2010 ve Pisoschi ve Pop, 2015).

1.2.1. Kurşunun Zehirleme Mekanizması ve Tedavi Yaklaşımları

Kurşun gibi bazı çevre kirleticilere uzun süre mesleki maruz kalmalar oksidatif strese neden olabilir ki bu, biyolojik sistemlerdeki istenmeyen etkilerin altında yatan bir mekanizmadır. Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir (Ahamed ve ark., 2005 ve Dua ve ark., 2016). Toksik metaller serbest radikal üretimini arttırmak suretiyle antioksidan koruyuculuk düzeyini azaltırlar. Kurşun, toksisitesini iki ayrı yolla gösterir. Birinci yol, hidroperoksitler, O₂ radikalleri ve hidrojen peroksidaz gibi ROS'un meydana gelmesi, ikincisi ise antioksidan kapasitenin azaltılmasıdır (Patrick Lyn, 2006a). Kurşun zehirlenmesi hücresel düzeyde oksidatif hasara sebep olur. Akut kurşun zehirlenmesinde, Hb sentezi olumsuz yönde etkilenecek alyuvar yapımını ve alyuvar morfolojisinden başlayarak alyuvarların yaşam süresine kadar varan bozulmalar meydana gelir. Kurşun sülfidril grubu taşıyan birçok enzimin çalışmasını engelleyerek hücrede antioksidatif mekanizmaların bozulmasına neden olur (Dua ve ark., 2016 ve Kim ve ark., 2016).

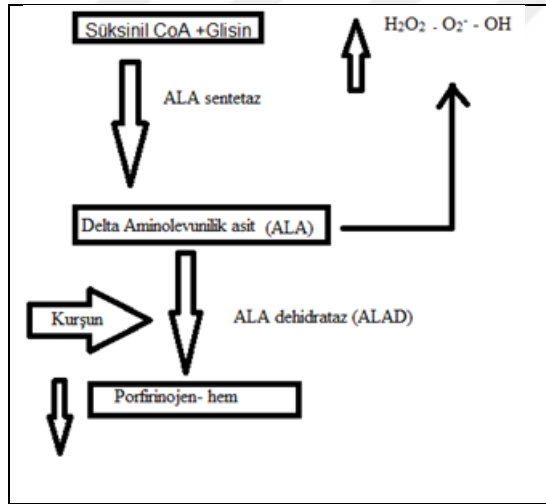
Kurşunun diğer bir etkisi de glutatyon (GSH) metabolizması üzerinedir. Sülfhidril-GSH kompleksi toksik metalleri direkt olarak bağlar. Kurşun karaciğer metabolizmasının antioksidan substratı olan GSH molekülünü etkili şekilde inaktive eder. Fonksiyonel sülfhidril gruplarını bağlar, non- fonksiyonel hale getirir ve

oksidatif dengeyi bozar. İki tip sülfhidril içeren iki enzim tipi kurşun tarafından inhibe edilir, bunlar:

1) δ -Aminolevunilik Asit Dehidrogenaz (δ -ALAD)

2) Glutasyon Redüktaz

Her ikisi de kurşuna maruz kalma durumunda baskılanırlar. Malondialdehit (MDA), oksidatif stresin özellikle lipid peroksidasyonunun klinik bir bulgusudur. ALA dehidrataz (ALAD), kurşun zehirlenmesinde çok önemli bir enzimdir, çünkü ALAD inhibisyonu, “Hem” üretimini düşürür, delta aminolevünilik asit (ALA) substratı seviyesini de artırır. Artmış ALA seviyesi idrarda ve kanda kurşuna maruz kalmanın belirtisidir ve bu durum ROS üretiminin artışı olarak bilinir. Alyuvarlar kurşuna yüksek affinite gösterirler ve dolaşımdaki kurşunun %99 'unu bağlarlar. Kurşun hücre zarını destabilize eder, zar geçirgenliğini artırır ve alyuvarlarda hemolize sebep olur (Şekil 1.5) (Dua ve ark., 2015; Kim ve ark., 2016 ve Lyn Patrick, 2006a).



Şekil 1.5. Kurşunun toksik etki mekanizması (Patrick Lyn, 2006a)

Kurşuna maruz kalma, kanatlılarda hepatik yağ asidi içeriğini değiştirmekte, araşidonik asit konsantrasyonunu artırmakta, linoleik asit / araşidonik asit oranını azaltmaktadır. Bu bulgular kurşunun araşinodik asit miktarını artırma ve linoleik asit/ araşinodik asit oranını azaltma yoluyla doku peroksidasyonunu artırdığını ve bunun

kurşun toksisitesinin özgün bir belirteci olduğunu ortaya koymaktadır (Donaldson ve ark., 1984).

Kurşunla temas halinde çalışan işçilerde yapılan lipit peroksidaz (LPO) ve SOD düzeyi ile ilgili çalışmalarda kurşunun sadece LPO düzeyini arttırdığını, LPO düzeyindeki artışın sadece lipit peroksidasyonundan değil, aynı zamanda kandaki SOD aktivitesinin inhibisyonunun sonucu olduğu gözlenmiştir (Ahamed ve ark., 2005). Çalışmalar kurşunun lipit peroksidasyonu direkt olarak oluşturmadığını indirekt yolla bunu yaptığını ortaya koymuştur. Kurşun alyuvarlarda oksijenin Hb'le yaptığı bileşiği bozarak, reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşmasına neden olarak oksidatif hasara yol açar (Kim ve ark., 2016).

Kurşunun alyuvar zarında meydana getirdiği değişiklikler çok iyi bilinmektedir. Kurşun alyuvardaki ozmotik basıncı ve mekanik frajiliteyi değiştirerek alyuvar morfolojisinde önemli şekil değişikliği meydana getirir. Kurşun; alyuvarlardaki CAT, SOD ve diğer antioksidan enzimlerin seviyesini artırabilir, kurşun hidroksil ve ($O_2^{\bullet-}$) serbest radikalının ve diğer ROS'un ortaya çıkmasına sebep olur. Oksidatif stresin artması alyuvarlardaki protein yapılarına zarar verir. Oksidatif tedavi bu tür zararları engelleyebilir (Rendon-Ramirez., 2007; Dua ve ark., 2015).

1.3. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

1.3.1. Serbest Radikaller

Maddelerin atomik ya da moleküler yapılarında eşî olmayan, yalnız elektron bölümlerine serbest radikal adı verilir. Bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denmektedir. Serbest radikaller, normal hücre metabolizması sonucu oluşan ve stabil olmayan reaktif moleküllerdir. Atom ya da moleküllerin orbitallerinde çift halde bulunan elektronlar stabil durumdadırlar ancak eşî olmayan tek elektrona sahip serbest radikaller başka moleküllerle çok kolay elektron alışverişine girerek onların yapısını bozarlar. Serbest radikal oluşumu 3 mekanizma ile gerçekleşebilir:

1- Kovalent bağılı nötr haldeki bir molekülün homolitik bölünmesiyle ortak kullanılan elektronlarından her birinin bir parçada kalması sonucu

2- Normal haldeki bir molekülden bir elektronun kaybı ile

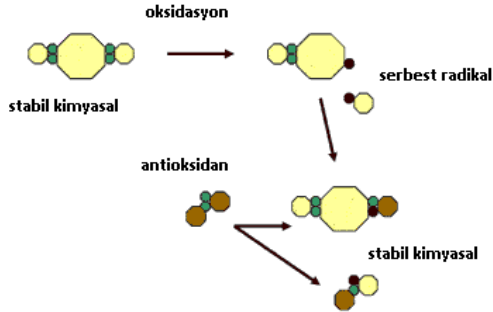
3-Normal haldeki bir moleküle bir elektronun eklenmesi sonucunda oluşabilirler (Şekil 1.6) (Akkuş,1995).

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikal oluşumlarında en sık elektron transferi yoluyla oluşum görülür ve en önemli serbest radikaller O_2 'den meydana gelenlerdir (Akkuş, 1995 ve Roleira ve ark., 2015). En önemli reaktif O_2 kaynaklarını ise, mitokondrial elektron transportu, proksimal yağ asidi mekanizması ve sitokrom P_{450} reaksiyonları olarak sıralayabiliriz (Gao ve ark., 2015 ve Rahman, 2003). Serbest radikaller tüm hücre komponentleri ile özellikle de sülfidril içeren amino asit ve PUFA ile etkileşirler. Proteinlerin denatürasyonu, polisakkaritlerin depolimerizasyonu, kollojen sentezinin bozulması, deoksiribonükleidlerin yıkılması, yapısal proteinlerin oksitlenmesi ve çapraz bağların oluşması, antiproteazların inhibisyonu sonucu proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve hücre membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açarlar. Serbest radikallerin en önemli hedeflerinden biri membran lipidleridir. Membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulur ve membran proteinleri, reseptörleri ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktif olurlar (Köse, 1997 ve Siti ve ark., 2015).

1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri mitokondrial solunum sırasında oluşan ve enzimatik oksidaz sırasında ortaya çıkan oksijenin radikal formudur. O_2 'in orbitallerinde eşlenmemiş 2 elektronu bulunur. Bu nedenle diradial adı verilen O_2 serbest radikallerle çok kolay reaksiyon gösterir. Serbest O_2 radikallerinde en önemli maddeler: $O_2^{\cdot-}$ radikali, geçiş metallerinin iyonları, H_2O_2 , O_2 ve hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikalleridir (Akkuş, 1995). ROS, radikal toplayanlar ($OH^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$, NO) radikal olmayanlar (ozon, O_2 , LPO, hidrojen peroksidaz) ve O_2 derivatlarından oluşur. Şekil 1.7. de gösterildiği gibi, oksidatif stres adı verilen olay, O_2 ve O_2 derivatları olarak bilinen ROS'un artması ve

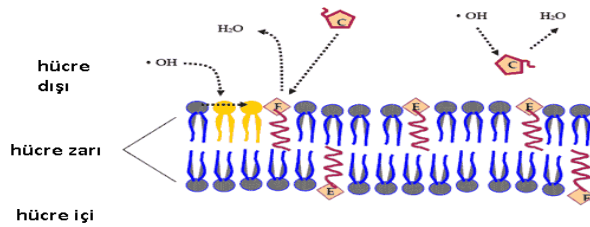
hücrede hasar oluşturmaları ile ilgilidir (Bansal ve Bilaspuri, 2011 ve Roleria ve ark., 2015).



Şekil 1.6. Serbest radikal oluşumu (Anonim, 2007a)

1.3.3. Oksidatif Stres

Hücrede metabolik olaylar sırasında açığa çıkan serbest radikallerin, oluşumu kaçınılmazdır. Buna karşılık serbest radikallerin süpürülmesini sağlayan antioksidan sistem serbest radikallerden hücrenin zarar görmesini engeller. Serbest radikalleri ortadan kaldıran mekanizmaların bozulması, hücrenin mikroçevresinde oksidatif stres olarak adlandırılan durumun ortaya çıkmasına neden olur (Serafini ve Del Rio, 2004).



Şekil 1.7. Oksidatif stresin hücre zarına zararı (Anonim 2007b)

Oksidatif stres sonucu meydana gelen serbest radikallerin kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ile kanser gibi çok sayıda hastalıkla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar ROS'un kalp, karaciğer ve merkezi sinir sistemini de içeren çok sayıda organ yaralanmasında rolü olduğunu kanıtlamıştır (Patrick Lyn, 2006b; Serafini ve Del rio, 2004 ve Warleta ve ark., 2011). Ateroskleroz karmaşık progresiv ilerleyen büyük ve orta boy arter intimasını tuttan bir hastalıktır. Endotel aktivasyonun etkisi ile şekillenen yapısal değişim ve proteoglikanlara maruz kalma

LDL'nin intimaaya çökmesine yol açmakta ve bu durum ROS oluşumuna neden olmaktadır. (Violoa ve Soehnlein., 2015)

Alyuvarlar O₂ seviyesinin zarar verici etkisi ile sürekli temas halindedirler, ancak normal durumlarda alyuvarların metabolik aktivitesi alyuvarların olumsuz etkilenmesini engeller. Bu koruyucu sistem antioksidan savunma sistemi olarak bilinir (Nakbi ve ark., 2010b ve Pisossi ve Pop., 2015).

1.3.3.1. Kurşun ve Oksidatif Stres

Kurşun zehirlenmesi, kalsiyum ve çinko gibi özel metallerle rekabet, proteinlerin tiyol grupları ile yüksek afinite, ROS üretimi, anti- oksidan sistemlerin baskılanması ve lipit peroksidasyonun artması ile açıklanabilir (El-sokkary ve ark., 2005). ROS' un kurşuna maruz kalmadan sonra akciğer, endotel doku testis, sperm, karaciğer ve beyinde olduğu belirlenmiştir (Patrick Lyn, 2006b). Kurşun, memelilerde doğrudan antioksidan depoları azaltır ve özellikle hidroksiperoksidaz ve lipoperoksidazlar olmak üzere ROS'u oluşturur. ROS hücre zarını ve dokusunu değiştirerek vasküler nörolojik ve genetik hasara yol açarlar.

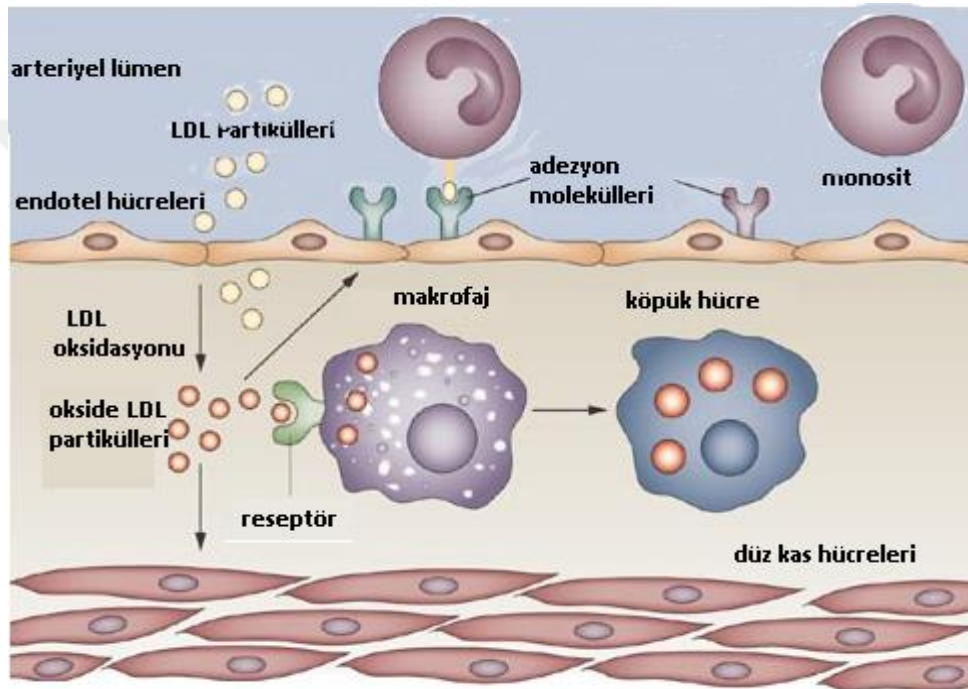
Kurşun özellikle hücrelerde antioksidatif mekanizmanın önemli bir parçası olan sülfidril grubu bulunduran enzimlerin etkinliğini bozarak linoleik, linolenik ve araşidonik asit, gibi yağların peroksidasyonunu artırır. Hücrelerde MDA artmasına sebep olur (Dua ve ark., 2016; Kim ve ark., 2016 ve Patrick Lyn, 2006b).

1.3.3.2. Sızma Zeytinyağı ve Oksidatif Stres

Oksidatif hasar; kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejanaratif bozukluklar gibi rahatsızlıklara neden olur. Deneysel çalışmalar sızma zeytinyağındaki fenolik komponentlerin DNA, lipit ve LDL oksidasyonuna karşı kuvvetli antioksidan özellikler gösterdiği bilinmektedir (Nakbi ve ark., 2010a). HT ve tirozol sızma zeytinyağındaki temel polifenollerdir. HT potent antioksidan olarak O₂ ve nitorojen serbest radikallerini engelleme özelliğine sahiptir. Ayrıca HT'nin LDL oksidasyonunu inhibe ettiği, plaket agresyonu, endotel hücre aktivasyonunu ve

DNA hasarını engellediği bilinmektedir (Hashmi ve ark., 2015 ve Warleta ve ark., 2011).

CAT, SOD ve GPx oluşan serbest radikallere karşı vücudun en önemli antioksidan savunma sistemleridir. İnsanlarda ve hayvanlarda sindirimden sonra HT'nin antioksidan etki gösterdiği ortaya konmuştur (Covas ve ark., 2015; Marchetti ve ark., 2015 ve Oliveras-López ve ark., 2008).



Şekil 1.8. LDL oksidasyonu ve köpük hücre oluşumu (Rocha ve Libby.,2009)

Yüksek miktarda doymamış yağ asidi alımının yüksek yoğunluklu kan lipoprotein (HDL) seviyesini azalttığı ve lipoproteinlerin oksidasyon riskini artırdığı bilinmektedir (Şekil 1.8). Çok sayıda epidemiyolojik çalışmada doymamış yağ asidi alımının azalmış koroner hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Covas ve ark., 2015 ve Rodenas ve ark., 2005). Zeytin, sızma zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağının antioksidan özelliklere sahip olduğu, bu nedenle bunların kardiyovasküler hastalıkları önlemede etkili oldukları, bağışıklık sistemini kuvvetlendirdikleri, yaşlanma geciktirici etkileri olduğu, antitümöral etki gösterdikleri, hafızayı güçlendirdikleri, metalleri şelatlama yetenekleri olduğu, antibakteriyel ve antiviral etkileri olduğu

çeşitli bilim dallarında *in vitro* ve *in vivo* çok sayıda çalışmada ortaya konmuştur. Zeytin ağacı yaprağı özütü ve sızma zeytinyağının benzer içerikte antioksidanlar ve minör polar bileşikler içermelerine rağmen bunların yoğunlukları farklılık göstermektedir. Ayrıca, sızma zeytinyağında bulunan doymamış yağ asitlerinin kardiyovasküler sistemde minör polar komponentlerden daha etkili bir koruyucu etkisinin olup olmadığı ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Kurşunun sülfidril içeren aminoasitleri bağlayarak, alyuvarlardaki frajiliteyi bozarak ve antioksidan enzimleri etkileyerek antioksidan dengeyi bozduğu ve bu şekilde toksik etkisini oluşturduğu bilinmektedir (Dua ve ark., 2016; He ve ark., 2016; Patrick Lyn 2006a ve Viola ve Soehnlein, 2015).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrede bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek yapıların oksidasyonunu önleyen ve geciktirebilen maddelere antioksidan maddeler bu olaya da antioksidan savunma denir. Fizyolojik şartlarda hücre içinde oluşan serbest radikaller enzimatik (SOD, CAT, GPx) ve non-enzimatik (vitamin E, A, C, redükte glutatyon gibi) antioksidan mekanizmalar tarafından kaldırılarak zararsız hale getirilmektedir.

Çalışma sızma zeytinyağında bulunan minör polar komponentler ve bunların en önemlilerinden biri olan ve zeytin ağacı yaprağında yüksek miktarda bulunan oleuropein ve derivatlarının akut kurşun zehirlenmesindeki serum lipit, oksidatif stres ve kan parametrelerine etkilerini incelemek, antioksidan özelliği ile bilinen sızma zeytinyağının etkilerini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Deneyde kullanılan ratlar Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Deney Hayvanları Yetiştirme Ünitesi'nden sağlanmıştır. Çalışma 150-200 gr ağırlığında 7-8 haftalık 36 erkek Wistar albino rat üzerinde yürütülmüştür.

