

DERMAL FİBROBLAST HÜCRELERİNDE OLEUROPEİNİN ANTİOKSİDAN ÖZELLİĞİNİN VE YAŞLANMA ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

The Investigation of the Antioxidant Characterization and the Effects on Aging of Oleuropein on the Dermal Fibroblast Cells

Günnur DEMİRCAN¹ (0000-0001-7355-9065), Ümmügülüm GÜZELSOY² (0000-0002-8796-0287)

ÖZET

Amaç: Yapılan çalışmada hidrojen peroksit ile oksidatif stres oluşturulmuş dermal fibroblast hücrelerine farklı dozlarda oleuropein uygulanmış ve oleuropeinin oksidatif strese ve yaşlanma mekanizmasına karşı etkileri incelenmiştir.

Gereç ve yöntem: Oleuropeinin dermal fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkisi MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analiziyle belirlenmiştir. Oksidatif stres oluşturulmuş dermal fibroblast hücrelerinde oleuropeinin total antioksidan kapasite üzerine etkisi total antioksidan durumu inceleme kiti ve total oksidan kapasite üzerine etkisi, total oksidan durumu inceleme kiti ile belirlenmiştir. Senesensin (yaşlanmanın) test edilmesinde standart protokollerde yer alan SA-β-gal (senescence associated β-galaktosidase) aktivitesi hücrelere verilen X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) substratının parçalanması yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Oleuropeinin toksik doz düzeyi 750 μM olarak saptanmıştır. BJ Fibroblast hücrelerinde 24 saat süre ile H₂O₂ ile inkübasyonundan kaynaklanan total oksidan durumunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlemlenmiştir (p>0,05). Oleuropein ile muamele edilen BJ Fibroblast hücre gruplarında 24 saat süre ile H₂O₂ ile muamele edilen BJ Fibroblast hücre gruplarına göre total antioksidan durumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p<0,05). H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarında yaşlanma etkilerinin daha az ortaya çıktığı SA-β-gal boyama ile tespit edilmiştir.

Sonuç: Oleuropeinin fibroblast hücrelerinde antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı ve buna bağlı olarak oksidatif stres koşullarında hücrelerde meydana gelen yaşlanma mekanizmalarını azalttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Oleuropein; Yaşlanma; Oksidatif stres; Fibroblast*

ABSTRACT

Aim: In the study, oleuropein was administered to dermal fibroblast cells oxidatively stressed with hydrogen peroxide at different doses and the effects of oleuropein on oxidative stress and aging mechanism were investigated.

Material Method: The toxic effect of oleuropein on dermal fibroblast cells was determined by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analysis. The effect of oleuropein on total antioxidant capacity in oxidative stressed dermal fibroblast cells was evaluated with total antioxidant status determination kit and the effect of oleuropein on total oxidant capacity in oxidative stressed dermal fibroblast cells was evaluated with total oxidant status determination kit. SA-β-gal (senescence associated β-galactosidase) activity, which is included in standard protocols when senescence is tested, was measured by the method of disruption of the X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) substrate given to the cells.

Results: The toxic dose level of oleuropein was determined as 750 μM. A statistically insignificant reduction in the total oxidant status from incubation with H₂O₂ for 24 hours was observed in BJ Fibroblast cell line (p>0,05). A statistically significant increase in the total antioxidant status was observed in oleuropein treated BJ fibroblast cell groups compared to BJ Fibroblast cell groups treated with H₂O₂ for 24 hours (p<0,05). After oxidative stress formation with H₂O₂, the aging effects in the oleuropein-treated cell groups were less marked by SA-β-gal staining.

Conclusion: It has been observed that oleuropein increases the activity of antioxidant enzymes in fibroblast cells and consequently reduces aging mechanisms in cells under oxidative stress conditions.