Ratlar, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Deney Hayvanları Ünitesi'nden alındıktan sonra deney süresince bulunacakları deney ortamına alışmaları amacıyla 1 hafta boyunca 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ışık periyoduna dahil edilmişlerdir. Ratlar, birinci hafta sonunda rastgele altı gruba ayrılmış ve grup numaraları kafeslerinin üzerine yazılmıştır. Adaptasyon ve izleyen deney sürecinde hayvanlar pelet formundaki sıçan yetiştirme yemi (Oğuzlar Yem, Eskişehir [Çizelge 2.1]) ve su ile ad libitum beslenmişlerdir. Ratlar deneme süresince her gün aynı saatte tartılmıştır.

Çalışma, 25.06.2008 tarih ve 2008-21-104 sayılı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

2.1.2. Kurşun

Çalışmada kullanılan kurşun asetat trihidrat Merck (CAS 6080-56-4) firmasından temin edilmiştir. Kurşun asetat trihidrat fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde eritilmiş, her enjeksiyon öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Kurşun asetat dozu 25 mg/kg canlı ağırlık olacak şekilde intraperitonel (i.p.) olarak verilmiştir.

Çizelge 2.1. Deneme gruplarına verilen yemin bileşimi

Kuru madde (%)		88
Ham protein (%)		14
Ham selüloz (%)		11
Ham kül (%)		10
HCL Çözülme-yen kül (%)		2
Kalsiyum: (%)		1,3-2
Fosfor (%)		1
Sodyum (%)		0,5-1
NaCl: (%)		1
A vitamini	IU/kg	10000
D3 vitamini	IU/kg	1000
E vitamini	mg/kg	30
Metabolik enerji	Kkal/kg	2600

2.1.3. Sızma Zeytinyağı

Çalışmada kullanılan zeytinyağı Laleli firmasının natürel yollarla elde ettiği Taylıeli erken hasat markalı natürel sızma zeytinyağı olup, Türk Gıda Kodeksine göre sızma zeytinyağı olarak ruhsatlandırılmıştır. Sızma zeytinyağı 10/09 üretim tarihli olup EH-091009 seri no ile üretilmiştir. Çalışmada kullanılan zeytinyağının serbest yağ asitliği (oleik asit cinsinden) en çok %0,8 dir. Hayvanlar deneme süresince her gün tartılarak Çizelge 2.2’de bileşimi verilen sızma zeytinyağı, dozu 5 ml/ kg canlı ağırlık olacak şekilde sonda yardımı ile içirilmiştir.

Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan zeytinyağının 100 gramındaki enerji ve besin değerleri.

Yağ	100 g
Tekli doymamış yağ	73 g
Çoklu doymamış yağ	11 g
Doymuş	16g
Kolesterol	0
Sodyum	0
Total karbondirat	0
Protein	0
Kalori (100 gr)	857 kcal (3523kj)

2.1.4. Zeytin Ağacı Yaprakı Özütü

Çalışmada kullanılan zeytin ağacı yaprakları Balıkesir ili Edremit bölgesinde yetiştirilen zeytin ağaçlarından elde edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen özüt dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek her gün hazırlanmış ve hayvanların beden ağırlıklarına göre 60 ml/ kg olacak şekilde i.p. olarak verilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1 Sızma Zeytinyağında Bulunan Toplam Fenolik Madde Miktarının Ölçümü

Çalışmada kullanılan sızma zeytinyağının fenolik madde içeriği Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) Laboratuvarında yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle sızma zeytinyağının ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.1.1 Sızma Zeytinyağının Ekstraksiyonu

Zeytinyağlarından fenolik bileşiklerin ekstrakte edilmesi için Murkovic ve ark.'nın 2004'te bildirdiği metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Fenolik madde ekstraksiyon işlemi için deney tüpüne 2.5 gr zeytinyağı tartılmış, üzerine 2.5 ml metanol ilave edilmiştir. Tüpün ağzı kapatıldıktan sonra bu karışım vortekste 1 dakika karıştırılmıştır. Ardından 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmış ve üst faz toplam fenolik madde miktarı ve bileşiminin belirlenmesi için kullanılmıştır.

2.2.1.2 Sızma Zeytinyağında Bulunan Toplam Fenolik Madde Analizi

Zeytinyağından elde edilen ekstraktdaki toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Gutfinger, 1981). Bu amaçla 0.2 mL fenolik ekstrakt üzerine 4.8 ml su ilave edilmiştir. Ardından 0.5 ml Folin çözeltisinden ilave edilip 3 dakika karanlıkta bekletilmiş, süre sonunda üzerine 1 ml %35'lik doymuş sodyum karbonat ilave edilmiştir. Bu karışım distile su ile 10 ml'ye tamamlandıktan sonra 2 saat karanlıkta bekletilmiş ve spektrofotometrede (Hitachi U-2800 Tokyo, Japonya) 725 nm dalga boyunda şahide karşılık absorbansı ölçülmüştür. Sonuç kafeik asit eşdeğeri olarak (mg kafeik asit/ g ekstrakt) verilmiştir. Denemede kullanılan sızma zeytinyağının Folin-Cioalteau yöntemi ile belirlenen toplam fenolik madde içeriği, kafeik asit eşdeğeri (CAE) cinsinden 460,2474 mg/kg olarak belirlenmiştir.

2.2.2 Sızma Zeytinyağındaki Fenolik Madde Çeşitlerinin HPLC ile Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan sızma zeytinyağındaki fenolik madde çeşitleri Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) Laboratuvarında Shimadzu marka (Kyoto, Japonya) HPLC cihazında belirlenmiştir.

2.2.2.1 HPLC Sisteminin Özellikleri

Ölçüm sırasında kullanılan HPLC sisteminin özellikleri aşağıda verilmiştir.

Sistem kontrolör: CBM-20A

Gradient pompa: LC-20AD

Dedektör: Diode Array Detector SPD-M20A

Kolon fırını: CTO-20A

Degazör: DGU-20A5

2.2.2.2 Kullanılan Kimyasallar

HPLC de kullanılan tüm kimyasallar HPLC grade olup,

Tirozol [6. 2-(4-hidroksifenil) etanol], Fluka (Buchs, Switzerland)

Apigenin, Fluka (Buchs, Switzerland)

Luteolin, Sigma (St-Louis, USA);

Luteolin-7-O-glukosid, Applichem (Darmstadt, Germany);

p-kumarik asit, Sigma (St-Louis, USA);

Trans sinnamik asit, Aldrich (St- Louis, USA) firmalarından temin edilmiştir.

2.2.2.3. HPLC Koşulları

Zeytinyağı örneklerinin fenolik dağılımının tespitinde kullanılan çalışma koşulları şu şekildedir:

Kolon: Inertsil (250×4.6 mm, ODS-3, 5µm partikül büyüklüğü, Tokyo, Japonya)

Kolon sıcaklığı: 35 °C

Akış hızı: 1.0 mL/dk

Dalga boyu: 280, 320 nm

Enjeksiyon Miktarı: 20 µl

Mobil faz: Metanol (A, %10), Su (B, %90), pH = 3.1

Çizelge 2.3. Sızma zeytinyağının HPLC gradient programı

Zaman (dk)	Çözücü A (%)	Çözücü B (%)
0	10	90
10	30	70
30	30	70
40	40	60
45	50	50
80	50	50

Çalışmada kullanılan sızma zeytinyağındaki fenolik maddelerin miktarları örnekten elde edilen pik alanlarının, her bir standart maddenin HPLC'ye ayrı ayrı verilerek elde edilen pik alanlarına oranlanması ile değerlendirilmiş ve sonuçlar mg/kg olarak verilmiştir.

2.2.3. Zeytin Ağacı Yaprağı Özütünün Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan zeytin ağacı yaprağı özütü Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı laboratuvarında elde edilmiştir.

2.2.3.1. Zeytin Ağacı Yaprağı Ekstraksiyon İşlemi

Ekstraksiyon için toz haline getirilmiş 100 g zeytin ağacı yaprağı kullanılmıştır. Bitki 12 saat boyunca 50 °C'de petrol eteri ile muamele edilerek bitkinin pigment ve lipofilik kısımlarının (serbest yağ asitleri, steroller, steril esterler, trigliseridler) açığa çıkması sağlandı. Eter ekstraktı süzülerek kurutuldu. Polifenolik maddelerden zengin özütü elde etmek için kalıntı, %95'lik 500 ml etanol içinde 50° C 'de karıştırıcıda 12

saat boyunca bekletilerek ekstrakt elde edildi. Etanol fazı süzülerek Minispray Dryer (Buchi Laboratory Equipment B-290, Switzerland) kullanılarak kurutulmuştur. Kurutma koşulları aşağıda sunulmuştur. Kurutma işlemi sonunda 13,65 gr zeytin ağacı yaprağı özütü elde edilmiştir.

Çizelge 2.4. Minispray Dryer şartları

Minispray Dryer Parametreleri					
	Inlet Sıcaklığı C°	Outlet Sıcaklığı C°	Aspiratör %	Akış hızı (ml/dk)	Gaz hacmi (mm)
Etanollu özüt	65	36	100	6	30



Şekil 2.1. Ekstraksiyon ve minispray dryer işlemlerinin gerçekleştirildiği cihazlar

2.2.3.2. Zeytin Ağacı Yaprağı Özütünün HPLC ile Analizi:

0,5 gr yaprak ekstraktı 25 ml metanolle çözüldükten sonra metanolle 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra solüsyondan 2 ml alınarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı (European pharmacopeia, 2006).

2.2.3.2.1 HPLC Sisteminin Özellikleri

Çalışmada kullanılan sızma zeytinyağının içerdği fenolik maddeler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda bulunan HPLC Laboratuvarında Shimadzu marka (Kyoto, Japonya) HPLC'de Çizelge 2.5'deki gradient programına göre belirlenmiştir.

Ölçüm sırasında kullanılan HPLC sisteminin özellikleri aşağıda verilmiştir.

Sistem kontrolör: CBM-20A

Gradient pompa: LC-20AD

Dedektör: Diode Array Detector SPD-M20A

Kolon fırını: CTO-20A

Degazör: DGU-20A5

2.2.3.2.2. HPLC Analiz Koşulları

HPLC: Agilent Technologies 1200 seri (Binary pompa, vakum degazer, autosampler, diyod array dedektör)

Kolon: Eclipse XDB-C18 (150x4,6mm,5µm)

Mobil faz: Solvan A: Glasiyal asetik asit (%1)

Solvan B: Metanol

Kolon sıcaklığı: 25 °C

Akış hızı: 1 ml/dk.

Dedektör: UV 245 nm, 254 nm, 280 nm

Enjeksiyon miktarı: 20µl

Çizelge 2.5. Zeytin ağacı yaprağı özütü HPLC gradient programı

Zaman	Solvan A (%)	Solvan B (%)
0	85	15
5	40	60
12	20	80
15	85	15

2.2.3.2.3 Oleuropein Miktarının Hesaplanması

Etanolik ekstrakt içindeki oleuropein miktarının hesaplanmasında Avrupa Farmakopesi esas alınmıştır (Europen Pharmacoeia 6th Editon, 2006). Çalışmada kullanılan oleuropein pik alanı daha önce gerçekleştirilen sekiz çalışmanın analizlerin ortalaması alınarak 435,71 olarak belirlenmiştir. Her bir örnek 3 kez analiz edilmiş olup analizlerin ortalaması alınarak yüzde hesaplamaları aşağıda belirtilen formüle göre gerçekleştirilmiştir.

$$\frac{A_2 \times M_2 \times p \times 8}{A_1 \times M_1}$$

A_1 : Test solüsyonu pik alanı

A_2 : Referans madde pik alanı (oleuropein, 435,71)

M_1 : Tartılan numune ağırlığı

M_2 : Tartılan referans madde ağırlığı

p : Referans madde içerisindeki oleuropein miktarı

2.3. Deney Kurgusu

Deney hayvanları adaptasyon süreci olan bir hafta sonunda Çizelge 2.6.'da gösterilen şekilde her grupta 6 olacak şekilde rastgele 6 gruba ayrılmışlardır. Gruplar aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir. Hayvanlara ad libitum su ve yem verilmiştir.

Çizelge 2.6. Deneme Grupları

Gruplar	Uygulama
1.grup Kontrol (K)	Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) 5 ml/kg
2.grup Kurşun (Pb)	25 mg /kg kurşun asetat i.p
3.grup Zeytinyağı (Zyt)	5 ml/ kg sızma zeytinyağı oral
4.grup Özüt	60 ml/ kg özüt i.p
5.grup Kurşun–zeytinyağı (Pb-Zyt)	5 ml/ kg sızma zeytinyağı oral + 25 mg /kg kurşun asetat i.p
6.grup Kurşun-özüt (Pb-özüt)	60 ml/ özüt i.p + 25 mg /kg kurşun asetat i.p

Çalışmada kontrol grubundaki ratlara 5 ml/kg FTS ağızdan sonda ile verilmiştir. Kurşun grubundaki ratlara 25 mg/kg kurşun asetat i.p. olarak verilmiştir (Arif, 2008; Berrehal ve ark., 2007).

Zeytinyağı grubundaki ratlara sızma zeytinyağı canlı ağırlığa 5 ml/kg olacak şekilde sonda ile ağızdan verilmiştir (Andreadou ve ark., 2007; Somova ve ark., 2003).

Özüt grubundaki ratlara zeytin yaprağı özütü canlı ağırlığa 60 ml/kg i.p. olarak verilmiştir (Andreadou ve ark., 2007; Somova ve ark., 2003).

Kurşun-zeytinyağı grubundaki ratlara 5 ml/kg sızma zeytinyağı ağız yolu ile sonda ile verilmiş olup bu uygulamadan 30 dk. sonra, kurşun asetat 25 mg/kg olacak şekilde FTS içinde i.p yoldan verilmiştir (Antunes ve Takahashi, 1999). Kurşun-özüt grubundaki ratlara 60 ml/kg zeytin yaprağı özütü i.p. olarak verilmiş olup bu uygulamadan 30 dk. sonra, 25 mg/kg kurşun asetat FTS içinde i.p olarak uygulanmıştır (Andreadou ve ark., 2007; Somova ve ark., 2003).

Tüm gruplarda uygulamalara her gün aynı saatte benzer şekilde beş gün boyunca devam edilmiştir.

2.4. Kan Alma İşlemleri

Deneyin son günü tüm uygulamalar yapıldıktan 30 dakika sonra ratlar ketamine (90 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) kombinasyonu ile anestezi altına alınmışlardır. Daha sonra ratların kalplerine göğsün sol tarafından diyafram içersinden ventriküllere 22G iğne ile girilerek, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile pıhtılaşmanın engellendiği eppendorf tüplere ve antikuagulansız eppendorf tüplere kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri hematolojik analizler için hemen laboratuvara getirilmiş ve aynı gün hemotolojik değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

Antikuagulansız tüplere alınan kanlar 3000 rpm'de 5 dk santrifuj edilerek serumlar elde edilmiştir. Eppendorf tüplere alınan serumlar biyokimyasal analizler için -20 derecede saklanmıştır.

Kan kurşun düzeyi ölçümü için ayrılan tam kanlar aynı gün ölçümlerin yapılacağı laboratuvara götürülerek kan kurşun düzeyleri belirlenmiştir.

MDA ölçümleri için antikuagulanlı kanlar 3000 rpm'de 5 dk santirüje edilerek plazmalar elde edilmiş, ölçümler aynı gün yapılmıştır.

Antikuagulanlı kanlardan plazma örnekleri ayrıldıktan sonra SOD ve CAT enzim aktivitelerinin tayini için alyuvarların üzerine Saline Fosfat Tampon çözeltisi (PBS) ilave edilerek hafifçe altüst edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dk boyunca santirfuj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant pipetle atılarak yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Altta kalan alyuvar tabakasına 1,5 katı distile su ilave edildikten sonra vortekslenerek alyuvarların parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen hemolizatlardan SOD ve CAT ölçümleri yapılmıştır.

2.5. Kan Analizleri

2.5.1. Serum Lipit Değerlerinin Belirlenmesi

Toplam kolesterol, HDL ve LDL değerleri serum örneklerinde ticari kitler kullanılarak Advia 1800 otoanalizatöründe ölçülmüştür.

2.5.2. Hematolojik Değerlerin Belirlenmesi

Alyuvar sayımı Hayem eriyiği kullanılarak direkt hemositometrik yöntemle yapılmıştır (Schalm ve ark., 1975; Yılmaz B., 2000). Kontrollü sayım olması amacıyla Thoma lamında her iki kamarada sayım gerçekleştirildi. Sayım sonrası elde edilen değerler 10.000 ile çarpılarak bir mm³'deki alyuvar sayısı hesaplanmıştır.

Hemotokrit (Hct, %) değer, mikrohematokrit yöntemi ile saptanmıştır. Heparinli mikrohematokrit tüplerin $\frac{3}{4}$ 'ü kan ile doldurularak tüpün boş olan ucu macunla kapatıldı. Santrifüje (Hettich) yerleştirilen tüpler 13.000 devirde 5 dk döndürüldükten sonra özel okuma aracındaki çizelgeye konularak hematokrit değer okunmuştur (Schalm ve ark., 1975; Yılmaz B., 2000).

Hemoglobin (Hb) miktarı ferrosiyanometrik metod ile belirlenmiştir. Metod Hb'deki Fe⁺²'nin ferrisiyanür ile Fe⁺³'e oksitlenip ortama potasyum siyanür eklenmesi ile stabil siyanmethemoglobin oluşması esasına dayanır. Siyanmethemoglobinin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülen absorbansı Hb konstrasyonu ile doğru orantılıdır. Test için deney tüpüne 5 ml Drabkin çözeltisi konuldu ve üzerine 20 µl kan eklendi, çözelti karıştırıldı. On dakika bekleme süresi sonunda spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans okunarak aşağıda yazılan formüle göre Hb değeri g/dl olarak hesaplanmıştır (Tietz 1987).

$$\text{Hb derişimi (g/dl)} = \frac{\text{Absorbans} \times \text{Hb standart derişimi} \times \text{Dilusyon faktörü}}{\text{Hb standartının absorbansı} \times 1000}$$

Ortalama alyuvar hacmi (OAH, μ^3) çöktürülmüş alyuvarların hacimlerinin bir mm^3 kanda bulunan alyuvar sayısına oranlaması ile, ortalama alyuvar hemoglobini (OAHb, pg) 100 ml kanda bulunan Hb miktarının bir mm^3 kanda bulunan alyuvar sayısına oranlanması ile, ortalama alyuvar hemoglobin derişimi (OAHbD, %) 100 ml kanda bulunan Hb miktarının çöktürülmüş alyuvarların hacimine oranlanması ile hesaplanmıştır (Schalm ve ark., 1975, Feldman ve ark., 2000).

2.5.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.5.3.1. Alyuvarlarda Süperoksit Dismutaz (E.C 1.15.1.1) Ölçümü

Alyuvar hemolizatında süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi Sun Y. ve ark. (1988) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. Metod reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon ile üretilen oksijen radikallerinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ortamda bulunan nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Oluşan rengin absorbansının spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda köre karşı okunması ile belirlenmiştir. Bir SOD ünitesi NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden aktivite olarak kabul edildiğinden, reaksiyon ortamında bulunan enzim aktiviteleri bu ünite cinsinden hesaplandı ve U/mg-Hb olarak değerlendirildi.

2.5.3.2 Alyuvarlarda Katalaz (E.C.1.11.1.6) Ölçümü

Alyuvar hemozilatında katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü Luck (1965) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Metod, H_2O_2 'nin ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorbans vermesi esasına dayanır. Fosfat tampon içerisinde bulunan H_2O_2 'nin örnekteki CAT enziminin yıkılması sonucunda 240 nm'deki absorbansında azalma meydana gelir. Azalma hızı CAT enzimi aktivitesi ile orantılıdır. Oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda köre karşı okunarak elde edilen değer formüle uygulandıktan sonra alyuvarlardaki Hb konsantrasyonu (g/dl) ile oranlanarak k/mg-Hb olarak hesaplanmıştır.

2.5.4. Plazma Malondialdehit Ölçümü

Plazma malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümleri Yoshioko ve ark (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metod, lipid içerik ve düşük pH'da, tiyobarbitirik asit varlığında ısıtılarak stabil kırmızı renk oluşmasına dayanır. Örnekteki rengin 535 nm dalga boyunda köre karşı UV-spektrofotometre (Hitachi, Japonya) absorbansı okundu. 20 µmol/L'lik 1.1.3.3 Tetraoksipropan çalışma standart çözeltisi ile 1,2,4,5,10 µmol/L'lik dilasyonlar hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafiken yararlanılarak MDA değerleri µmol/L plazma olarak verildi.

2.5.5. Kan Kurşun Düzeyi Ölçümü

2.5.5.1.Kullanılan Cihazlar

-Bilgisayar kontrollü İndüktif Eşleşmiş Plazma Kaynaklı Kütle Spektrofotometresi (ICP-MS, Agilent 7500a)

- Nebulizer (Babington tip): Numunenin sisleştirilmesini (aerosol) sağlayan sistemdir.

- Spray Chamber (Quartz): Aerosolün toplandığı ve plazmaya gönderildiği sistemdir

- Otomatik örnekleyici (Otosampler)

- ICP-MS Top yazılımı

2.5.5.2.Reaktifler

Nitrik Asit: (HNO₃) : 1 ,40 g/ml, M=63,01 g/mol; saflığı % 65 olan HNO₃

Hidroklorik asit: (HCl) (Sigma): 1,16 g/ml

Deiyonize su

Kurşun Stok Çözeltisi analitik saflıkta (Merck), 1000 ppm'lik,

2.5.5.3. ICP-MS Koşulları

Tam kan numunesi iyice çalkalanarak homojenize edildi. 1 g kan numunesi tartılarak üzerine 5 ml HNO₃, 0,5 ml HCl ve 5 ml deiyonize su ilave edilerek mikrodalgaya verildi. Mikrodalgadan alınan numune deiyonize su ile 25 ml'ye kadar tamamlandı. Soğuduktan sonra, analiz için ICP-MS cihazına verildi. En az 5 standart kullanılarak ve standarda karşı gelen absorpsiyonlar standard konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek kurşun kalibrasyon grafiği çizildi. Numunedeki kurşun konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$K=(a-b) \times V/m$$

K=Numunedeki metal konsantrasyonu (mg/g)

a=Numunede çözeltisindeki metal konsantrasyonu (mg/ml)

b=Şahit çözeltisindeki metal konsantrasyonu (mg/ml)

V=Numune çözeltisinin hacmi (ml)

m=Numunenin kütlesi (g)

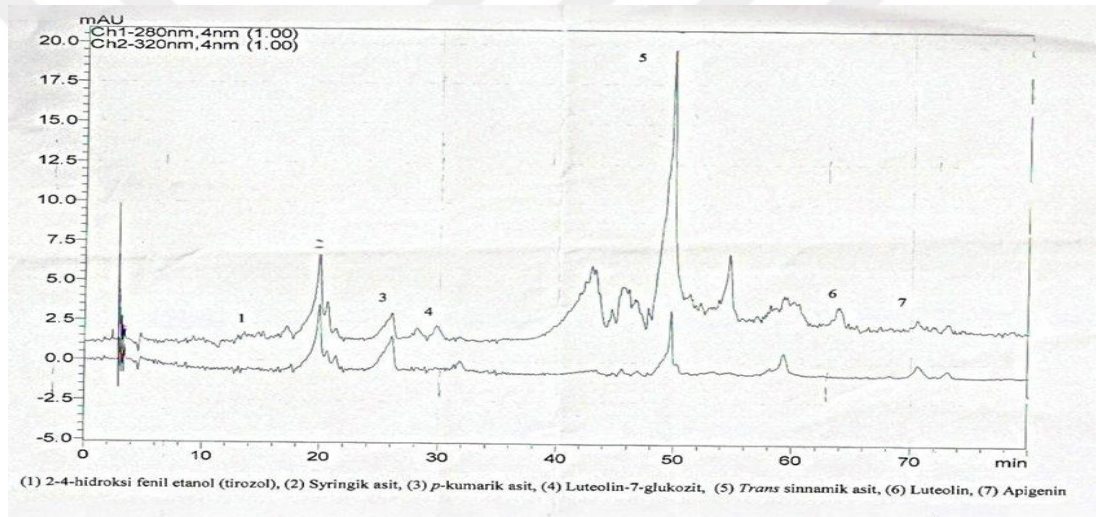
2.6. İstatistiksel Analizler

Gruplara ait istatistik hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılığın önemliliği için tesadüf blokları deneme düzenine göre varyans analizi (ANOVA), gruplar arasındaki farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi uygulanmıştır (Dawson ve Trapp, 2001). İstatistik analizler SPSS 22 (Inc. Chiago, IL, USA seri no:416a1604ed18748d3g27) paket programında gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Sızma Zeytinyağının Bileşimi

Çalışmada kullanılan sızma zeytinyağının toplam fenolik madde içeriği, kafeik asit eşdeğeri (CAE) cinsinden 460,2474 mg/kg olarak belirlenmiştir. Sızma zeytinyağında HPLC’de belirlenen fenolik madde çeşitlerini gösteren kromatogram Şekil 3.1’de ve miktarları ise Çizelge 3.1’de görülmektedir.

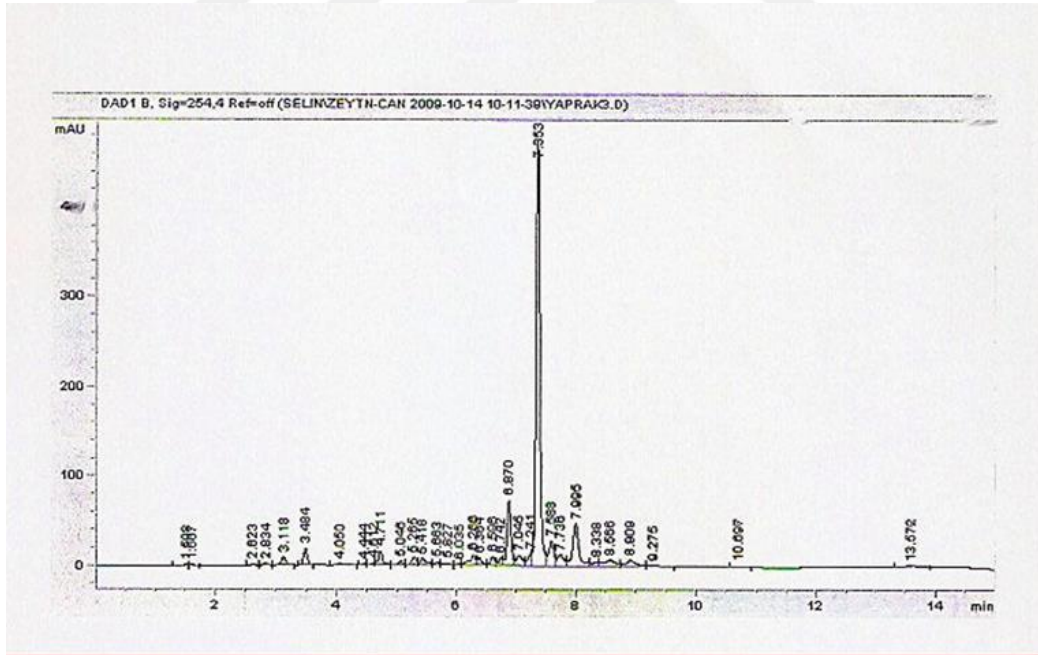


Şekil 3.1. Sızma zeytinyağının fenolik madde içeriğini [(1) 2-4 hidroksi fenil etanol (tirozol), (2)sirinjik asit, (3) *p*-kumarik asit, (4) luteolin 7-glikozit, (5) trans-sinamik asit, (6) luteolin, (7)apigenin] gösteren kromatogram.

Çizelge 3.1. Sızma zeytinyağındaki fenolik madde miktarları (mg/kg)

Sızma zeytinyağındaki fenolik maddeler	Miktar (mg/kg)
Tirozol	8.58
Sirinjik asit	0.56
<i>p</i> -kumarik	3.40
Luteolin-7-glikozit	6.92
Trans sinnamik asit	14.13
Luteolin	39.31
Apigenin	4.30

3.2. Zeytin Ağacı Yaprağı Özütünün İçeriği



Şekil 3.2. Zeytin ağacı yaprağından elde edilen özütteki oleuropein pik kromatogramı

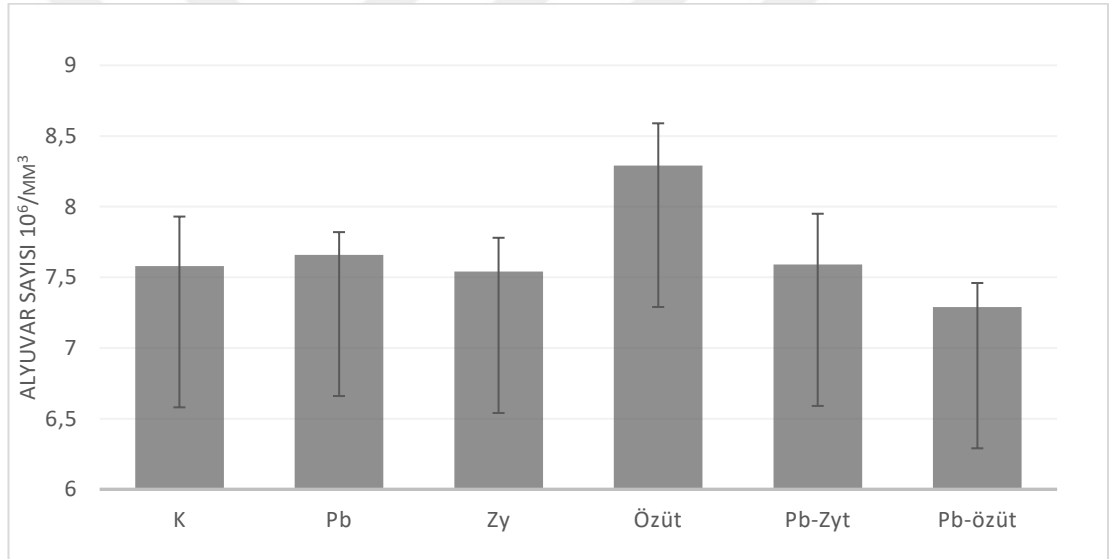
Özütün içeriğindeki oleuropein içeriğini belirlemek amacıyla Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi laboratuvarındaki HPLC cihazı ile

ölçüm gerçekleştirilmiştir. Zeytin ağacı yaprağından elde edilen etanolik ekstrakt içindeki oleuropein miktarının %20,01 olduğu ortaya konmuştur.

3.3. Hematolojik Değerler:

3.3.1. Ortalama Alyuvar Sayıları

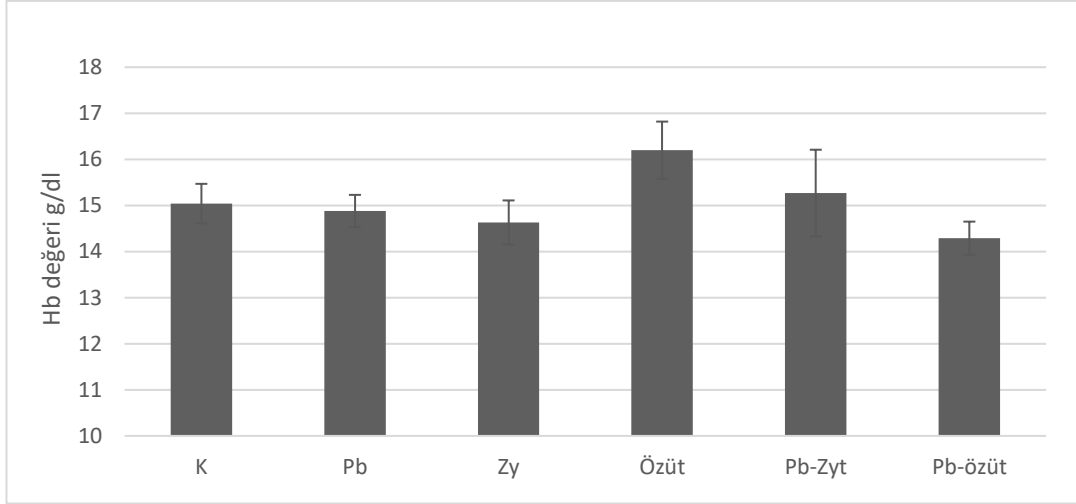
Deney sürecinde özüt verilen ratların alyuvar sayısının ($8,29 \pm 0,30 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$) diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu, ancak gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0,05$).



Şekil 3.3. Ortalama alyuvar sayıları ($\bar{X} \pm Sx$)

3.3.2. Hemoglobin Değerleri

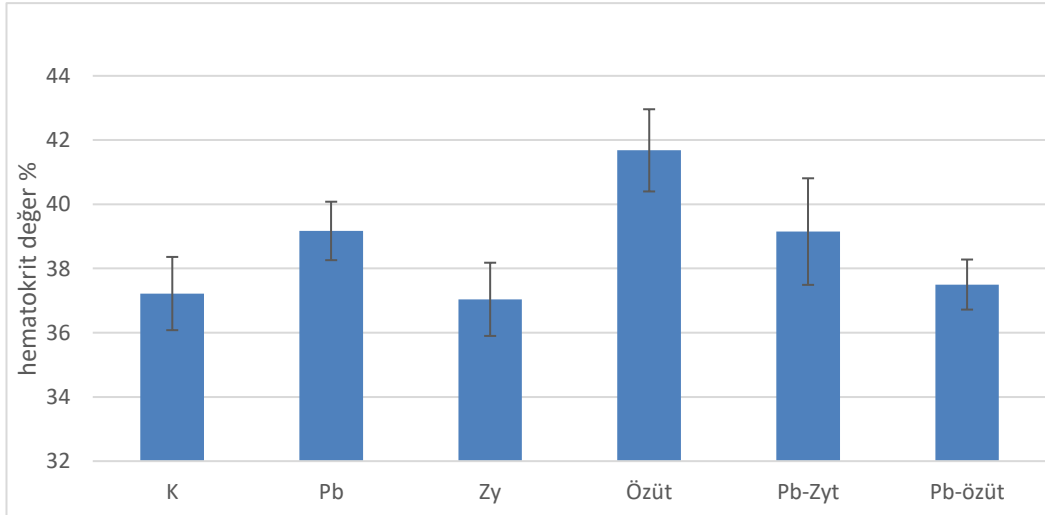
Hb değerlerinin kurşun grubunda $14,88 \pm 0,35$ g/dl, Pb-Zyt grubunda $15,27 \pm 0,94$ g/dl, Pb-özüt grubunda, $14,29 \pm 0,36$ g/dl olarak belirlenmiştir. En yüksek Hb değerinin özüt grubunda olduğu gözlenmiştir ($16,20 \pm 0,62$ g/dl). Ancak, analiz sonuçları gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadığını göstermiştir ($P > 0,05$).



Şekil 3.4. Hemoglobin değerleri ($\bar{X} \pm Sx$)

3.3.3. Hematokrit Değerleri

Kan hematokrit değerlerinin kontrol grubunda $37,22 \pm 1,14$ Pb grubunda $39,17 \pm 0,91$ Zyt grubunda $37,04 \pm 1,14$ ve özü verilen grupta $41,68 \pm 1,28$ Pb-Zyt grubunda $39,15 \pm 1,66$ Pb-Özü grubunda $37,50 \pm 0,78$ olarak saptanmıştır. Ancak gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).

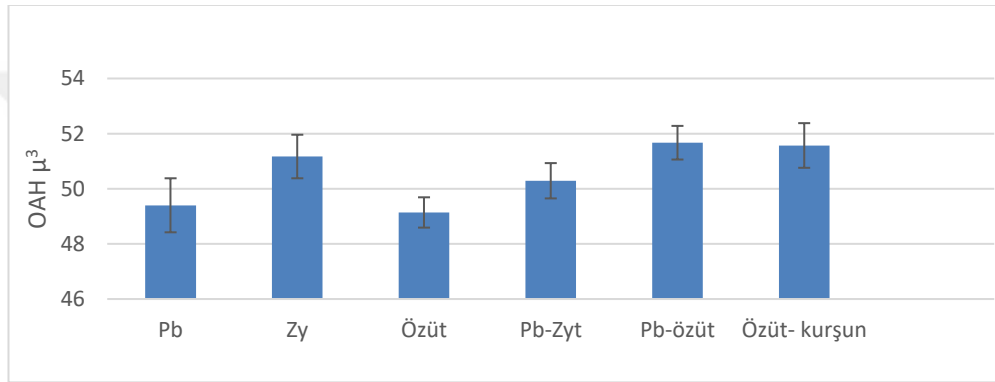


Şekil 3.5. Hematokrit değerleri ($\bar{X} \pm Sx$)

3.3.4. Alyuvar İndeksi

3.3.4.1. Ortalama Alyuvar Hacmi (OAH)

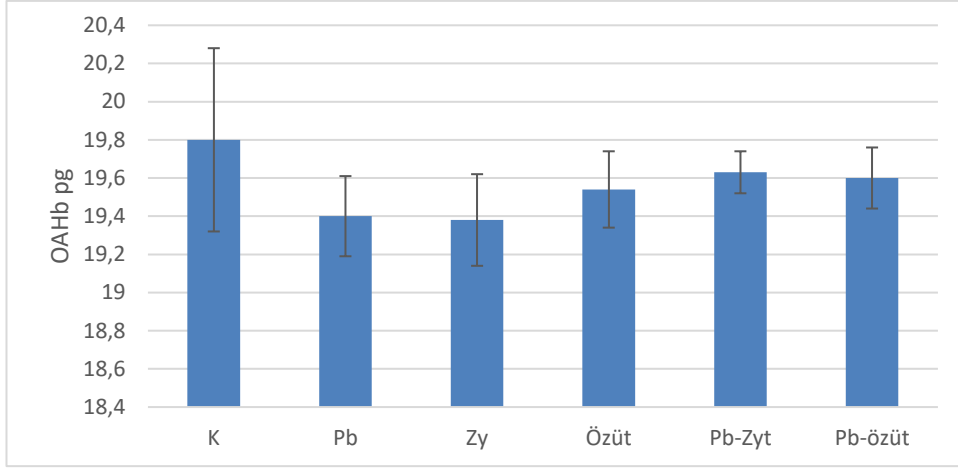
Ortalama alyuvar hacmi değerlerinin kontrol grubunda $49,40 \pm 0,98 \mu^3$, kurşun verilen grupta $51,17 \pm 0,79 \mu^3$, Zyt grubunda $49,14 \pm 0,55 \mu^3$ Pb-Zyt grubunda $51,67 \pm 0,61 \mu^3$, özüt verilen grupta $50,29 \pm 0,64 \mu^3$, Pb-özüt grubunda $51,57 \pm 0,81 \mu^3$ olarak saptanmıştır. Ancak gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).