Key Words: *Oleuropein; Aging; Oxidative stress; Fibroblast*

¹İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

²İstanbul Bilim Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Günnur DEMİRCAN, Dr. Öğr. Üyesi
Ümmügülüm GÜZELSOY, Moleküler Biyolog

İletişim:

Dr. Öğr. Üyesi Günnur DEMİRCAN,
İstanbul Bilim Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Büyükdere cad. No:120 34394
Esentepe Şişli İstanbul
Tel: 05336529895
e-mail:
gunnurbio@yahoo.com

Geliş tarihi/Received: 05.09.2018
Kabul tarihi/Accepted:05.03.2019
DOI: 10.16919/bozoktip.457536

Bozok Tıp Derg 2019;9(2):16-24
Bozok Med J 2019;9(2):16-24

GİRİŞ

Hücre ve dokularda hasar oluşumu yaşam boyunca gerçekleşen ve devam eden bir süreçtir. Genetik programlar yardımıyla düzenlenen ve aynı zamanda çevresel faktörlerin de etkisiyle ortaya çıkan yapısal, işlevsel ve psikolojik değişimleri kapsayan bu biyolojik süreç yaşlanma mekanizması olarak adlandırılmaktadır (1).

Hastalıkların oluşumu ve yaşlanma mekanizması ile ilgili olarak geliştirilen teorilerden biri de oksidatif strestir. Oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallerden en çok gözlemlenmiş türevleri ise süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalidir.

Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin, hücre yapısının nükleik asitlerin, lipidlerin ve proteinlerin uğradığı hasarda önemli bir payı vardır. Sağlıklı kişilerde bu metabolitlerin zararlı etkileri antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir (2-3). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres hasarlarına karşıdır. Antioksidan mekanizmalar, pratikte süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerin aktivitesinin ölçümüyle değerlendirilebilmektedir. Bu antioksidanların hem aktiviteleri hem de hücreler arası seviyeleri arasında bir denge vardır ki organizmaların sağlığı ve canlılığı için gereklidirler (4).

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere de ikiye ayrılır (5). Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilebilen bileşenlerdir. Çoğunlukla meyveler, sebzeler, zeytin, zeytinyağı, aromatik bitkiler doğal antioksidan kaynağı olarak dikkat çekmektedir (6).

Organizmanın doğal antioksidan üretimi yaş ilerledikçe azalır. Bu açığın kapatılabilmesi için bitkisel antioksidanların iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir (7).

Bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunan ve güçlü antioksidan özellikleri olan fenolik fitokimyasallar, oksidatif zararlara karşı vücut savunmasına da katkıda bulunmaktadır (8-9).

Zeytin bitkisinin çalışmalar sonucunda ortaya koyulan faydaları, nutrisyonel açıdan önemli (kısmen doymamış yağ asitleri) ve polifenoller gibi küçük bileşenlerde yer almaktadır. Zeytin bitkisinde yer alan fenolik maddeler; fenolik asitler, fenolik alkoller, antosiyaninler, flavonoller, flavonlar ve sekoiridoitler olarak sınıflandırmaktadır. Tablo 5'te zeytin fenoliklerinin grupları ve bu gruplarda yer alan fenolikler gösterilmiştir (10).

Zeytinde en çok bulunan sekoiridoitler oleuropein, demetiloleuropein, ligstrosit ve nüzhenittir (11).

Oleuropein ve hidroksitirozol; sentetik radikalleri, peroksi radikallerini, süperoksit radikallerini ve hidroklorik asiti yakalama ve bunların etkisini bozma yeteneğine sahiptir. Oleuropein ve alt bileşenlerinin bu özelliği, vücutta çeşitli hastalıklara yol açan serbest radikalleri de yakalamakta ve vücudun savunma sistemine katkı sağlamaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu oleuropeinin; antioksidan, antiinflamatuvar, anti-aterojenik, anti-kanser, antimikrobiyal, anti-aging, antiviral, hepatoprotektif ve nöroprotektif gibi özelliklerinin bulunduğu bildirilmiştir (12-13).

Olea europaea yaprak özütünün içerisinde yüksek miktarda etkin olarak bulunan fenolik bileşik oleuropeinin etki mekanizmalarının incelendiği birçok hücre hattı bulunmaktadır. Ancak dermal hücreler üzerine çalışmalar yetersiz kalmıştır.

Bu çalışmada oleuropeinin oksidatif strese uğratılarak yaşlanan BJ dermal fibroblast hücreleri üzerine antioksidan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla oksidatif strese uğratılan BJ fibroblast hücreleri üzerine farklı dozlarda oleuropein verilerek, bu bileşenin antioksidan etki göstermesi sonucu yaşlanma mekanizmasına karşı engelleyici veya terapötik özelliği incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışmada BJ fibroblast (ATCC® CRL-2522™) hücre soyu kullanılmıştır. Hücreler, içerisinde inaktive edilmiş %10 FBS (Fetal bovine serum), penisilin-streptomisin x100 içeren MEM medyumunda kültüre edilmiştir.