Şekil 3.6. Ortalama alyuvar hacimleri ($\bar{X} \pm Sx$)

3.3.4.2. Ortalama Alyuvar Hemoglobini Miktarı (OAHb)

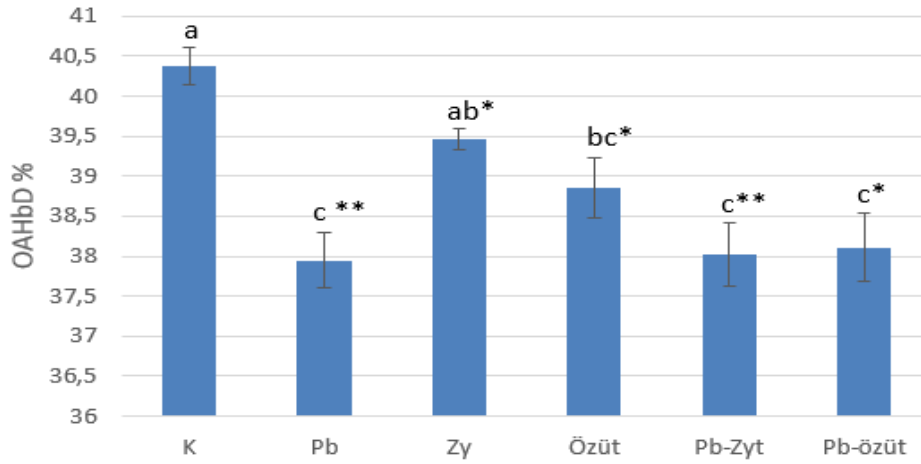
Ortalama alyuvar hacmi değerlerinin kontrol grubunda $49,40 \pm 0,98 \mu^3$, kurşun verilen grupta $51,17 \pm 0,79 \mu^3$, Zyt grubunda $49,14 \pm 0,55 \mu^3$ Pb-Zyt grubunda $51,67 \pm 0,61 \mu^3$, özüt verilen grupta $50,29 \pm 0,64 \mu^3$, Pb-özüt grubunda $51,57 \pm 0,81 \mu^3$ olarak saptanmıştır. Ancak gruplar arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).



Şekil 3.7. Ortalama alyuvar hemoglobini miktarı ($\bar{X} \pm Sx$)

3.3.4.3. Ortalama Alyuvar Hemoglobin Derişimi (OAHbD)

Çalışmada ortalama alyuvar Hb derişimleri Pb grubunda $37,95 \pm 0,35$ kontrol grubuna ($p < 0,05$) $40,38 \pm 0,24$ göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu, Zyt grubunda $39,7 \pm 0,13$ özü grubunda $38,86 \pm 0,38$ Pb-özü grubunda $38,11 \pm 0,42$ ve Pb-Zyt grubunda ise $38,02 \pm 0,40$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.8. Ortalama alyuvar hemoglobin derişimi ($\bar{X} \pm Sx$)
Farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$)

Çizelge 3.2. Ratların alyuvar sayısı, hemoglobin derişimi, hematokrit değeri, ortalama alyuvar hacmi, (OAH) ortalama alyuvar hemoglobini, (OAHb) ve ortalama alyuvar hemoglobin derişimi, (OAHbD) ortalama ve standart hata değeri

Gruplar	n	Alyuvar sayısı ($10^6/\text{mm}^3$) $\bar{X} \pm S_x$	Hemoglobin (g/dl) $\bar{X} \pm S_x$	Hematokrit (%) $\bar{X} \pm S_x$	OAH (μ^3) $\bar{X} \pm S_x$	OAHb (pg) $\bar{X} \pm S_x$	OAHbD (g/dl) $\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	6	7,58 $\pm$ 0,35	15,04 $\pm$ 0,43	37,22 $\pm$ 1,14	49,40 $\pm$ 0,98	19,80 $\pm$ 0,48	40,38 $\pm$ 0,24 ^a
Kurşun	6	7,66 $\pm$ 0,16	14,88 $\pm$ 0,35	39,17 $\pm$ 0,91	51,17 $\pm$ 0,79	19,40 $\pm$ 0,21	37,95 $\pm$ 0,35 ^{c**}
Zeytinyağı	6	7,54 $\pm$ 0,24	14,63 $\pm$ 0,48	37,04 $\pm$ 1,14	49,14 $\pm$ 0,55	19,38 $\pm$ 0,24	39,47 $\pm$ 0,13 ^{ab*}
Özüt	6	8,29 $\pm$ 0,30	16,20 $\pm$ 0,62	41,68 $\pm$ 1,28	50,29 $\pm$ 0,64	19,54 $\pm$ 0,20	38,86 $\pm$ 0,38 ^{bc*}
Zyt- kurşun	6	7,59 $\pm$ 0,36	15,27 $\pm$ 0,94	39,15 $\pm$ 1,66	51,67 $\pm$ 0,61	19,63 $\pm$ 0,11	38,02 $\pm$ 0,40 ^{c**}
Özüt- kurşun	6	7,29 $\pm$ 0,17	14,29 $\pm$ 0,36	37,50 $\pm$ 0,78	51,57 $\pm$ 0,81	19,60 $\pm$ 0,16	38,11 $\pm$ 0,42 ^{c*}

Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değeri arasındaki fark istatistik bakımından önemlidir ($p < 0,05$)

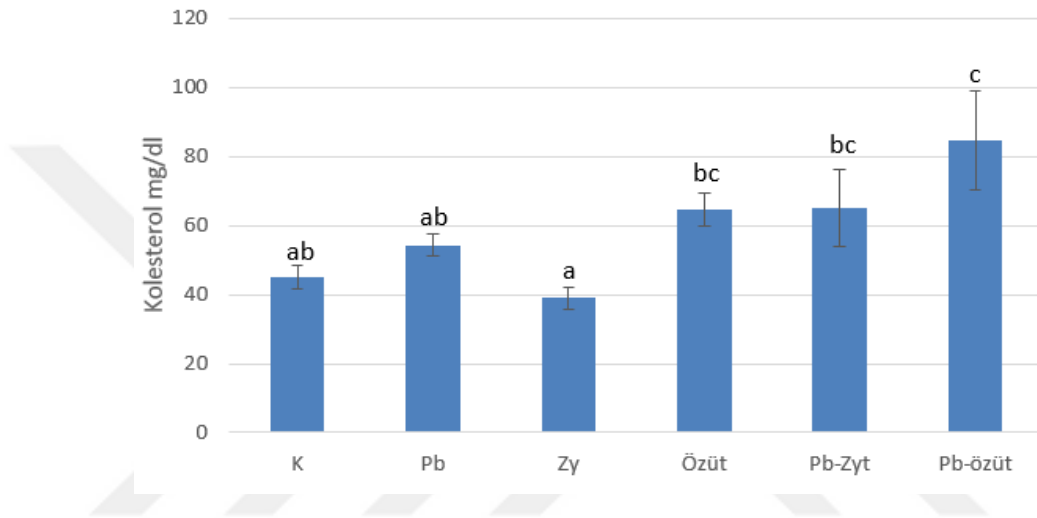
*: Kontrol grubuna göre $p < 0,05$ düzeyinde farklılığı ifade etmektedir.

** : Kontrol grubuna göre $p < 0,001$ düzeyinde farklılığı ifade etmektedir.

3.4. Serum Lipit Değerleri

3.4.1 Kolesterol Değerleri

Denemede kan kolesterol düzeyinin kontrol grubunda $45 \pm 3,48$ mg/ dl olduğu Pb grubunda $54,29 \pm 3,31$ mg/dl olduğu bulunmuştur. Zyt grubunda $39 \pm 3,29$ mg/dl, özüt grubunda $64,5 \pm 4,73$ mg/ dl Pb-özüt grubunda $84,57 \pm 4,23$ mg/dl ve Pb-Zyt grubunda $65 \pm 0,95$ mg/dl olarak bulunmuştur.

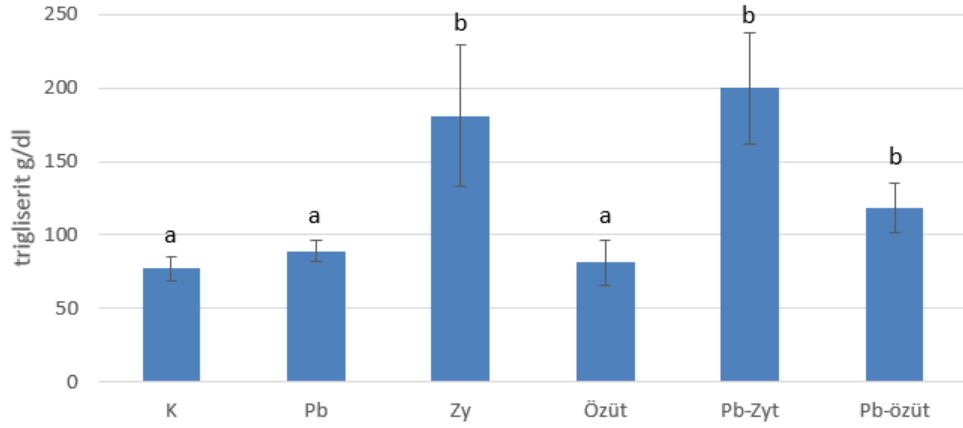


Şekil 3.9. Ortalama kolesterol değerleri ($\bar{X} \pm Sx$)

Farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$)

3.4.2 Triglicerit Değerleri

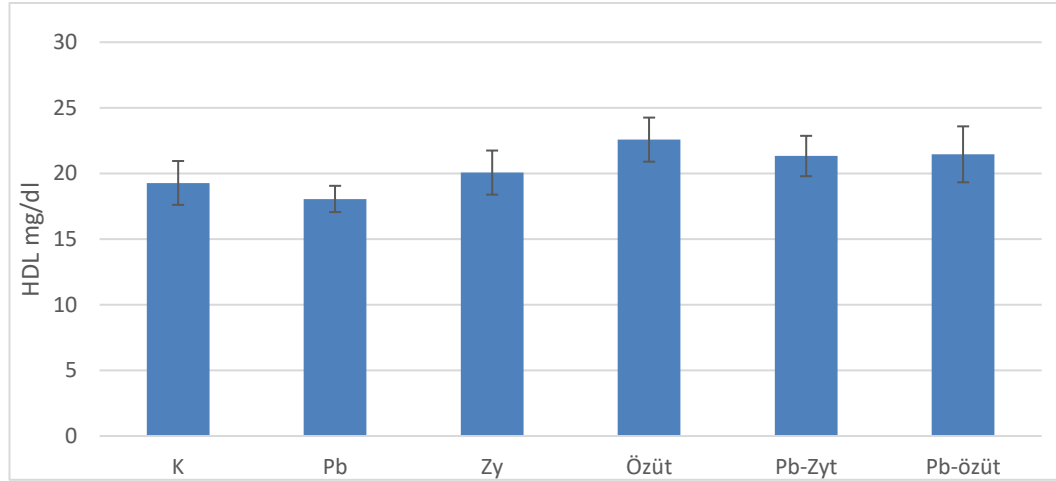
Denemede kan trigliserit düzeyinin kontrol grubunda 77 ± 8 g/dl olduğu Pb grubunda 89 ± 7 dl/ olduğu tespit edilmiştir. Zyt grubunda 181 ± 48 g/dl, özüt grubunda 81 ± 15 g/ dl Pb-özüt grubunda 118 ± 17 g/dl, Pb-Zyt grubunda ise 200 ± 38 g/dl olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10. Ortalama trigilserit değeri ($\bar{X} \pm S_x$)
Farklı harf taşıyan ortalama değeri arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

3.4.3. HDL Değeri

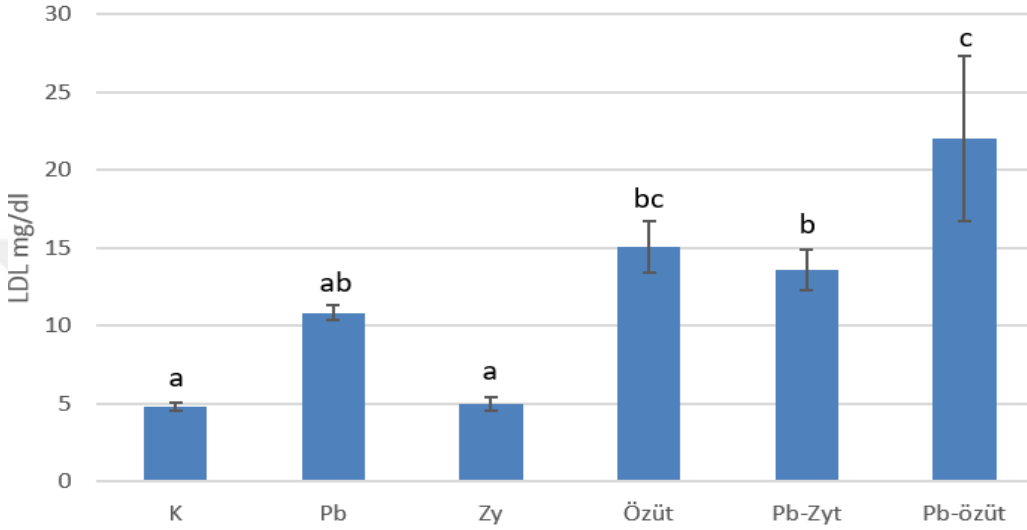
Denemede kan HDL düzeyinin kontrol grubunda $19,28 \pm 1,67$ mg/dl olduğu Pb grubunda $18,06 \pm 1,00$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Zyt grubunda $20,07 \pm 1,68$ mg/dl, özü grubunda $22,58 \pm 1,68$ mg/dl Pb-özü grubunda $21,46 \pm 2,13$ mg/dl, Pb-Zyt grubunda ise $21,33 \pm 1,54$ mg/dl olarak bulunmuştur.



Şekil 3.11. Ortalama HDL değeri ($\bar{X} \pm S_x$)

3.4.4. LDL Değerleri

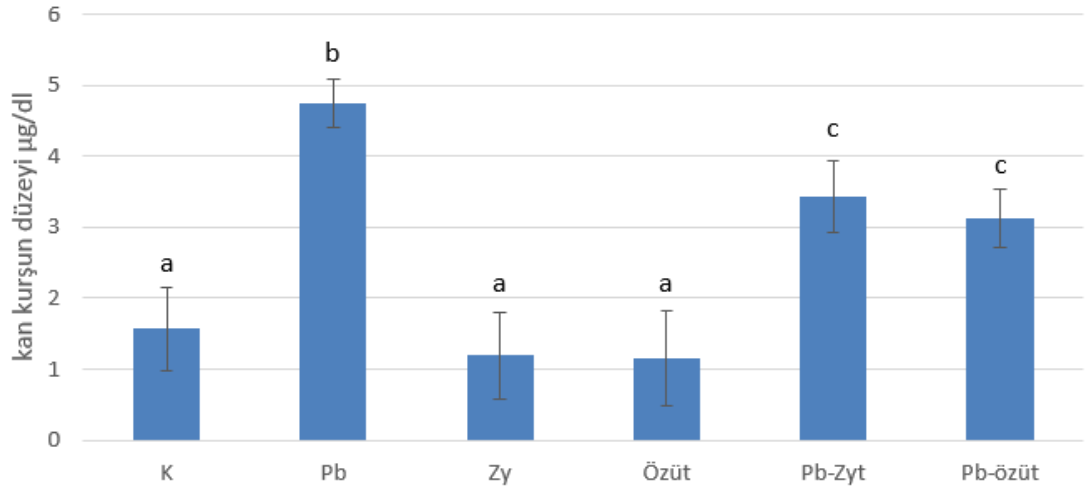
Ratların kan ortalama LDL düzeyleri kontrol grubunda $4,80 \pm 0,29$ mg/dl, Pb grubunda $10,85 \pm 0,51$ mg/dl, Zyt grubunda $5,01 \pm 0,43$ mg/dl, özüt grubunda $15,11 \pm 1,66$ mg/dl, Pb-özüt grubunda $22,05 \pm 5,3$ mg/dl ve Pb-Zyt $13,57 \pm 1,31$ mg/dl olarak bulunmuştur.



Şekil 3.12. Ortalama LDL değerleri ($\bar{X} \pm S_x$)
Farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

3.5. Kan Kurşun Düzeyleri

Çalışmada kan kurşun düzeyi ortalama değerleri kontrol grubunda $1,57 \pm 0,59$ µg/dl, Pb grubunda $4,75 \pm 0,34$ µg/dl, Zyt grubunda $1,20 \pm 0,61$ µg/dl, özüt grubunda $1,15 \pm 0,67$ µg/dl, Pb-özüt grubunda $3,13 \pm 0,41$ µg/dl ve Pb-Zyt grubunda ise $3,43 \pm 0,50$ µg/dl olarak bulunmuş olup, kontrol grubuna göre değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$).

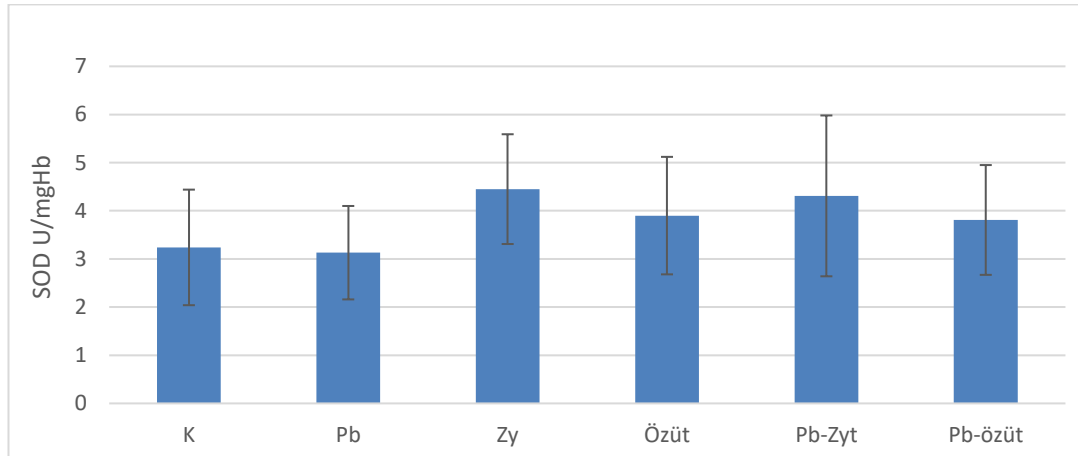


Şekil 3.13. Ortalama kan kurşun düzeyleri ($\bar{X} \pm S_x$)
Farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p < 0,05$)

3.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

3.6.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

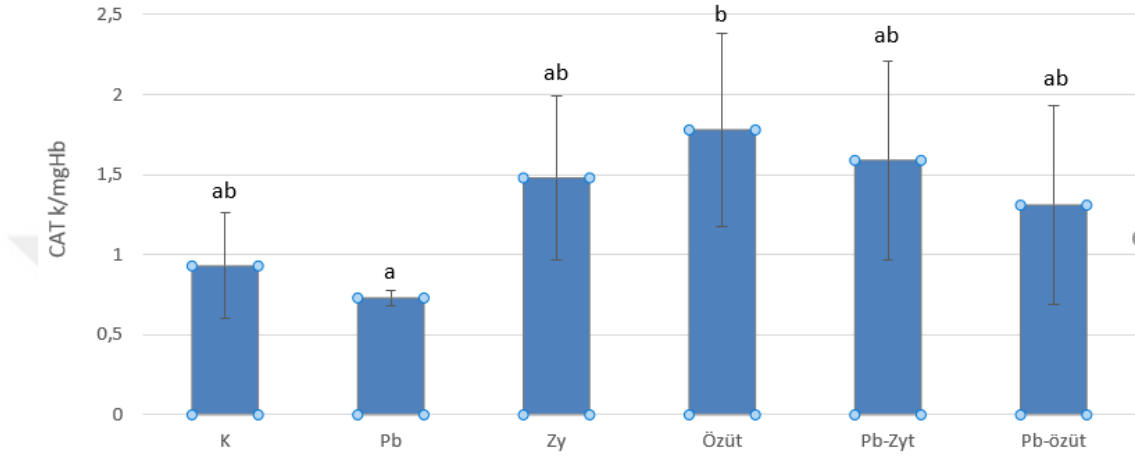
Deneyde SOD aktivitesi ortalama değerleri kontrol grubunda $3,24 \pm 1,20$ $\mu\text{mol/gHb}$, Pb grubunda $3,13 \pm 0,97$ $\mu\text{mol/gHb}$, Zyt grubunda $4,45 \pm 1,14$ $\mu\text{mol/gHb}$, özü grubunda $3,90 \pm 1,22$ $\mu\text{mol/gHb}$, Pb-özü grubunda $3,81 \pm 1,14$ μmol ve Pb-Zyt grubunda $4,31 \pm 1,67$ $\mu\text{mol/gHb}$ düzeylerindedir.