Oleuropein (Cayman Chemical Company; LOT: 0510438-2) 1 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülerek stok hazırlanmıştır.

MTT Analizi:

Hücre canlılık testi MTT analizi ile yapılmıştır (14-15). MTT solusyonu PBS (Phosphate buffered saline) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Hücreler toplam medyum hacmi 200 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalara ekilmiştir. Hücreler ekimden sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda medyum kuyucuklardan çekilmiş ve her hücre farklı konsantrasyonlarda oleuropein ile inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda hücrelerden oleuropein dozları uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 200 µl MTT solusyonu eklenmiş ve 4 saat süre ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat inkübasyon sonunda MTT solusyonu kuyucuklarda çekilmiş ve kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 200 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiştir. Hemen ardından 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okutulmuştur. Okunan absorbans değerine göre sitotoksikite düzeyi belirlenmiştir. Sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$1 - (\text{test kuyucuğunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100$

Kontrolde göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir.

Biyokimyasal Parametreler:

Oksidatif hasarı sağlamak için hücreler 24 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiştir.

Total oksidan durumu, hücre lizatlarından total oksidan durum tespit kiti (TOS) kullanılarak ölçülmüştür. Analiz, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edildi (µmol H₂O₂ Equiv./l). Hücrelerdeki oksidan seviyeleri 530 nm'de ölçülen absorbans değerlerindeki değişim ile hesaplanmıştır.

Total antioksidan durumu, hücre lizatlarından total antioksidan durum tespit kiti (TAS) kullanılarak ölçülmüştür. Analiz, stabil bir antioksidan standart solüsyon, Trolox Equivalent, bir E vitamini analogu ile

kalibre edilmiştir. Hücrelerdeki antioksidan seviyeleri 660 nm'de ölçülen absorbans değerlerindeki değişim ile hesaplanmıştır.

SA-β-Galaktozidaz Boyama

Senesensin (yaşlanmanın) test edilmesinde standart protokollerde yer alan SA-β-gal (senescence associated β-galaktosidase) aktivitesi hücrelere verilen X-gal substratının parçalanması yöntemi ile ölçülmüştür. Bu boyama yöntemi ile yaşlanan ve proliferasyona devam eden hücreler belirlenmiştir.

MTT, TAS ve TOS değerlendirmelerine ait veriler istatistiksel olarak Graph Pad Prism programı ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

MTT analizi sonucu değerlendirme

BJ Fibroblast hücreleri üzerindeki Oleuropein'in sitotoksitesisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre %50 absorbans azalması ile belirlenen toksik doz düzeyi 24 saatte ölçülen analizlerde 750 µM olarak saptanmıştır (Şekil 1).

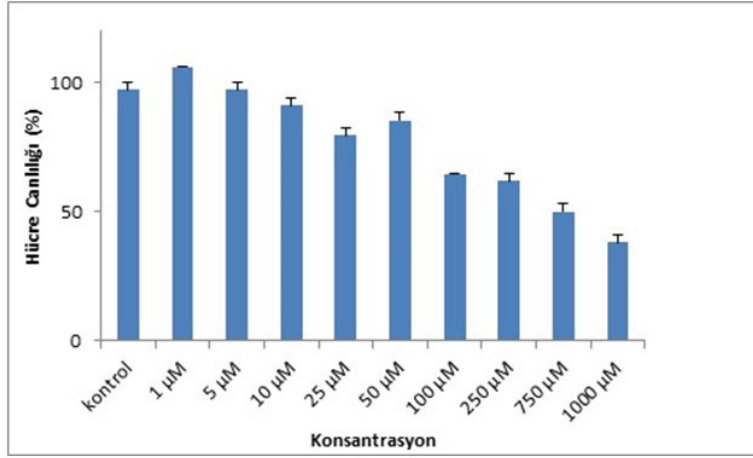
Total Oksidan Durumu

24 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş BJ Fibroblast hücrelerinin Oleuropein ile muamelesinden sonra elde edilen hücre lizatlarında total oksidan durumu değerlendirilmiştir (Şekil 2).

H₂O₂ ile inkübe edilmiş BJ Fibroblast hücre grubunda total oksidan durumu kontrol hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden olmaktadır (p>0,05). 250 µM, 500 µM, 750 µM ve 1000 µM Oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarında daha önceden 24 saat süre ile H₂O₂ ile inkübasyonundan kaynaklanan total oksidan durumunda bir artış gözlemlenmiştir. Ancak Oleuropein muamelesi hücrelerde total oksidan artışında istatistiksel olmayan bir azalmaya neden olmuştur (p>0,05).

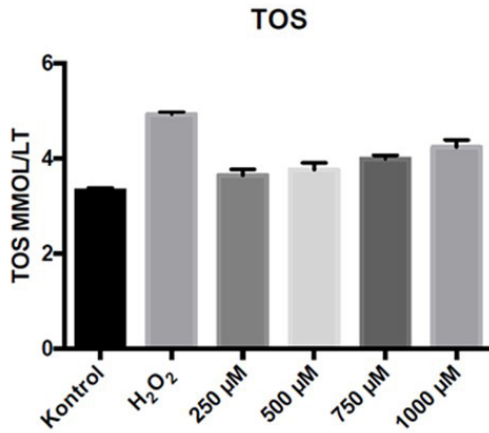
Total Antioksidan Durumu

24 saat H₂O₂ ile inkübe edilmiş BJ Fibroblast hücrelerinin Oleuropein ile muamelesinden sonra elde edilen hücre lizatlarında total antioksidan durumu değerlendirilmiştir (Şekil 3).



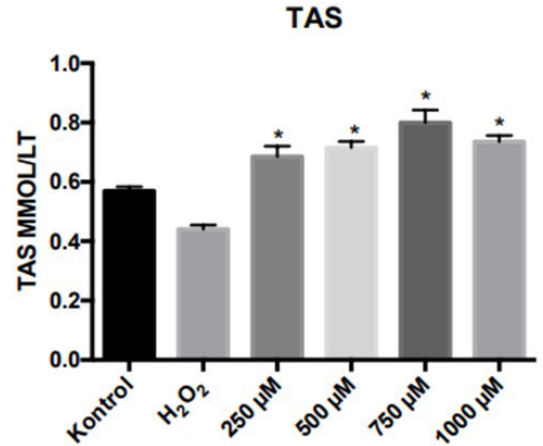
Şekil 1: Oleuropeinin farklı dozlarındaki absorban değerlerindeki değişiminin MTT analizi ile gösterilmesi

ŞEKİL 2: Total Oksidan Durumu



Şekil 2: H₂O₂ ile inkibe edilmiş BJ Fibroblast hücre grubunda oleuropeinin farklı dozları ile muamele edilen örneklerde total oksidan durumu

ŞEKİL 3: Total Antioksidan Durumu



Şekil 3: H₂O₂ ile inkibe edilmiş BJ Fibroblast hücre gruplarında oleuropeinin farklı dozlarıyla muamele edilen örneklerde total antioksidan durumu (*: Oleuropein ile muamele edilen hücrelerin H₂O₂ ile muamele edilen hücelere göre anlamlı artışı p<0,05)

H₂O₂ ile inkübe edilmiş BJ Fibroblast hücre grubunda total antioksidan durumu kontrol hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalışa neden olmaktadır ($p>0,05$). 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M ve 1000 μ M Oleuropein ile muamele edilen BJ Fibroblast hücre gruplarında daha önceden 24 saat süre ile H₂O₂ ile muamele edilen BJ Fibroblast hücre gruplarına göre total antioksidan durumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

SA- β -Galaktozidaz Boyama

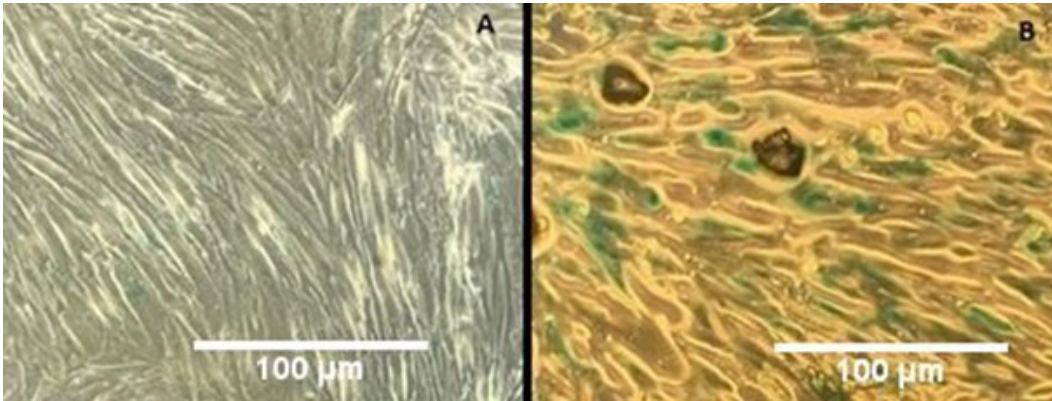
Senesensin bilinen biyokimyasal karakteristiği, SA- β -gal (senescence associated β -galactosidase) yani senesense bağlı olarak ortaya çıkan β -galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artıştır.