Şekil 3.14. Ortalama SOD aktiviteleri ($\bar{X} \pm S_x$)

3.6.2. Katalaz Aktivitesi

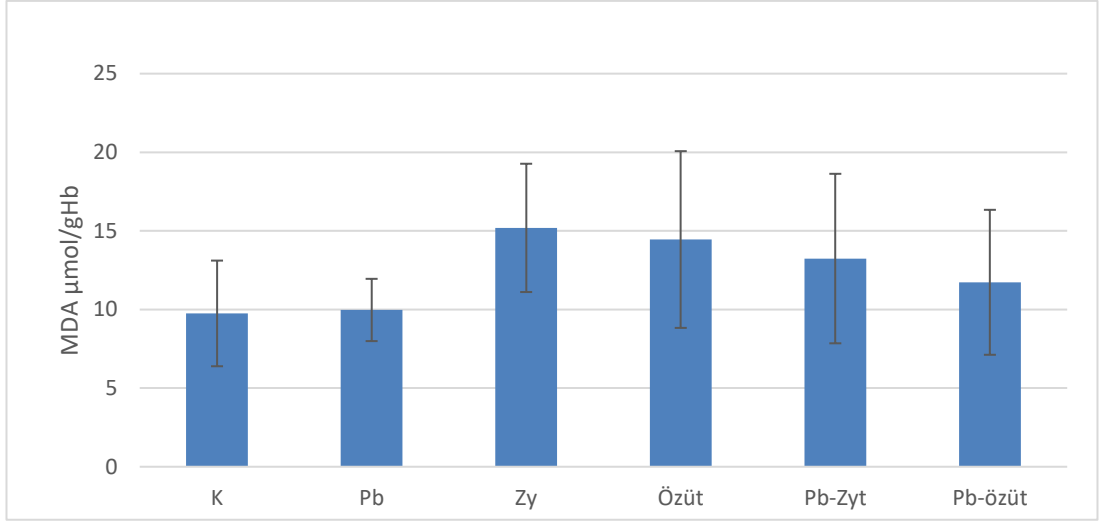
Denemede katalaz aktivitesinin kontrol gurubunda $0,93\pm0,33$ k/mgHb kurşun grubunda $0,73\pm0,05$ k/mgHb olarak gözlenmiştir. Zyt grubunda $1,48\pm0,51$ k/mgHb, özüt gurubunda $1,78\pm0,60$ k/mgHb, Pb-özüt $1,31\pm0,62$ k/mgHb, Pb -Zyt grubunda $1,59\pm0,62$ k/mgHb olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.16. Ortalama CAT aktiviteleri ($\bar{X}\pm Sx$)
Farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$)

3.7. Plazma Malondialdehit Düzeyleri

Denemede malondialdehit (MDA) düzeyleri kontrol grubunda $9,75\pm3,36$ $\mu\text{mol/L}$, kurşun grubunda $9,97\pm1,98$ $\mu\text{mol/L}$ olduğu tespit edilmiştir. Zyt grubunda $15,19\pm4,08$ $\mu\text{mol/L}$, özüt grubunda $14,45\pm5,62$ $\mu\text{mol/L}$ Pb-özüt $11,73\pm4,61$ $\mu\text{mol/L}$ ve Pb-Zyt $13,24\pm5,39$ $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur.



Şekil 3.15. Ortalama MDA aktiviteleri ($\bar{X} \pm Sx$)

Çizelge 3.3. Ratların kolesterol, HDL, LDL, Kan kurşun düzeyleri ile süperoksit dismutaz, malondialdehit ve katalaz enzim aktiviteleri

Gruplar	n	Kolesterol(mg/dl) $\bar{X} \pm S_x$	HDL (mg/dl) $\bar{X} \pm S_x$	LDL (mg/dl) $\bar{X} \pm S_x$	Trigliserit (g/dl) $\bar{X} \pm S_x$	Kurşun (μ g/dl) $\bar{X} \pm S_x$	SOD(μ mol/gHb) $\bar{X} \pm S_x$	CAT*(k/mgHb) $\bar{X} \pm S_x$	MDA(μ mol/L) $\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	6	45,00 $\pm$ 3,48 ^{ab}	19,28 $\pm$ 1,67	4,80 $\pm$ 0,29 ^a	77 $\pm$ 8 ^a	1,57 $\pm$ 0,59 ^a	3,24 $\pm$ 1,20	0,93 $\pm$ 0,33 ^{ab}	9,75 $\pm$ 3,36
Kurşun	6	54,29 $\pm$ 3,31 ^{ab}	18,06 $\pm$ 1,00	10,85 $\pm$ 0,51 ^{ab}	89 $\pm$ 7 ^a	4,75 $\pm$ 0,34 ^b	3,13 $\pm$ 0,97	0,73 $\pm$ 0,05 ^a	9,97 $\pm$ 1,98
Zeytinyağı	6	39,00 $\pm$ 3,29 ^a	20,07 $\pm$ 1,68	5,01 $\pm$ 0,43 ^a	181 $\pm$ 48 ^b	1,20 $\pm$ 0,61 ^a	4,45 $\pm$ 1,14	1,48 $\pm$ 0,51 ^{ab}	15,19 $\pm$ 4,08
Özüt	6	64,50 $\pm$ 4,73 ^{bc}	22,58 $\pm$ 1,68	15,11 $\pm$ 1,66 ^{bc}	81 $\pm$ 15 ^a	1,15 $\pm$ 0,67 ^a	3,90 $\pm$ 1,22	1,78 $\pm$ 0,60 ^b	14,45 $\pm$ 5,62
Zyt- kurşun	6	65,00 $\pm$ 10,95 ^{bc}	21,33 $\pm$ 1,54	13,57 $\pm$ 1,31 ^b	200 $\pm$ 38 ^b	3,43 $\pm$ 0,50 ^c	4,31 $\pm$ 1,67	1,59 $\pm$ 0,62 ^{ab}	13,24 $\pm$ 5,39
Özüt- kurşun	6	84,57 $\pm$ 14,23 ^c	21,46 $\pm$ 2,13	22,05 $\pm$ 5,3 ^c	118 $\pm$ 17 ^b	3,13 $\pm$ 0,41 ^c	3,81 $\pm$ 1,14	1,31 $\pm$ 0,62 ^{ab}	11,73 $\pm$ 4,61

* Katalaz enzimi aktivite değerleri 100 ile çarpılmıştır.

Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki fark önemlidir (p<0,05).

4. TARTIŞMA

Kurşun toksik etkisini başta alyuvarlar olmak üzere farklı hücrelerde yapısal ve işlevsel değişikliklere sebep olarak gösterir. Düşük dozlardaki kurşun iki aminolevulinik asit kullanarak porfobilinojen molekülünün sentez edilmesini katalize eden δ -ALAD enziminin etkinliğini azaltarak, alyuvar yapısındaki Hb'nin yapı taşı olan hem sentezini bozmaktadır. Kurşunun sitokrom, katalaz ve peroksidazlar gibi enzimleri inaktive ettiği bildirilmiştir (Patrick Lyn, 2006a; Rendón-Ramirez ve ark., 2007).

Kurşunun oksidatif stresi 3 farklı yolla meydana getirdiği bilinmektedir;

1- Delta amino levulinik asit dehidratazın kurşun tarafından inhibisyonu ile kurşun levulinik asit birikimine sebep olur ve bu asit serbest radikallerin potansiyel kaynağıdır.

2- Kurşun Fe^{+2} varlığında biyolojik zarlarda lipit peroksidasyonu yapar.

3-Kurşunun serbest radikalleri süpüren enzimleri ve GSH azaltması ile serbest radikal üretimi artar (He ve ark., 2016; Patrick Lyn, 2006a ve Sajitha ve ark., 2010).

Çalışmada oksidatif strese ve reaktif oksijen türlerinin açığa çıkmasına neden olan kurşun zehirlenmesinde birçok fenolik madde içeren ve antioksidan özelliği bilinen sızma zeytinyağı (Owen ve ark., 2000a; Warleta ve ark., 2011) ile yüksek miktarda minör polar komponent (MPC) sınıfına giren sekoiridoidler, oleuropein, oleuropein derivatları, tirozol ve hidroksitirozol içeren zeytin ağacı yaprağı özütünün (Hashmi ve ark., 2015; Jemai ve ark., 2008 ve Owen ve ark., 2000a) etkileri araştırılmıştır.

Hsu ve ark. (1997)'nin yaptığı çalışmada kontrol gruplarındaki ratların kan kurşun düzeyinin 1,4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ olduğu, intraperitoneal 10 mg/kg kurşun asetat uyguladıkları ratlardaki düzeyin 33,6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ yükseldiği rapor edilmiştir. Aynı araştırmacılar 6 hafta boyunca i.p. olarak 10 mg/kg kurşun asetat uyguladıkları ratlarda kan kurşun düzeyinin 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$ ile 45,5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ arasında değiştiğini bildirmektedirler. Berrahal ve ark. (2011), kontrol gruplarında kan kurşun düzeyinin 1,76 $\mu\text{g}/\text{dl}$ olduğu

ratlara 40 gün boyunca su içerisinde kurşun (50 mg/L) içirdiklerinde kan kurşun düzeyinin 12,67 µg/dl, 65 gün içirdikleri ratlarda ise 7,49 µg/dl yükseldiğini tespit etmişlerdir. Iavicoli ve ark. (2006), kontrol grubu kan kurşun düzeyi 0,80 µg/dl olan ratlara yem ile 40 ppm kurşunu 270 gün boyunca verdiklerinde kan kurşun düzeyini 11,57 µg/dl olarak bulmuşlardır. Çalışmada kontrol grubundaki ratlarda kan kurşun düzeyi $1,57 \pm 0,59$ µg/dl olarak saptanmıştır. Özüt verilen grupta kan kurşun düzeyi $1,15 \pm 0,67$ µg/dl ve zeytinyağı verilen grupta kan kurşun düzeyi $1,20 \pm 0,61$ µg/dl olarak bulunmuştur. Buna karşın 25 mg/kg kurşun asetatın 5 gün boyunca i.p. yolla uygulandığı kurşun grubundaki ratlarda ise kan kurşun düzeyi $4,75 \pm 0,34$ µg/dl olarak tespit edilmiştir.

Dounias ve ark. (2010), bildirdikleri vakada kan kurşun seviyesinin yapılan suksimer tedavisi ile azaldığını göstermişlerdir. Visioli ve Galli (1994) de yaptıkları çalışmada sızma zeytinyağının ve zeytin ağacı yaprağının en önemli polifenolu olan oleuropeinin 10^{-5} M derişimde CuSO_4 ile tetiklenen LDL oksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir. Buekers ve ark. (2009), memelilerde kan kurşun düzeyinin toksik eşiğinin türler arasında çok geniş aralıklarda değiştiğini ve genel olarak memelilerde 10 µg/dl'nin altında olduğu durumlarda hem sentez yolağını etkilediğini, 10 µg/dl üzerindeki konsantrasyonlarda da üreme, hematolojik sistem ve büyüme ile ilgili çeşitli değişkenler üzerinde etkilerinin başladığını söylemişlerdir. Çalışmada özüt-kurşun ($3,13 \pm 0,41$ µg/dl) ve zeytinyağı-kurşun ($3,43 \pm 0,50$ µg/dl) gruplarının kan kurşun düzeylerinin kurşun grubundan ($4,75 \pm 0,34$ µg/dl $p < 0,05$) anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kurşun ile beraber zeytinyağı ve zeytin yaprağı özütü verilen gruplarda kan kurşun düzeylerinin kurşun grubuna göre belirgin bir azalmanın olması, kurşuna maruz kalındığında hücresel düzeydeki zararlı etkileri önlemeye yönelik olarak antioksidan etkinlikleri nedeniyle zeytinyağı ve zeytin yaprağı özütünün kullanılabileceğine işaret etmektedir. Bu etki kurşunun dolaşım sisteminden kemik iliği ve/veya iç organ dokularına artan geçişi ile olabileceği gibi, oluşturduğu şelasyon veya şelasyonlar aracılığı ile kurşunun kandan vücut dışına atılmasının artırılması yoluyla da gerçekleşmiş olabilir. Ancak, bu çalışmanın bulguları bu etkinin mekanizmasını açıklamak için yetersizdir.

Gürer ve ark. (1998), beş hafta boyunca içme suyuna 2000 ppm düzeyinde kurşun ekleyerek farelere içirdikleri çalışmada, alyuvar sayısı, Hct değeri ve Hb derişiminin önemli derecede düştüğünü gözlemlemişlerdir. Dounias ve ark. (2010), kurşuna maruz kalmanın Hct değeri, Hb derişimini düşürdüğünü, bu durumun oral şelatörlerden olan suksimer tedavisi ile normal değerlere döndüğünü bildirmişlerdir. Hashem ve ark. (2009), 30 gün boyunca 1-5 mg/kg canlı ağırlık dozda kurşun asetat içirdikleri ratlarda Hb, ortalama alyuvar hemoglobini (OAHb) ve ortalama alyuvar hemoglobin derişimi (OAHbD) düzeylerinin kontrol grubuna göre düştüğünü, ortalama alyuvar hacmi (OAH) düzeyinin ise yükseldiğini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, kurşunun OAH'yı artırarak ve OAHbD düzeyini azaltarak makrositer hipokrom anemiye şekillendirdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada kurşun verilen ratlarda Hb değerinin $14,88 \pm 0,35$ g/dl, OAHb değerinin ise $19,40 \pm 0,21$ pg olduğu ve aradaki fark önemsiz de olsa, bu değerlerin kontrol grubundaki değerlere göre ($15,04 \pm 0,43$ g/dl, $19,80 \pm 0,48$ pg) biraz daha düşük olduğu saptanmıştır.

Alyuvarların kurşuna yüksek affinite gösterdiği ve dolaşımdaki kurşunun %99'unu bağladığı, kurşunun hücre zarını destabilize ederek ve zar geçirgenliğini bozarak alyuvarlarda hemolize sebep olduğu bildirilmektedir (Jassim ve Hassan 2011; Patrick Lyn, 2006'a; Mugahi ve ark., 2003 ve Pisoschi ve Pop, 2015). Arif ve ark. (2008), genetik toksisitenin tespiti için yaptıkları comet testinde, 5 gün boyunca 25 mg/kg i.p. kurşun uygulanan ratlarda kurşunun kan hücrelerinde DNA hasarı meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağı özütü verilen ratların OAHb değerinin kurşuna maruz bırakılan ratlara göre istatistiksel anlamlı ($p < 0,05$) şekilde yükseldiği belirlenmiştir. Sızma zeytinyağı ve zeytin yaprağı özütündeki bolca varolan polifenollerin hidrojen peroksit ile tetiklenen DNA hasarını engellediği ve tirozolün bu işlevi hidroksitirozole göre daha etkin şekilde gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Fabina R ve ark., 2008).

Çalışmada OAHbD düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık ($p < 0,05$) gözlenmiş olup, kurşun verilen grupta ortalama OAHbD değerinin ($37,95 \pm 0,35$ g/dl) kontrol grubuna ($40,38 \pm 0,24$ g/dl) göre daha düşük olduğu ($p < 0,001$) saptanmıştır. İstatistik açıdan önemsiz de olsa zeytinyağı-kurşun ($38,02 \pm 0,40$ g/dl) ve özüt-kurşun ($38,11 \pm 0,42$ g/dl) gruplarının OAHbD değerleri

kurşun verilen gruba göre biraz yükselmiştir. Bu bulgular kurşunun uygulandığı doz ve sürede kemik iliğinde alyuvar yapımı ve hem sentezini olumsuz olarak etkilediğine ve sızma zeytin yağı ve zeytin yaprağı özütünün bu hasarı kısmen engellediğine işaret etmektedir.

Demir, reaktif oksijen oluşumu ile şekillenen lipit peroksidasyonunu başlatan ve devam ettiren bir metaldir. Manna ve ark. (1999) alyuvarlarda oksidatif hasar oluştuğunda amino asitlerin hücre içine enerji kullanılarak transportunun azalmasına karşı, hidroksitirozolün hücreyi lipit peroksidasyonuna ve oksidatif hasar sonucu oluşan hemolizden koruduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada özüt grubunda alyuvar sayısı ($8,29 \pm 0,30 \times 10^6/\text{mm}^3$), Hb derişimi ($16,20 \pm 0,62 \text{ g/dl}$) ve OAH ($50,9 \pm 0,64, \mu^3$) değeri kontrol grubundaki ratlara göre anlamlı olamayan yükselme göstermiştir. Bu durum özütün içerisinde bulunan oleuropein ve derivatlarının kemik iliğindeki eritropoietik etkinliği koruduğunu göstermektedir. Ortalama alyuvar hacmi ve OAHb değerleri özüt-kurşun ($19,60 \pm 0,16 \text{ pg}$, $50,29 \pm 0,64 \mu^3$) ve zeytinyağı-kurşun ($19,63 \pm 0,11 \text{ pg}$, $51,67 \pm 0,61 \mu^3$) gruplarında, kurşun grubuna ($19,40 \pm 0,21, \text{ g/dl}$, $51,17 \pm 0,79 \mu^3$) göre istatistiksel anlamlı olamayan artış gözlenmiştir.

Paiva-Martines ve ark. (2009) ROS ve O_2^- anyonun artmasının antioksidan savunmanın çöktüğünün göstergesi olduğunu bildirmektedirler. Plazmada ya da alyuvar içinde H_2O_2 ve O_2^- gibi reaktif oksijen türleri konsantrasyonlarının artması oksidatif stres oluşturur ve alyuvar zarında ve hemoglobinde oksidatif hasara yol açar. Çok çeşitli ksantobiyotikler ve ağır metaller oksidatif redüksiyona sebep olarak alyuvarların parçalanmasına neden olur (Pisoschi ve ark., 2015, Siti ve ark., 2015). Çalışmada kan ortalama Hb değerinin sadece kurşun uygulanan grupta düşük, buna karşın zeytinyağı-kurşun grubunda yüksek olması zeytinyağında bulunan MPC'lerin istatistiksel olarak onaylanmamış olsa da antioksidan etkinlik göstererek alyuvar ve hemoglobinde şekillenen oksidatif stresi engellemesine bağlı olduğuna işaret etmektedir.

Haleagrahara ve ark. (2010), ROS'un kurşun zehirlenmesinin zararlı etkisini ortadan kaldırmaya yardımcı olmak için vücutta antioksidan savunma sistemlerinin artırılmasını terapötik bir yaklaşım olarak bildirmişlerdir. Çalışmada antioksidan özellikleri bilinen zeytin ağacı yaprağı özütünün kontrol grubuna göre alyuvar sayısını,

Hb ve Hct değerlerini istatistiksel anlamlı olmasa da biraz artmasına neden olurken, sızma zeytin yağında bu değerlerin biraz azalma eğiliminde oldukları gözlenmiştir. Buna karşın, özüt-kurşun grubunda ise alyuvar hacmi ve Hb konsantrasyonunun kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada sızma zeytinyağı ve kurşun verilen grupta Hb ve ortalama alyuvar hacmi değerlerinde kurşun grubuna göre istatistiksel anlam göstermeyen bir yükselme gözlenmiştir. Benzer şekilde, kurşun verilen grubun değerleri ile karşılaştırıldığında zeytinyağı ve özütün kurşun ile birlikte verildiği gruplarda Htc, OAH, OAHb ve OAHb derşimi değerlerinin istatistiksel anlamlı olmasa da yükselme ve kontrol grubu değerlerine yaklaşma eğiliminde olduğu görölmüştür.