Senesensin test edilmesinde standart protokollerde yer alan SA- β -gal aktivitesi BJ hücrelerinin 24 saat H₂O₂ ile inkübasyonunu takiben 24 saat süre ile oleuropeinle muamelesi sonunda değerlendirilmiştir.

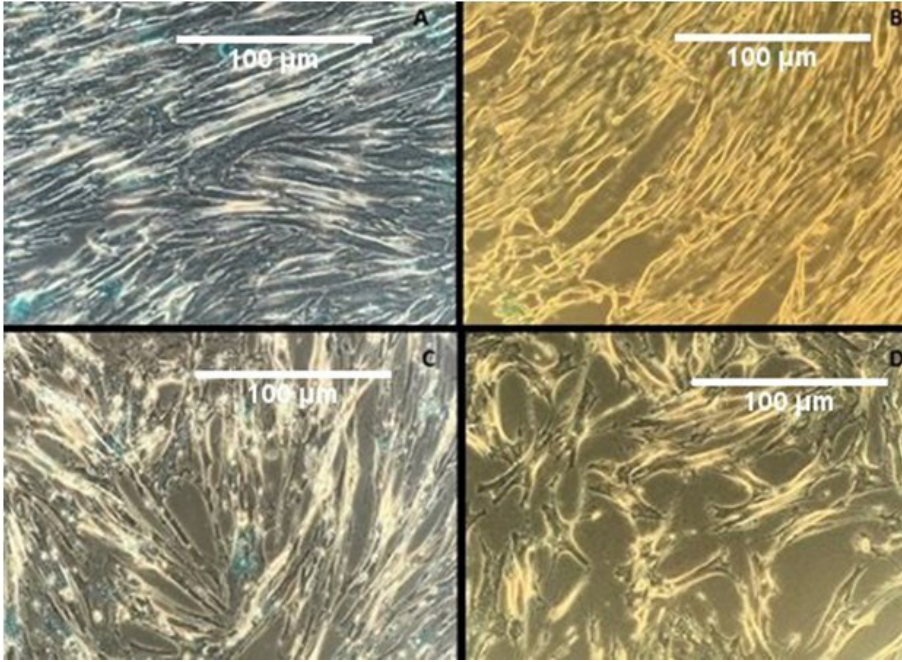
24 saat H₂O₂ ile inkübasyonunu takiben hücreler öncelikle %2'lik paraformaldehit ile fikse edilmiş ve

daha sonra verilen X-gal substratının parçalanması yöntemi kontrol hücrelerinde, herhangi bir boyama tespit edilmemiştir, H₂O₂ ile inkübasyona bırakılan ve oleuropein ile muamele edilmeyen hücre grubunda Resim 1'de görüldüğü üzere senesensin oldukça fazla gözlemlendiği ve hücre ölümünün başladığı, hücrelerin morfolojik olarak senesensin karakteristiğini kaybedip daha çok büzüşmeye başlamasından aynı zamanda ölüme bağlı hücrelerin tutundukları yerden kalkmalarından anlaşılmaktadır (Resim 1).

250 μ M, 500 μ M, 750 μ M ve 1000 μ M konsantrasyonlarda hücrelerdeki boyamanın pozitif olduğu Resim 2'de görülmektedir. H₂O₂ ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarında yaşlanma etkileri sadece H₂O₂ ile muamele edilen gruba göreceli olarak daha az ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda oleuropein doz artışına bağımlı olarak göreceli olarak mavi boyanan hücre sayısındaki artış tespit edilmiştir. Bu da oleuropeinin doza bağlı olarak hücrelerde toksik etkiye bağlı yaşlanmaya yol açtığını göstermektedir (Resim 2).



Resim 1: A: H₂O₂ ve Oleuropein ile inkübasyona bırakılmamış kontrol grubu hücrelerinde β -galaktozidaz boyama sonuçları (20X). B: Sadece 24 saat süre ile H₂O₂ inkübasyonuna bırakılmış BJ Fibroblast hücrelerinde β -galaktozidaz boyama sonuçları (20X).



Resim 2: A: 24 saat süre ile H₂O₂ inkübasyondan sonra 250 μM Oleuropein ile inkübe edilen BJ Fibroblast hücrelerinde β-galaktozidaz boyama sonuçları .(20X) . B: 24 saat süre ile H₂O₂ inkübasyondan sonra 500 μM Oleuropein ile inkübe edilen BJ Fibroblast hücrelerinde β-galaktozidaz boyama sonuçları (20X). C: 24 saat süre ile H₂O₂ inkübasyondan sonra 750 μM Oleuropein ile inkübe edilen BJ Fibroblast hücrelerinde β-galaktozidaz boyama sonuçları .(20X). D: 24 saat süre ile H₂O₂ inkübasyondan sonra 1000 μM Oleuropein ile inkübe edilen BJ Fibroblast hücrelerinde β-galaktozidaz boyama sonuçları .(20X).

TARTIŞMA-SONUÇ

Yaşlanma, tüm canlıların yaşamları boyunca yaşadıkları doğal bir süreçtir. Yaşlanma mekanizmaları ile ilgili ilk bilinen teorilerden biri, Denham Harman tarafından ortaya koyulan serbest radikal teorisidir. Aslında hücrelerde serbest radikallerin birikmesi sonucunda oksidatif stres olduğu için oksidatif hasar oluşumu gözlemlenmektedir (16-17).

Radikal moleküller vücutta bulunan ya da dışardan alınan antioksidanların oluşturduğu savunma mekanizmasını geçerlerse hasar oluşumu meydana gelir. Bunun sonucunda da karbonhidrat, lipid, protein, DNA gibi makromoleküller ile etkileşime girerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olurlar. Bu değişimler arasında lipid, protein ve karbonhidrat peroksidasyonu, DNA oksidasyonu yer alır. Reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu bu hasarlar

sonucunda da oksidatif stres mekanizması gözlemlenir (18-19-20).

Artan oksidatif stresin yaşlanma ile gelişen proteinlerin peroksidasyonunda görevi olduğu günümüzde yapılan çalışmalarla ortaya koyulmaktadır. Oksidatif protein hasarı sonucunda protein yapısında meydana gelen değişiklikler; agregasyon ile fragmentasyonda artış, sekonder ve tersiyer yapının değişikliğe uğraması şeklinde gösterilmektedir. Bu değişimlerin meydana gelmesiyle proteolize yatkınlık artar, ayrıca normal fonksiyonda da azalma gözlemlenir (21).

Oksidatif stresin zararlarının en aza indirilmesi hatta oluşumunun engellenmesinde antioksidan maddeler görev almaktadır.

Eposito ve arkadaşlarının (2016) çalışmasında fındık kabuğundaki fitokimyasalların serbest radikal

temizleyici olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada fındık kabuğundan antioksidan madde elde edilerek insan kanser hücrelerinin büyümesinin engellenebileceğini ortaya koymuşlardır (22).

Zeytinden elde edilen birçok fenolik bileşenler ile de yapılan çalışmalarda antioksidan mekanizmaların ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Achat ve arkadaşları (2016), zeytin fenolüğü olarak oleuropein ve hidroksitriazol kullanarak yaptıkları çalışmada, model oluşturulan midede linoleik asidin peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (23).

Bu çalışmada yaşlanma mekanizması için literatürde yaygın olarak tercih edilen dermal fibroblast hücreleri üzerinde hidrojen peroksit ile oksidatif stres oluşturularak, fenolik bir madde olan ve zeytin bitkisinden elde edilen oleuropeinin hasara uğrayan hücreler üzerinde oluşturduğu antioksidan etki mekanizması çalışılmıştır.