Kurşunun ana hedef dokularından biri hematolojik sistemdir. Serbest demir iyonları δ -ALA enzimlerinin katalizlediği oksidasyon ve serbest O_2 radikallerinin oluşmasını ve hücre zarında lipit peroksidasyonu tetikler. Buna bağlı olarak hücrede GSH, CAT gibi antioksidan enzimlerin etkinliği artarak serbest radikallerin süpürölmesi sağlanır (Dua ve ark., 2016; Jium ve Hsien,1994 ve Sugawara ve ark.,1991). Kurşun toksikasyonunun ileri aşamalarında antioksidan savunma sisteminin baskılanması ile birlikte oksidatif stresin hücresel ve sistemler üzerindeki görünür etkileri ortaya çıkar. Düşük kurşun düzeylerinde ortaya çıkan zehirlenmelerde SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzimlerin seviyeleri artar. Yüksek dozda kurşuna maruz kalındığında ise bu enzim düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Chiba ve ark.,1996; Kasperczyk ve ark., 2004; Patrick Lyn, 2006a; Sugawara ve ark., 1991).

Çalışmada 25 mg/kg kurşun uygulanan grubun SOD ($3,13 \pm 0,97$ $\mu\text{mol/gHb}$) aktivitesinin kontrol grubuna ($3,24 \pm 1,20$ $\mu\text{mol/gHb}$) göre istatistiksel olarak onaylanmamış olasa da düşük olduğu gözlenmiş olup, bu durumun kurşuna kısa süre içinde yüksek dozda maruz kalınmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Berrehal ve ark. (2007), 5 mg/kg ve 15 mg/kg i.p. yolla yedi gün boyunca kurşun uyguladıkları ratlarda antioksidan enzimlerden SOD seviyesinin azaldığını ve 15 mg/kg kurşun uygulanan grupta azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada Haleagrahara ve ark. (2010), kurşun asetat verilen ratlardaki SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre düştüğünü

bildirmişlerdir. Çalışmada zeytinyağı ve özüt verilen gruplarda SOD aktivitesinin kontrol ve kurşun gruplarına göre yüksek olduğu saptanmıştır.

Patil ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada kurşuna maruz kalan kişilerde Hb ve OAH değerleri ile SOD enzimi aktivitesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Çalışmada kurşun verilen grupta Hb ($14,88 \pm 0,35$, g/dl) ve SOD ($3,13 \pm 0,97$ U/mgHb) değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olmasa da düşük, buna karşın özüt-kurşun ve zeytinyağı-kurşun grubunda tüm antioksidan değişkenler kurşun grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu durum özüt ve sızma zeytinyağında bulunan oleuropein, tirozol ve hidroksitirozol başta olmak üzere polifenollerin oksijen radikallerini süpürme etkisi olan SOD ve CAT enzim aktivitesi etkinliğini artırdığını bildiren çalışmaları desteklemektedir. Oleuropein ve HT'nin $O_2^{\cdot -}$ anyonlarını ve hipoklorür asitten oluşmuş radikalleri inhibe ettiği Visioli ve ark. (2003) tarafından ortaya konmuştur.

Çalışmada özüt verilen gruptaki alyuvar SOD ($3,90 \pm 1,22$ μ mol/gHb) aktivitesinin kontrol grubuna ($3,24 \pm 1,20$, μ mol/gHb) göre biraz daha yüksek olduğu gözlemlendi. Polifenol açısından ve oleik asitten zengin sızma zeytinyağı içirilen grubun SOD aktivitesinin özüt verilen gruba göre daha fazla yükseldiği gözlenmiş olup, bunun sızma zeytinyağındaki diğer polifenollerin etkisine bağlı olabileceği değerlendirilmiştir.

Çalışmada kontrol ($0,93 \pm 0,33$ k/mgHb) grubu ile karşılaştırıldığında, kurşun grubunun CAT ($0,73 \pm 0,05$ k/mgHb) aktivitesinin, azaldığı saptanmıştır. Güner ve ark. (1998), ratlara kurşun asetat verdikleri çalışmada, kontrol grubuna göre MDA düzeyi ve CAT aktivitesini istatistiksel anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada CAT aktivitesinin özüt grubunda ($1,78 \pm 0,60$ k/mgHb) diğer gruplara göre daha yüksektir. Çalışmada ülkemizde Gemlik bölgesinde yetişen zeytin ağacı yapraklarından ekstaraksiyon ile elde edilen özütün yaklaşık %20 oranında oleuropein içerdiği göz önüne alındığında, özütün antioksidan etkinliğinin SOD ve CAT gibi antioksidatif enzimler üzerinden gerçekleştirdiğine işaret etmektedir (Covas ve ark., 2015; Goncalves ve ark., 2016; Pitozzi ve ark., 2012 ve Virruso ve ark., 2014)

Berrehal ve ark. (2007) MDA enzimi seviyesinin 15 mg/kg kurşun uygulanan grupta arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da kurşun grubunda MDA düzeyinin, kontrol grubuna göre literatürle uyumlu olarak arttığı gözlemlendi. İnflamasyonun dokularda miyeloperoksidaz (MPO) inhibisyonu ile akut yangıları durdurabildiği, indüklenmiş nitrik oksit (iNOS) seviyesini azaltarak ve oksidatif stresi baskılayarak lipit peroksidasyonunu engellediği bildirilmektedir. Tiyobarbitürük asit ile reaksiyona giren maddelerin azalması MDA ve iNOS seviyesini azaltmaktadır. Kurşunun tiyobarbitürük asit ile reaksiyona giren lipit peroksidasyon ürünleri, MDA düzeyini artırır (Berrahal ve ark.,2007; Berrahal ve ark.,2011).

İmplezeri ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, antioksidan etkinliği bilinen oleuropein'in spinal nöronlarda hücre zararını azalttığı, motor iyileşmeyi hızlandırdığı ve lipit peroksidasyonunu önlediğini belirlemişlerdir. Çalışmada MDA seviyesinin zeytinyağı ($15,19 \pm 4.08$ U/mgHb) ve özüt gruplarında ($14,45 \pm 5.62$ U/mgHb), kontrol ($9,75 \pm 3.36$ U/mgHb) ve kurşun gruplarına ($9,97 \pm 1.98$ U/mgHb) göre yüksek olduğu bulunmuştur. Zeytinyağı-kurşun ve özüt-kurşun gruplarında ise MDA seviyesi kontrol ve kurşun grubuna göre daha yüksek, zeytinyağı ve özüt grubuna göre ise düşük kalmıştır. Bu durum antioksidan enzimlerin oksidatif strese neden olan kurşun ile mücadele ettikleri gerçeğini desteklemektedir. (Dua ve ark., 2016 ve Hashmi ve ark., 2015).

Othman ve El Missiry (1998), yaptıkları çalışmada 100 μ mol/kg dozunda kurşun verilen ratlarda total kolesterol seviyelerinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar aynı zamanda antioksidan özelliği bilenen selenyum enjeksiyonundan sonra kolesterol seviyesi açısından kontrol grubu ile selenyum grubu arasındaki farkın ortadan kalktığını saptamışlardır. Çalışmada kan kolesterol düzeyinin kontrol grubuna (45 ± 3.48 , mg/dl) göre kurşun grubunda (54.29 ± 3.31 mg/dl) yükseldiği gözlemlendi. Çalışmada kurşunun LDL ($10,85 \pm 0.51$ mg/dl) değerini yükselttiği buna karşın yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ($18,06 \pm 1.00$ mg/dl) seviyesini düşürdüğü saptandı. Bu durum antioksidan mekanizmaların bozulmasının kan lipit profilini ateroskleroz yönüne doğru değiştirdiğini göstermektedir. Bu deneyde sızma zeytinyağının kolesterol ve LDL seviyesini düşürüp, HDL seviyesini artırması ve özüt uygulamasının HDL seviyesini yükseltmesi polifenollerin ateroskleroz oluşumuna yol

açan mekanizmaların önlenmesi yönünde etkili olduğunu düşündürmektedir. Ancak, literatürde antioksidan etkinliğin bu açıdan tek başına yeterli olmayacağı, beraberinde PUFA'ların da bu lipit parametrelerinin düzeltilmesinde önemli olduğu da vurgulanmaktadır. (Castaner ve ark., 2012; Covas ve ark., 2006; Fito ve ark., 2007; Hashmi ve ark., 2015 ve Priora ve ark., 2008).

Deiana ve ark. (2007) ferrik-nitritotriasetat (Fe-NTA) vererek oksidatif hasar oluşturdıkları ratlara HT, tirozol ve oleuropein aglikon içeren MPC'lerden 25 mg/kg canlı ağırlık ve 50 mg/kg canlı ağırlığa i.p. uyguladıkları çalışmalarında plazma kolesterol ve doymamış yağ asidi düzeylerinin artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmada kurşun asetat verilen grupta kolesterol düzeyinin $54,29 \pm 3,31$ mg/dl iken, beş gün boyunca %20,01 oleuropein içeren zeytin ağacı yaprağı özütü verilen grupta kan kolesterol düzeyinin $64,5 \pm 4,73$ mg/dl olduğu ve özüt-kurşun grubunda ise kolesterol seviyesinin ($84,57 \pm 14,23$ mg/dl, $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi.

Deiana ve ark. (2007) demirin kolesterolü okside ettiğini, fenolik bileşiklerin ise oksidatif değişiklikleri azaltarak kolesterolü oksidatif stresten koruduğunu, minör polar komponentlerin organizmada lipit peroksidasyonu düşürdüğünü, bunu da serbest radikalleri süpürerek yaptıklarını bildirmişlerdir. Minör polar komponentlerin fosfolipit bariyerin sulu fazında serbest radikallerin fosfolipid peroksidasyonunu membranın yüzeyindeki sulu peroksil radikallerini ve membrandaki alfa tokoferolü rejenere ederek koruyucu etki gösterdikleri Oliveras-López ve ark. (2008) tarafından bildirilmiştir.

Jemai ve ark. (2008) zeytin ağacı yaprağı özütü yedirilen ratların kan kolesterol ve LDL seviyelerinin kontrol grubuna göre düştüğünü, buna karşın HDL seviyesinin arttığını bildirmiştir. Düşük kan kolesterol ve LDL düzeyleri ile yüksek kan HDL değerlerinin koroner kalp hastalıkları riskini azalttığı bilinmektedir. Bu çalışmada da özütün kan LDL ($15,11 \pm 1.66$, mg/dl, $p < 0.05$) ve HDL ($22,58 \pm 1.68$, mg/dl) düzeylerini arttırdığı gözlemlendi.

Diyetteki fenolik bileşikler, LDL lipoproteinine bağlanabilir. Covas ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada ateroskleroz oluşumunda anahtar rol oynadığı bilinen

artmış serum LDL düzeyinin, sızma zeytinyağı alınmasından sonra kandaki tirozol, HT ve oleuropeinin derivatı olan 3-o metil HT'derişimi ile doğrudan ilişkili olarak lipit peroksidasyondan korunduğunu bildirmiştir. Plazmada bulunan antioksidanların miktarının az olması LDL'nin okside olmasına neden olur. Fenolik bileşikler ise LDL'ye bağlanarak arteriyel intimada oluşan peroksitleri yok ederler (Lepore ve ark., 2015). Çalışmada özütün, kan HDL ($22,58 \pm 1.68$, mg/dl) seviyesini zeytinyağı grubuna ($20,07 \pm 1.68$ mg/dl) göre daha fazla yükselttiği gözlenmiş olup, bu etkiyi trigliserit seviyesini artırmadan sağladığı görülmüştür.

Eurolive çalışma grubundan Cicero ve ark. (2008) Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde 200 sağlıklı erkek üzerinde yürüttükleri çalışmada, HDL düzeylerinin polifenol içeriği farklı zeytinyağları ile beslenen bütün bireylerde artış gösterdiğini bildirmişleridir. Zeytinyağı tüketiminin kan LDL düzeylerini, LDL alt tiplerinin miktarlarını ve plazma apolipoproteinlerini artırdığını bildiren Pedersen ve ark., (2000), tohumlardan elde edilen yağlara göre zeytinyağının kan lipit profilini içeriğindeki squalen ve fitosterol düzeylerine bağlı olarak değiştirebildiğini vurgulanmıştır. LDL'nin oksidasyonu yağın içeriğindeki yağ asitlerinin tipi ile ilgilidir. Oleik asitten zengin LDL, linoleik asitten zengin LDL ye göre daha az okside olur. Çalışmada özütün LDL ($15,11 \pm 1.66$, mg/dl, $p < 0.05$) değerini istatistiksel anlamlı yükselttiği belirlendi. Yanı sıra, HDL düzeyinde ($22,58 \pm 1,68$, mg/dl) de artış olması, özütün kandaki LDL'nin alt tiplerini değiştirebileceği fikrini akla getirmektedir (Cicero ve ark., 2008; Covas ve ark., 2006 ve Lepore ve ark., 2015).

Jemai ve ark. (2009), alloksanla diyabet oluşturdukları ratlara hem oleuropein hem de hidrokstirozolu 8 mg/kg ve 16 mg/ kg olarak iki doz halinde uyguladıklarında kan kolesterol düzeylerinin yükseldiğini bulmuşlardır. Çalışmada antioksidan dengeyi ve antioksidan enzimleri etkileyerek zehirlenme yapan kurşunun kolesterol seviyesini kontrol grubuna göre yükselttiği gözlemlendi. Kurşun aynı etkiyi kan LDL değeri için yapmış olup LDL değerini kontrol grubuna göre yükseltmiştir.

Castaner ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada trigliserit değerlerinin düşük polifenol içeren zeytinyağı verilen grupta yüksek, polifenol yoğunluğu yüksek olan grupta ise düşük bulmuşlardır. Covas ve ark. (2006), trigliserit değerlerini zeytinyağının alınma zamanına göre ölçtüklerinde, dört saate kadar kan

trigliseritlerinin arttığını, altıncı saatte azaldığını bulmuşlardır. Yüksek polifenol içeren zeytinyağı verilen grupta kan trigliserit düzeylerinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmada, trigliserit değerlerinin zeytinyağı verilen gruplarda arttığı gözlenmiştir. Bu artışın, uygulamadan yarım saat sonra kan alınmasından ve zeytinyağındaki yüksek polifenolik içerikten kaynaklı olabileceği değerlendirilmektedir. Kullanılan sızma zeytinyağı doğal yollardan elde edilmiş olup, diğer sızma zeytinyağlarına göre daha yüksek (460,2474 mg/kg) fenolik bileşik içerdiği ortaya konmuştur.

Somova ve ark. (2003), genetik olarak hipertansif ratlardaki SOD aktivitesinin oleuropeinin (60 mg/kg i.p.) uygulanmasıyla yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmada oleuropein içeren özüt ve zeytinyağı verilen gruplarda, SOD ve CAT aktivitesinin kurşun ve kontrol gruplara göre yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, zeytinyağı ve özüt verilen gruplarda genel olarak antioksidan enzimler yükselmiştir. Bu yükselişin sızma zeytinyağı ve özütte bulunan polifenollerin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Son çalışmalar zeytinyağında bulunan polifenollerin kuvvetli antioksidan etkisi olduğunu *in vitro* olarak göstermiştir. Bu kimyasalların sağlık için yararlı etkileri olduğu bilinmektedir (Deiana ve ark., 2007; Covas ve ark., 2015; Penalvo ve ark., 2016 ve Virruso ve ark., 2014). Sızma zeytinyağında bulunan polifenoller karmaşık bir yapı sergilerler. Fenil alkoller olarak adlandırılan, hidroksitirozol ve tirozol ile bu maddelerin glikozitleri antioksidan aktiviteyi gösteren en yaygın bileşiklerdir (Deiana ve ark., 2007; Hashim ve ark., 2008; Gordon ve ark., 2001; ve Tagliaferri ve ark., 2014).

Domitrovic ve ark. (2012), CCl₄ ile ratlarda karaciğer hasarı oluşturdukları çalışmalarında, oleuropeinin karaciğeri okidatif ve nitrodatif zarardan koruduğu göstermişlerdir. Ayrıca, SOD aktivitesinin oleuropein verilen grupta yükseldiğini göstermişler ve karaciğer hasarının engellenmesinde antioksidan sistemin enzimlerinin artmasının önemli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozda oleuropeini i.p. uygulayan araştırmacılar, koruyucu etkinliğin doz bağımlı olduğunu da belirtmişlerdir. Bu çalışmada 60 mg /kg oleuropien olacak şekilde özüt i.p. olarak ratlara verilmiştir. Oleuropein içeren özütün antioksidan enzimleri yükselttiği görülmüştür. Buna karşın, kurşun antioksidan enzimlerden SOD, CAT

seviyelerini kontrol grubuna göre düşürmüş ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyesini artırmıştır.

Çalışmada özüt ve sızma zeytinyağı verilen grupta kontrol ve kurşun grubuna göre tüm antioksidan enzimler yükselmiştir. Kurşun-özüt ve kurşun-zeytinyağı verilen grupta antioksidan enzimler kontrol ve kurşun grubuna göre yükselmiş olup zeytinyağı grubuna göre düşük kalmışlardır. Özüt grubunda SOD aktivitesi ($3,90 \pm 1.22$, $\mu\text{mol/gHb}$) özüt-kurşun grubuna ($3,81 \pm 1.1$ $\mu\text{mol/gHb}$) göre yüksektir. Bu durum antioksidan enzimlerin özüt ve zeytinyağı gibi polifenollerden zengin maddelerle desteklendiğinde etkinliklerinin arttığı fikrini desteklemektedir. Çalışmada elde edilen bulgular, zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağı derivatlarının zengin polifenolik içeriklerinden dolayı sağlıklı bir diyet için kullanılması gerektiğini bir kez daha ortaya koymaktadır (Covas ve ark.,2015; Hashmin ve ark., 2015; Jemai ve ark., 2008 ve Pitozzi ve ark.,2012).

Balık yağı, mısır yağı ve zeytinyağı verilen ratlar ile yapılan çalışmada, zeytinyağı alan ratların makrofajlarında daha az $\text{O}_2^{\cdot-}$ anyonu olduğu, bu durumdan MPC'lerin sorumlu olabileceği konusunda bilgiler mevcuttur (Vivancos ve Moreno, 2005).

Çalışmada oral verilen doğal sızma zeytinyağının kan kolesterol seviyesini düşürme, HDL ve LDL seviyesini ise kontrol grubuna göre yükseltme eğilimi yarattığı gözlenmiş olup bu etkinin, sızma zeytinyağında bulunan MPC'den ve PUFA'dan kaynakladığı değerlendirilmiştir. Çalışmada MPC yönünden yoğun olan özütün kan lipit göstergelerinden total kolesterolü, kontrol ve sızma zeytinyağı gruplarına göre yükseltmesinin HDL seviyesindeki artıştan kaynaklı olduğu, MPC'nin lipoproteinleri hücresel yapıları oksidatif strese korumaya yönelik etkileyebildikleri fikrini desteklemektedir.

Moreno, (2003), makrofaj hücre kültüründe *in vitro* yaptıkları çalışmada sızma zeytinyağındaki skualen, beta sitosterol ve tirozol gibi MPC'nin iNOS seviyesini ve NO salınımını önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada tirozol ve beta sitosterol eklenmesinin $\text{O}_2^{\cdot-}$ anyon oluşumunu ve H_2O_2 , ROS seviyesini azalttığı gözlenmiştir. Çalışmada SOD aktivitesinin zeytinyağı grubunda ($4,45 \pm 1.14$,

$\mu\text{mol/gHb}$) özüt grubuna ($3,90 \pm 1.22 \mu\text{mol/gHb}$) göre daha yüksek bulunması, CAT enzimi aktivitesinin de özüt grubunda ($1,78 \pm 0.60, \text{k/mgHb}$, $p < 0.05$) en yüksek bulunması, zeytinyağının MPC antioksidan etkinlikte oleuropeine göre daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Sızma zeytinyağında bulunan fenolik bileşiklerin toksisitesi ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. D'angelo ve ark. (2001) *in vivo* ve *in vitro* yaptıkları çalışmada HT'nin toksik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan özütün ratlar üzerinde toksik bir etki oluşturmadığı, ayrıca özüt grubunun hematolojik değerleri ve antioksidan enzimlerin aktivitesini kontrol grubuna göre yükselttiği gözlemlendi. Bu bulgular oleuropein ve derivatlarının i.p. uygulamada bile toksik etkisinin olmadığını desteklemektedir.

Manna ve ark. (1999), *in vitro* olarak alyuvarları H_2O_2 ile muamele edildikten sonra $100 \mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$ ve $250 \mu\text{M}$ HT ile inkübe ettiklerinde HT'nin hemoliz oranlarını ve oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeyini doza bağımlı olarak anlamlı derecede düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. HT'nin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin demir iyonları ile şelat oluşturma yeteneği ile ilişkili olabilir. Çalışmada oleuropein, HT ve tirozol yönünden yoğun özütün MDA seviyesini kontrol grubuna göre yükselttiği ($14,45 \pm 5.62, \text{U/mgHb}$), kurşun özüt ($11,73 \pm 4.61, \text{U/mgHb}$) ve kurşun ($09,97 \pm 1.98, \text{U/mgHb}$) grupları karşılaştırıldığında ise kurşun özüt grubunun MDA değerinin kurşun grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum oleuropein ve HT'nin *in vivo* antioksidan etkinlik gösterebileceği şeklinde yorumlandı.

Alirezai ve ark. (2012), etanol ile gastrit oluşturup oleuropeinin etkinliğini gözlemledikleri çalışmada, 12 mg/kg ve 18 mg/kg oleuropein verdikleri ratlarda ülser indekslerinin 6 mg/kg verilen ratlara göre anlamlı derecede azaldığını, bu etkinin artmış SOD ve CAT aktivitesinden kaynaklı olduğunu ve oleuropeinin gastrik mukozal hasarı önlediğini bildirmişlerdir. Çalışmada %20,01 oleuropein içeren özütün kan kurşun düzeyini düşürdüğü, SOD ve CAT aktivitesini artırdığı, kurşunun neden olduğu hücresel hasarlara karşı etkili olduğu hematolojik ve biyokimyasal bulgularla desteklenmiştir.

Arantes-Rodrigues ve ark. (2011), ratlarda $0,25$, $0,50$ ve $0,75 \text{ mg/kg}$ oleuropeini rasyona katarak 14 hafta verdikleri çalışmada yüksek dozda oleuropeinin mortaliteyi artırdığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada yüksek dozda oleuropeinin

karaciğer enzimlerinden alanin aminotransferaz ve alkalen fosfataz değerlerini anlamlı derecede yükselttiği gözlenmiş ve karaciğer histopatolojisinde hepatik fibrosis ve nekrosis ile ilgili değişiklikler belirlenmiştir. Çalışmada, sızma zeytinyağı ve zeytin ağacı özütü verilen gruplarda klinik toksik bir etki tespit edilmedi (Gao ve ark.,2015; Marchetti ve ark.,2015 ve Penolva ve ark., 2016).

Son zamanlarda anitoksidan yiyeceklerin etkileri üzerine odaklanılmıştır. Zeytin ve zeytinden elde edilen çeşitli ürünlerin de bu özellikleri nedeni ile hem bilimsel hem de insan ve hayvan gıda tüketiminde ayrı bir önem kazandığı görülmektedir. Yüksek fenolik madde içeriği nedeni ile zeytin ağacının meyvesi, yağı, yaprağı ve diğer ürünleri oksidatif stresin neden olduğu hastalıkları engelleyebildikleri ve ayrıca doğal besin kaynağı olma özellikleri nedeni ile sürekli tüketildiklerinde de toksik etkilerinin olmadığı bilinmektedir. (Covas ve ark.,2015 Hashmi ve ark.,2015; ve Siti ve ark.,2015).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Şelasyon tedavisi kurşun toksikasyonun önlenmesinde dayanak noktasıdır. Buna rağmen kurşun toksikasyonunu engellemek amacıyla farklı şelatörler ve farklı stratejiler araştırılmaktadır. Oksidatif stres kurşun zehirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Antioksidan ve şelasyon kombinasyonu zehirlenmenin önlenmesinde daha etkili koruma sağlamaktadır. *Centella asiatica* ve *Etlingera elatior* gibi bitki özütleri, lipoik asit, N-asetil sistein ve melatonin kurşun toksikasyonu için oluşturulmuş hayvan modeli çalışmalarında kurşun zehirlenmesine karşı kullanılmışlardır. Sızma zeytinyağının ve zeytin ağacı özütünün antioksidan etkinlik gösterdikleri belirlenmiş olup, bu etkinliğin antioksidanın dozuna bağımlı olduğu rapor edilmiştir.

Oleuropeinin toksik etkisinin olmadığı yapılan çalışmada gösterilmiştir. Akdeniz tarzı beslenmenin temel bileşeni olan sızma zeytinyağının kan lipit seviyelerini kardiyovasküler hastalıkları önleyecek şekilde değiştirdiği gözlenmiştir. Zeytin ağacı yaprağı özütünün antioksidan özellik gösterdiği ve bu etkinliğini akut kurşun zehirlenmesinde de gösterebileceği ortaya konmuştur. Zeytin ağacı yaprağı özütünün kan lipit profilini beklenildiği gibi düzeltmediği, ancak antioksidan etkinliği artırdığı belirlenmiştir. Kan lipit değerlerindeki etkilerin çalışmanın kısa süreli gerçekleştirilmesi ile ilgili olabileceği, bulgular değerlendirildiğinde zeytin ağacı yaprağı özütünün ve sızma zeytinyağının antioksidan etkileri nedeni ile antioksidan dengeyi bozan ağır metal zehirlenmelerinde ve kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu olarak kullanılabilecekleri fikrini ortaya çıkarmıştır.

Antioksidan etkinliği gösterilen zeytin ağacı yaprağı özütünün zeytin yetiştiriciliğinde bol miktarda üretilmesi bu ürünün değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Kardiyovasküler sistem üzerine yararlı etkinliği bilinen sızma zeytinyağının ağır metal zehirlenmelerinde de koruyucu özelliklerinin bulunması, ülkemizde tüketimi az olan sızma zeytinyağının daha fazla tüketilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

ÖZET

Ratlarda Akut Kurşun Zehirlenmesinde Sızma Zeytinyağı ve Zeytin Ağacı Yaprakı Özütünün Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Zeytin ağacının (*Olea europaea L*) meyvesi ve yaprağı yararlı etkileri nedeniyle yüzyıllardır birçok medeniyet tarafından kullanılmıştır. Zeytin ağacı yaprağı özütünün temel aktif komponenti olan oleuropein, fenolik bir antioksidandır ve zeytin ağacı yaprağı ve zeytinyağında yüksek miktarda bulunur. Bu çalışma, sızma zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağının kurşun zehirlenmesine karşı antioksidan koruyucu özelliklerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla 150-200 gr ağırlığında 7-8 haftalık, 36 adet erkek Wistar albino rat kullanılmış olup ratlara kurşun, kurşun+özüt ve kurşun+sızma zeytinyağı uygulanmıştır. Çalışmada antioksidan özelliği bilinen oleuropein içeren zeytin ağacı yaprağı özütü ile Akdeniz tarzı beslenmenin temelini oluşturan ve fenolik içeriği yüksek olan sızma zeytinyağının kurşun toksik etkisini azaltıp azaltmadığı değerlendirilmiştir.

Çalışmada oleuropein içeren özüt ve sızma zeytinyağı uygulamalarının antioksidan enzimleri yükselttiği ve özüt uygulamasının ratlarda kan kurşun düzeyinde azalmaya sebep olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Kurşun, Oleuropein, Zeytinyağı

SUMMARY

Investigating the protective effect of the olive oil and olive leaf extract on rats with acute lead toxication

Because of its beneficial effects the fruit and leaf of the olive tree (*Olea europaea L*) has been used by many civilizations for hundreds of years. Olive leaf's basic active fundamental component 'oleuropein' is a phenolic antioxidant and found in high quantities in olive leaf and olive oil. This study was carried out to investigate antioxidant protective properties of the virgin olive oil and olive leaf extract against lead toxicity.

For this purpose, 7 to 8 weeks old 36 male Wistar albino rats weighing 150 gr to 200 gr were used in six equal groups, including control group given physiological saline and groups given either lead, virgin olive oil, olive leaf extract, lead+virgin olive oil or lead+olive leaf extract. Lead was administered in dose of 25 mg/kg intraperitoneally once daily for five days. Virgin olive oil was given orally 5 ml/kg BW, and olive leaf extract was administered in dose of 60 mg/kg BW in the same way.

The findings of this study revealed that the applications of the oleuropein containing extract and olive oil increased the antioxidant enzymes and application of the extract caused decreases in lead concentrations in circulating blood.

Keyword: Antioxidant, Lead, Oleuropein, Olive oil

KAYNAKLAR

- ANONİM, (2007a). Rutgers, The State University of New Jersey. Erişim Adresi: [http://www.esc.rutgers.edu/publications/general/FS1065.htm#124]. Erişim Tarihi: 14.03.2008.
- ANONİM, (2007b). Erişim Adresi: [http://sites.psu.edu/thefeedingscoop/vitamin-e-supplementation/]. Erişim Tarihi: 14.03.2008.
- ANONİM, (2010). Erişim Adresi: [http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/08/20100807-9.htm.]. Erişim Tarihi: 18.03.2010.
- ANONİM, (2011). TARIM İSTATİSTİKLERİ ÖZETİ. (2011) The Summary of Agricultural Statistics Yayın No: 3878 Türkiye İstatistik Kurumu TÜİK.
- ANONİM, (2012). Erişim Adresi: [http://sites.psu.edu/thefeedingscoop/2012/04/11/vitamin-e-supplementation/]. Erişim Tarihi: 14.05.2013.
- ANONİM, (2013a). International Oliv Council. Erişim Adresi: [http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards]. Erişim Tarihi: 28.06.2014.
- ANONİM, (2013b). Erişim Adresi: [https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2013]. Erişim Tarihi: 11.10.2014.
- AHAMED M, VERMA S, KUMAR A, SIDDIQUI MKJ (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of The Total Environment*, **346**: 48–55.
- AKKUŞ I (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: *Mimoza yayınları*, s:1-73.
- AL-AZZAWIE HF VE SAEED ALHAMDANI MS (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, **78**: 1371–1377.
- ALKIN E (2003). Zeytin Meyvesinde Bulunan Hydroxytyrosolün Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. İzmir: *Türkiye 1. Zeytinyağı ve Sofralık Zeytin Sempozyumu*, s:107-115.
- ALTINYAY Ç (2006). *Olea Europaea L.* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- ALIREZAEI M, DEZFOULIAN O, NEAMATI S, RASHIDPOUR M, TANIDEH N, KHERADMAND A (2012). Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. *Journal of physiology and biochemistry*, **68** : 583-592.
- ANDREADOU I, SIGALA F, ILIODROMITIS EK, PAPAETHIMIOU M, SIGALAS C, ALIGIANNIS N, SAVVARI P, GORGOLIS V, PAPALABROS E, KREMASTINOS DTH

- (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **42**: 549–558.
- ANTUNES LMG VE TAKAHASHI CS (1999). Olive Oil Protects Against Chromosomal Aberrations Induced by Doxorubicin in Wistar Rat Bone Marrow Cells. *Genet. Mol. Biol.*, **22**: 225-227.
- ARIF M, KABIR Y, HASSAN F, ZAVED WAISE TM, MAZUMDER EH, RAHMAN S (2008). Increased DNA damage In blood cells of rat treated with lead as assessed by comet assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, **3**: 97-101.
- ARANTES-RODRIGUES R, HENRIQUES A, PIRES MJ, COLAÇO B, CALADO AM, REMA P, COLAÇO A, FERNANDES T, DE LA CRUZ PL, LOPES C, FIDALGO-GONÇALVES L, VILELA S, PEDROSA T, PEIXOTO F, OLIVEIRA PA (2011). High doses of olive leaf extract induce liver changes in mice. *Food Chem Toxicol.*, **49** :1989-1997.
- BANSAL AK VE BILASPURI GS (2011). Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, s: 7.
- BARBARO B, TOIETTA G, MAGGIO R, ARCIELLO M, TAROCCHI M, GALLI A, BALSANO C (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**: 18508-18524.
- BENDINI A, CERRETANI L, VECCHI S, CARRASCO-PANCORBO A, LERCKER G (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *J Agric Food Chem.*, **54**: 4880-4887.
- BERRAHAL AA, NEHDI A, HAJJAJI N, GHARBI N, EL-FAZÂA S (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C R Biol.*, **330**: 581-8.
- BERRAHAL AA, LASRAM M, EL ELJ N, KERKENI A, GHARBI N, EL-FAZÂA S (2011). Effect of age-dependent exposure to lead on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male rats. *Environ Toxicol.*, **26** :68-78.
- BIANCO A VE UCCELLA N (2000). Biophenolic components of olives. Biophenolic components of olives. *Food research international.*, **33**: 475-485.
- BISIGNANO G, TOMAINO A, CASCIO RL, CRISAFI G, UCCELLA N, SAIJA A (1999). On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, **51** : 971–974.
- BOUALLAGUI Z, HAN J, ISODA H, SAYADI S (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, **49** : 179-184.
- BOZDOGAN KONUŞKAN D ve ALTAN A (2008). Zeytin Ve Zeytinyağında Doğal Olarak Bulunan Biyoaktif Bileşikler ve Fizyolojik Etkileri. *GIDA*, **33**: 297-302.

- BUEKERS J, REDEKER ES, SMOLDERS E (2009). Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci Total Environ.*, **407**:3431-3438.
- BULOTTA S, CORRADINO R, CELANO M, D'AGOSTINO M, MAIUOLO J, OLIVERIO M, PROCOPIO A, IANNONE M, ROTIROTI D, RUSSO D (2011). Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry*, **127**: 1609–1614.
- BURM E, SONG I, HA M, KIM YM, LEE KJ, KIM HC, LIM S, KIM SY, LEE CG, KIM SY, CHEONG HK, SAKONG J, KANG HT, SON M, OH GJ, KIM Y, YANG JY, HONG SJ, SEO JH, KIM J, OH S, YU J, CHANG SS, KWON HJ, CHOI YH, CHOI W, KIM S, YU SD (2016). Representative levels of blood lead, mercury, and urinary cadmium in youth: Korean Environmental Health Survey in Children and Adolescents (KorEHS-C), 2012–2014. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **219**: 412-418.
- CARLUCCIO MA, SICULELLA L, ANCORA MA, MASSARO M, SCODITTI E, STORELLI C, VISIOLI F, DISTANTE A, DE CATERINA R (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **23**: 622-629.
- CASTANER O, COVAS MI, KHYMENETS O, NYSSONEN K, KONSTANTINIDOU V, ZUNFT HF, DE LA TORRE R, MUNOZ-AGUAYO D, VILA J, FITO M (2012). Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans. *Am J Clin Nutr.*, **95**: 1238–1244.
- CERT A, MOREDA W, PEREZ-CAMINO MV, (2000). Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils, *J. Chromatogr. A*, **881**: 131–148.
- CHUGH A, RAY A, GUPTA JB (2003). Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Progress in Lipid Research*, **41**: 37–50.
- CHIBA M, SHINOHARA A, MATSUSHITA K, (1996). Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSHPx and catalase in their blood. *Tohoku J Exp Med.*, **178**: 49-62.
- CICERO AFG, NASCETTI S, LÓPEZ-SABATER MC, ELOSUA R, SALONEN JT, NYSSÖNEN K, POULSEN HE, ZUNFT HJF, KIESEWETTER H, DE LA TORRE K, COVAS MI, JARI KAIKKONEN J, MURSU J, KOENBICK C, HANS BÄUMLER H, GADDI AV (EUROLIVE STUDY GROUP) (2008). Changes in LDL Fatty Acid Composition as a Response to Olive Oil Treatment Are Inversely Related to Lipid Oxidative Damage: The EUROLIVE Study. *Journal of the American College of Nutrition*, **27**: 2.
- COVAS MI, NYSSÖNEN K, POULSEN HE, KAIKKONEN J, ZUNFT HJF, KIESEWETTER H, GADDI A, DE LA TORRE R, MURSU J, BÄUMLER H, NASCETTI S, SALONEN JT, FITO

- M, VIRTANEN J, MARRUGAT J (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. *Ann Int Med.*, **145**: 333-341.
- COVAS MI, DE LA TORRE R, FITO M (2015). Virgin olive oil: a key food for cardiovascular risk protection. *British Journal of Nutrition*, **113**: 19–28.
- CZERWIN'SKA M, KISS KA, NARUSZEWICZ M (2012). A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, **131**: 940–947.
- DAWSON B VE TRAPP RG (2001). BASIC AND CLINICAL BIOSTATISTICS, (LANGE Basic Science) 4th Edition New York: Lange Medical Books-McGraw Hill.
- DEIANA M, ROSA A, CORONA G, ATZERI A, INCANI A, VISIOLI F, PAOLA MM, ASSUNTA DM (2007). Protective effect of olive oil minor polar components against oxidative damage in rats treated with ferric-nitilotriacetate. *Food Chem Toxicol.*, **45**: 2434-2440.
- DEIANA M, CORONA G, INCANI A, LORU D, ROSA A, ATZERI A, MELIS MP, DESSÌ MA (2010). Protective effect of simple phenols from extravirgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 3008–3016.
- D'ANGELO S, MANNA C, MIGLIARDI V, MAZZONI O, MORRICA P, CAPASSO G, PONTONI G, GALLETTI P, ZAPPÀ V (2001). Pharmacokinetics and Metabolism of Hydroxytyrosol, a Natural Antioxidant from Olive Oil. *Drug Metab Dispos*, **29**: 1492-1498.
- DOUNIAS G, RACHIOTIS G, HADJICHRISTODOULOU C (2010). Acute lead intoxication in a female battery worker: Diagnosis and management. *J Occup Med Toxicol.*, **5**: 19.
- DOMITROVIĆ R, JAKOVAC H, MARCHESI VV, ŠAIN I, ROMIĆ Z, RAHELIĆ D (2012). Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacological Research*, **65**: 451-464.
- DONALDSON WE, LEEMING TK (1984). Dietary lead: effects on hepatic fatty acid composition in chicks. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **73**: 119-123.
- DRIRA R, CHEN S, SAKAMOTO K (2011). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life Sciences*, **89**: 708-716.
- DUA TK, DEWANJEE S, KHANRA R, JOARDAR S, BARMA S, DAS S, ZIA-UL-HAQ M, DE FEO V (2016). Cytoprotective and Antioxidant Effects of an Edible Herb, *Enhydra fluctuans* Lour. (Asteraceae), against Experimentally Induced Lead Acetate Intoxication. *PLoS One*, **11**.
- EL-SOKKARY GH, ABDEL-RAHMAN GH, KAMEL ES (2005). Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology*, **213**: 25–33.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA, (2006). Sixth Ed., s: 891-893.

- FABIANI R, ROSIGNOLI P, DE BARTOLOMEO A, FUCCELLI R, SERVILI M, MONTEDORO GF, MOROZZI G. (2008) Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells *J Nutr.*, **138**:1411-1416.
- FELDMAN BF, ZINKLY JG, JAIN NV (2000). Schalm's Veterinary Hematology, Fifth Ed., Lippin Cott, Willams And Wilkins ,Canada, s:1210-1218.
- FITÓ M, DE LA TORRE R, FARRÉ-ALBALADEJO M, KHYMENETZ O, MARRUGAT J, COVAS MI (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans. *Ann Ist Super Sanità*, **43**: 375-381.
- GAO M, ZHAO Z, LV P, LI Y, GAO J, ZHANG M, ZHAO B (2015). Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biology*, **6**: 206–217.
- GUTFINGER T (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **58**: 966-968.
- GÜRER H, ÖZGÜNES H, NEAL R, SPITZ RD, ERÇAL N (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology*, **128**: 181-189.
- GONCALVES A, MARGIER M, TAGLIAFERRI C, LEBECQUE P, GEORGÉ S, WITTRANT Y, COXAM V, AMIOT MJ, EMMANUELLE REBOUL E (2016). Pinoresinol of olive oil decreases vitamin D intestinal absorption. *Food Chemistry*, **206**: 234–238.
- GORDON MH, PAIVA-MARTINS F, ALMEIDA M (2001). Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem.*, **49**: 2480-2485.
- HALEAGRAHARA N, JACKIE T, CHAKRAVARTHI S, RAO M, KULUR A (2010). Protective effect of *Etlingera elatior* (torch ginger) extract on lead acetate-induced hepatotoxicity in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 663-671.
- HARPER CR, EDWARDS MC, JACOBSON TA (2006). Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects. *J Nutr.*, **136**: 2844–2848.
- HASHIM Y-YUMI ZH, ROWLAND IR, MCGLYNN H, SERVILI M, SELVAGGINI R, TATICCHI A, ESPOSTO S, MONTEDORO GF, KAISALO L, WAHALA K, GILL IRC (2008). Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells in vitro. *Int. J. Cancer*, **122**: 495–500.
- HASHEM MAE VE SHARKAWY NIE (2009). The effects of low electromagnetic field and lead acetate combination on some hemato-biochemical and immunotoxicological parameters in mice. *Turk J Hematol.*, **26**: 181-189.

- HASHMI MA, KHAN A, HANIF M, FAROOQ U, PERVEEN S (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **29**.
- HE Y, ZOU Q, CHEN H, WENG S, LUO T, ZENG X (2016). Lead Inhibits Human Sperm Functions by Reducing the Levels of Intracellular Calcium, cAMP, and Tyrosine Phosphorylation. *Tohoku J. Exp. Med.*, **238**: 295-303.
- HIZEL S ve ŞANLI C (2006). Çocuklarda beslenme ve kurşun etkileşimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **49**: 333-338.
- HUANG SL, HUANG PL, ZHANG D, LEE JW, BAO J, SUN Y, CHANG YT, ZHANG J, HUANG PL (2007). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**: 872–878.
- HSU PC, LIU MY, HSU CC, CHEN LY, GUO YL (1997). Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology*, **122**:133-143.
- IAVICOLI I, CARELLI G, STANEK EJ, CASTELLINO N, CALABRESE EJ (2006). Below background levels of blood lead impact cytokine levels in male and female mice. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **210**: 94-99.
- IMPELLIZZERI D, ESPOSITO E, MAZZON E, PATERNITI I, DI PAOLA R, BRAMANTI P, MORITTU VM, PROCOPIO A, PERRI E, BRITTI D, CUZZOCREA S (2012). The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol.*, **83**: 1413-1426.
- JASSIM HM VE HASSAN AA (2011). Changes in some blood parameters in lactating female rats and their pups exposed to lead: Effects of vitamins C and E. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, **25**: 1-7.
- JEMAI H, BOUAZIZ M, FKI I, EL FEKI A, SAYADI S (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.*, **176**: 88-98.
- JEMAI H, EL FEKI A, SAYADI S (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem.*, **57**: 8798-8804
- JIUM YS VE HSIEN LT (1994). Lipid Peroxidation in workers exposed to lead. *Arch Environ Health.*, **49**: 256-259.
- KALOGEROPOULOS N (2010). Recovery and Distribution of Macro- and Selected ssMicroconstituents after Pan- frying of Vegetables in Virgin Olive Oil *Olives Olive Oil In Health Disease Prevention*. First Ed., Section II chapter 80.

- KASPERCZYK S, KASPERCZYK A, OSTALOWSKA A (2004) Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res.*, **102**: 61-72.
- KELEBEK H, KESEN S, SABBAĞ Ç, SELLI S (2012). Gemlik Zeytin Çeşidinden Elde Edilen Natürel Zeytinyağında Fenol Bileşiklerinin ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi. *GIDA*, **37**: 133-140.
- KIM Y, CHOI Y, PARK PT (2010). Hepatoprotective effect of oleuropein in mice: Mechanisms uncovered by gene expression profiling. *Biotechnology Journal.*, **5**: 950–960.
- KIM HC, JANG TW, CHAE HJ, CHOI WJ, HA MN, YE BJ, KIM BG, JEON MJ, KIM SY, HONG YS (2016). Evaluation and management of lead exposure. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, **27**:30
- KIRITSAKIS AK AND MIN DB (1989). Flavor Chemistry of Olive Oil- Flavor Chemistry of Lipids Foods, American Oil Chemists' Society Press, Illionis, s: 462.
- KONTOGIANNI VG ve GEROTHANASSIS IP (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, **26**: 186-189.
- KÖSE M (1997). Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda Alyuvar İçi Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Düzeyleri, Biyokimya Anabilim Dalı.
- KUBO A, LUNDE CS, KUBO I (1995). Antimicrobial Activity of the Olive Oil Flavor Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **43**:1629–1633.
- LEE HO, LE BY (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, **101**: 3751–3754.
- LEPORE, SM, MORITTU VM, CELANO M, TRIMBOLI F, OLIVERIO M, PROCOPIO A, DI LORETO C, DAMANTE G, BRITTI D, BULOTTA S, RUSSO D (2015). Oral Administration of Oleuropein and Its Semisynthetic Peracetylated Derivative Prevents Hepatic Steatosis, Hyperinsulinemia, and Weight Gain in Mice Fed with High Fat Cafeteria Diet. *International Journal of Endocrinology*. s: 9.
- LUCK, H., (1965) Catalase Method in Analysis Academic Press Inc.N.Y.and London, s: 855-884.
- MACKENBACH J (2007). The Mediterranean Diet Story Illustrates that “why” Questions are as Important as “how” Questions in Disease explanation. *Journal of Clinical Epidemiology*, **60**: 105–109.
- MANNA C, GALLETTI P, CUCCIOLLA V, MONTEDORO G, ZAPPIA V (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem.*, **10**: 159-165.

- MANNA C, D'ANGELO S, MIGLIARDI V, LOFFREDI E, MAZZONI O, MORRICA P, GALLETTI P, ZAPPIA V (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J Agric Food Chem.*, **50**: 6521-6526.
- MANGAS-CRUZ MA, FERNÁNDEZ-MOYANO A, ALBI T, GUINDA A, RELIMPIO F, LANZÓN A, PEREIRA JL, SERRERA JL, MONTILLA C, ASTORGA R, GARCÍA-LUNA PP (2001). Effects of minor constituents (non-glyceride compounds) of virgin olive oil on plasma lipid concentrations in male Wistar rats. *Clin Nutr.*, **20**: 211-215.
- MARCHETTI C, CLERICUZIO M, BORGHESI B, CORNARA L, RIBULLA S, GOSETTI F, MARENGO E, BURLANDO B (2015). Oleuropein-Enriched Olive Leaf Extract Affects Calcium Dynamics and Impairs Viability of Malignant Mesothelioma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. s:9.
- MORENO JJ (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.*, **35**: 1073-1081.
- MUGAHI MN, HEIDARI Z, SAGHEB HM, BARBARESTANI M (2003). Effects of Chronic Lead Acetate Intoxication on Blood Indices of Male Adult Rat. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11**: 147-151.
- MURKOVIC M, LECHNER S, PIETZKA A, BRATACOS M, KATZOGIANNOS E (2004). Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **61**: 155-160.
- NAKBI A, TAYEB W, GRISSA A, ISSAOUI M, DABBOU S, CHARGUI I, ELLOUZ M, MILED A, HAMMAMI M (2010a). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition & Metabolism*, **7**: 80.
- NAKBI A, TAYEB W, DABBOU S, ISSAOUI M, GRISSA AK, ATTIA N, HAMMAMI M (2010b). Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D-exposed rats. *Lipids in Health and Disease*, **9**: 89.
- OI-KANO Y, KAWADA T, WATANABE T, KOYAMA F, WATANABE K, SENBONGI R, IWAI K (2008). Oleuropein, a Phenolic Compound in Extra Virgin Olive Oil, Increases Uncoupling Protein 1 Content in Brown Adipose Tissue and Enhances Noradrenaline and Adrenaline Secretions in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **54**: 363-370.
- OLIVERAS-LÓPEZ MJ, BERNÁ G, LÓPEZ-GARCÍA DE LA SERRANA H, LÓPEZ MC, EVERARDO M, CARNEIRO EM, MARTÍN F (2008). An Extra-Virgin Olive Oil Rich in Polyphenolic Compounds Has Antioxidant Effects in Of1 Mice. *The Journal of Nutrition* *Nutrition and Disease*, **138**: 1074-1078.

- OMAR SH (2010a). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **18**: 111–121.
- OMAR SH (2010b). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm.*, **78**: 133-154.
- OWEN RW, GIACOSA A, HULL WE, HAUBNER R, WÜRTELE G, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H (2000a). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.*, **1**: 107-112.
- OWEN RW, MIER W, GIACOSA A, HULL WE, SPIEGELHALDER B, BARTSCH H (2000b). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoroids, lignans and squalene. *Food. and Chem. Toxicol.*, **38**: 647– 659.
- OTHMAN AI VE EL MISSIRY MA (1998). Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol.*, **12**: 345–349.
- ÖZKAYA MT, TUNALIOĞLU R, EKEN Ş, ULAŞ M, TAN M, DANACI A, INAN N, TIBET Ü (2010). Türkiye zeytinciliğinin sorunları ve çözüm önerileri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi.
- ÖZTÜRK F, YALÇIN M, DIRAMAN H (2009). Türkiye zeytinyağı ekonomisine genel bir bakış. *Gıda Teknolojileri Elektronik dergisi*, **4**: 35-51.
- PAIVA-MARTINS F, FERNANDES J, ROCHA S, NASCIMENTO H, VITORINO R, AMADO F, BORGES F, BELO L, SILVA AS (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**: 609-616.
- PANDE M, MEHTA A, PANT BP, FLORA SJ (2001). Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*, **9**: 173-184.
- PATIL AJ, BHAGWAT VR, PATIL JA, DONGRE NN, AMBEKAR JG, DAS KK (2007). Biochemical aspects of lead exposure and toxicity in spray painters of Western Maharashtra (India). *JEHR.*, **6**: 2.
- PATRICK LYN, (2006a). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev.*, **11**.
- PATRICK LYN, (2006b). Lead toxicity part I: Exposure, Evaluation, and Treatment. *Altern Med Rev.*, **11**.
- PEDERSEN A, BAUMSTARK MW, MARCKMANN P, GYLLING H, SANDSTRÖM B (2000). An olive oil-rich diet results in higher concentrations of LDL cholesterol and a higher number of LDL subfraction particles than rapeseed oil and sunflower oil diets. *J. Lipid Res.*, **41**: 1901–1911.

- PELLEGRINI N, VISIOLI F, BURATTI S, BRIGHENTI F (2001). Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 2532–2538.
- PEÑALVO GC, ROBLEDO VR, CARNERERO CALLADO CS, SANTANDER-ORTEGA MJ, L. CASTRO-VÁZQUEZ L, LOZANO MV, ARROYO-JIMÉNEZ MM (2016). Improving green enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants. *Food Chemistry*, **197**: 509–515.
- PISOSCHI AM ve POP A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**: 55-74.
- PITOZZI V, JACOMELLI M, CATELAN D, SERVILI M, TATICCHI A, BIGGERI A, DOLARA P, GIOVANNELLI L (2012). Long-Term Dietary Extra-Virgin Olive Oil Rich in Polyphenols Reverses Age-Related Dysfunctions in Motor Coordination and Contextual Memory in Mice: Role of Oxidative Stress. *Rejuvenation Res.*, **15**: 6.
- PRIORA R, SUMMA D, FROSALI S, MARGARITIS A, DI GIUSEPPE D, LAPUCCI C, IERI F, PULCINELLI FM, ROMANI A, FRANCONI F, DI SIMPLICIO P (2008). Administration of Minor Polar Compound-Enriched Extra Virgin Olive Oil Decreases Platelet Aggregation and the Plasma Concentration of Reduced Homocysteine in Rats. *J. Nutr.*, **138**: 36–41.
- RAHMAN K (2003). Garlic and aging: New insights into an old remedy. *Ageing Res Rev.*, **2**: 39-56.
- RAVIBABU K, BARMAN T, RAJMOHAN, HR (2015). Serum neuron-specific enolase, biogenic amino-acids and neurobehavioral function in lead-exposed workers from lead-acid battery manufacturing process. *Int. J. Occup. Environ. Med.*, **6**: 50-57.
- RENDÓN-RAMIREZ A, CERBÓN-SOLÓRZANO J, MALDONADO-VEGA M, QUINTANAR-ESCORZA MA, CALDERÓN-SALINAS JV (2007). Vitamin-E reduces the oxidative damage on δ -aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in Vitro.*, **21**: 1121–1126.
- RÓDENAS S, RODRÍGUEZ-GIL S, MERINERO MC, SÁNCHEZ-MUNIZ FJ (2005). Dietary exchange of an olive oil and sunflower oil blend for extra virgin olive oil decreases the estimate cardiovascular risk and LDL and apolipoprotein AII concentrations in postmenopausal women. *J Am Coll Nutr.*, **24**: 361-369.
- ROCHA VZ AND LIBBY P (2009) Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.*, **6**: 399-409.
- ROLEIRA MFF, TAVARES-DA-SILVA EJ, VARELA CL, COSTA SC, SILVA T, GARRIDO J, BORGES F (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, **183**: 235–258.

- RUBIÓ L, MACIÀ A, VALLS RM, PEDRET A, PAZ-ROMERO M, SOLÀ R, MOTILVA MJ (2012). A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chemistry*, **134**: 1132-1136.
- SAJITHA GR, JOSE R, ANDREWS A, AJANTHA KG, AUGUSTINE P, AUGUSTI KT (2010). Garlic Oil and Vitamin E Prevent the Adverse Effects of Lead Acetate and Ethanol Separately as well as in Combination in the Drinking Water of Rats. *Indian J Clin Biochem.*, **25**: 280-288.
- SARBISHEGI M, MEHRAEIN F, SOLEIMANI M (2014). Antioxidant Role of Oleuropein on Midbrain and Dopaminergic Neurons of Substantia Nigra in Aged Rats. *Iranian Biomedical Journal*, **18**: 16-22.
- SCHALM OW, JAIN NC, CARROLL FJ (1975). *Veterinary Hematology*. Third Ed., Lea and Febiger, Philadelphia.
- SERAFINI M ve DEL RIO D (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Report.*, **9**: 145-152.
- SERRA A, RUBIÓ L, BORRÀS X, MACIÀ A, ROMERO MP, MOTILVA MJ (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular Nutrition & Food Research.*, **56**: 486–496.
- SITI HN, KAMISAH Y, KAMSIAH J (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, **71**: 40–56.
- SOMOVA LI, SHODE FO, RAMNANAN P, NADAR A (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol.*, **84**: 299-305.
- STAGOS D, AMOUTZIAS GD, MATAKOS A, SPYROU A, TSATSAKIS AM, KOURETAS D (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food Chem Toxicol.*, **50**: 2155-2170.
- SUGAWARA E, NAKAMURA K, MIYAKE T, FUKUMURA A, SEKI Y (1991). Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br J Ind Med.*, **48**: 239-242.
- SUN, Y., OBERLEY, L.W., LI Y. (1988). A simple for clinical assay of superoxide dismutase *Clin.Chem.*, **34**: 497-500.
- TAGLIAFERRI C, DAVICCO MJ, LEBECQUE P, GEORGE' S, AMIOT MJ, MERCIER S, DHAUSSY A, HUERTAS A, WALRAND S, WITTRANT Y, COXAM V (2014). Olive Oil and Vitamin D Synergistically Prevent Bone Loss in Mice. *Plos One*, **9**.

- TANILGAN K, ÖZCAN MM, ÜNVER A (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas y Aceites*, **58**: 2.
- TIETZ WN (1987) Measurement of plasma hemoglobin. *Fundamental of Clinical Chemistry*, Saunders Company, s: 805-806.
- TRICHOPOULOU A, KATSOUYANNI K, STUVER S, TZALA L, GNARDELLIS C, RIMM E, TRICHOPOULOS D (1995). Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst.*, **87**:110-116.
- TÜRKOĞLU H, KANIK Z, YAKUT A, GÜNERİ A, AKIN M (2012). Nizip ve Çevresinde Satışa Sunulan Zeytinyağı Örneklerinin Bazı Özellikleri. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, **16**: 1-8.
- VIRRUSO C, ACCARDI G, COLONNA-ROMANO G, CANDORE G, VASTO S, CARUSO C. (2014). Nutraceutical Properties of Extra-Virgin Olive Oil: A Natural Remedy for Age-Related Disease Rejuvenation Res., **17**: 2.
- VISIOLI F ve GALLI C (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation Life Sciences **55**: 1965–1971.
- VISIOLI F, GALLI C, BORNET F, MATTEI A, PATELLI R, GALLI G, CARUSO D (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett.* **468**: 159-160.
- VIOLA J AND SOEHNLEIN O (2015). Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Seminars in Immunology*, **27**: 184–193.
- VISIOLI F, GALLI C, GRANDE S, COLONNELLI K, PATELLI C, GALLI G, CARUSO D. (2003). Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr.*, **33**: 2612-2615.
- VIVANCOS M. VE MORENO JJ (2005). Beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264. 7 macrophages. *Free Radic Biol Med.*, **39**: 91-97.
- WANG W, LI CQ, HU XL (2009). Developmental expression of β -glucosidase in olive leaves. *Biologia Plantarum*, **53**: 138-140.
- WARLETA F, QUESADA CS, CAMPOS M, ALLOUCHE Y, BELTRÁN G, GAFORIO JJ (2011). Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells. *Nutrients*, **3**: 839-857.
- WATERMAN E AND LOCKWOOD B (2007) Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev.*, **12**: 331-42.
- YILMAZ B. (2000) Fizyoloji, İkinci basım, Feryal Matbaacılık s: 65-82.
- YOSHOIKO T, KAWADA K, SHIMADA T (1979). Lipit peroxidation in maternal cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am.J. Obstet.Gynecol.*, **135**: 372-376.

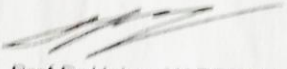
Ek-1 Etik Kurul Raporu

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ	12/06/2008
TOPLANTI NO	12008-21
DOSYA NO	12008-60
KARAR NO	12008-21-104

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Çiğdem Altınsoy'un araştırma yürütücüsü olduğu, Vet.Hek.Can Özcan'ın ortak çalışmaları olan "Ratlarda Akut Kurşun Zehirlenmesinde Sızma Zeytinyağı ve Zeytin Ağacı Yaprakı Ekstratının Koruyucu Etkisinin Araştırılması" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIĞIDIR
25/06/2008


Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Can
Soyadı : Özcan
Doğum Yeri ve Tarihi : 14.03.1980 Ankara
Uyruğu : T.C
Medeni Durumu : Bekar
Askerlik Durumu : Yapıldı
İletişim adresi : Edirne İl Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğü
Telefonu : +905532603802

II-Eğitimi

Lisans : Karabük Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği
2011 –
Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2004
Lise : Demetevler Mimar Sinan Lisesi –Ankara 1996
Ortaokul : Haymana Ortaokulu 1993 Ankara
İlköğretim : Burunsuz Köyü İlköğretim Okulu 1990 –
Ankara
Yabancı dil : İngilizce

III-Ünvanları

Veteriner Hekim

IV-Mesleki Deneyimi

Edirne İl Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğü Lalapaşa İlçe Müdürlüğü 2017

Edirne İl Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şube Müd.
2012--2017

Ankara İli Haymana İlçe Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğü 2005-2012

VI-Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları : Kök, S., Vapur, G., Özcan, C. (2015). Sığır Etlerinde Mozaikleşme ile İlişkili Leptin (LEP) Geni Polimorfizmleri. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi. 2(4): 297-302

Poster : Türkiye Fizyolojik Bilimler Derneği 36. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2010-Ratlarda akut kurşun zehirlenmesinde sızma zeytinyağı ve zeytin ağacı yaprağı ekstratının koruyucu etkisinin araştırılması Sözlü sunum

VI- Bilimsel Etkinlikler

Seminerler : Öğrenme ve Bellek 2007,

Adrenomedullin 2008