BJ dermal fibroblast hücreleri sağlıklı hücre gruplarıdır. Yaşlanma mekanizması üzerine inceleme yapılan hücre kültürü çalışmalarında literatürde dermal fibroblast hücreleri kullanılmaktadır. Upton ve arkadaşları (2015) androjenetik alopesi hastalığı bulunan erkek dermal papillalar üzerinde oksidatif strese bağlı yaşlanma mekanizmalarını gözlemlemiştir (24).

Çalışmada MTT analizlerinde, kontrol grubuna göre %50 absorbans azalmasına yol açan oleuropein dozu sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. 24 saat sonucu ölçülen analizde sitotoksik doz 750 µM olarak saptanmıştır. Çalışmada 250 µM ve 500 µM'a ek olarak oleuropeinin olası toksik etkilerini gözlemek için 750 µM ve 1000 µM oleuropein dozları da kullanılmıştır. Oleuropein MTT dozu belirlenen başka bir çalışmada PC12 hücre hattı kullanılmıştır. Elmazoğlu ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada nöron benzeri PC12 hücre hattında oleuropein sitotoksik doz düzeyi 1-50 µM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada MTT analizi elde edilen doz düzeyinin yüksekliği PC12 hücre hattına kıyasla dermal fibroblast hücrelerinin toksik durumlara ve stres koşullarına daha dayanıklı bir yapısı olduğunu düşündürmüştür (14).

BJ fibroblast hücrelerinde H2O2 ile oksidatif stres oluşturulmuştur. Hu ve arkadaşları (2016) da

Gossypium hirsutum L. bitkisindeki oksidatif stres sonucu antioksidan maddelerin incelenmesi için yaptıkları çalışmada stres ortamı oluşturmak için H2O2 kullanmışlardır (25).

Çalışmada en etkili yaşlanma kriterlerinden biri olan oksidatif stres koşulları yaratılarak hem dermal fibroblast hücre hattında meydana gelen oksidatif hasar, hem de yine aynı hücre hattı üzerinde oleuropein tarafından oluşturulan antioksidan mekanizma incelenmiştir.

Elde edilen dermal fibroblast hücre lisatlarından total oksidan durumu incelendiğinde, sonuçlarda sadece H2O2 ile muamele edilen hücre grubunda, kontrol grubuna göre total oksidan düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlenmiştir (p>0,05). Hem H2O2, hem de H2O2'i takiben 24 saat süre ile oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarında kontrol grubuna göre total oksidan düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlemlenmiştir, ancak 250, 500, 750 ve 1000 µM oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarındaki total oksidan durumu sadece H2O2 ile muamele edilen hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir. H2O2 ile muamele edilen hücre grubuna göre 250, 500, 750 ve 1000 µM ile muamele edilen hücre grupları arasındaki total oksidan aktiviteyi en fazla azaltan grup 250 µM oleuropein ile muamele edilen dermal fibroblast hücre grubu olarak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmayla belirlenmiştir. H2O2 ile oluşturulan oksidatif stres koşullarında; oleuropeinin yarattığı antioksidan etki net olarak görülmektedir.

Sonuçlara göre, sadece H2O2 ile muamele edilen hücre grubundaki antioksidan aktivite hem kontrol grubuna hem de oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde azalma göstermiştir (p>0,05). Yine oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarındaki total antioksidan aktivite H2O2 ile muamele edilen hücre grubuna göre anlamlı bir şekilde doz bağımlı olarak artış göstermiş ve total antioksidan aktivite en fazla 750 µM oleuropein uygulanmış hücre grubunda gözlemlenmiştir (p<0,05). 1000 µM oleuropein uygulanmış hücre grubundaki antioksidan aktivite diğer oleuropein uygulanmış hücre gruplarına göre azalma göstermiştir. Bu da oleuropeinin

doz olarak hücreler üzerinde 750 µM' a göre biraz daha toksik etki yarattığını düşündürmektedir.

Literatürde de benzer çalışmalar mevcuttur. Geyikoğlu ve arkadaşları (2017), böbrek hasarı oluşturulmuş sıçanlara verilen kemoterapik ilaçların oksidatif stresine karşı oleuropein kullanmışlar. DNA hasarına etkisinin incelenmesinde TAS ve TOS analizi yapmışlardır. TOS analizinde kemoterapik ilaçların oksidan seviyelerini yükselttiği ancak oleuropein tedavisinin normal böbrek fonksiyonunu düzeltmek ve sisplatin ile indüklenen 8-OHdG oluşumunu azaltmak için oksidatif stresi modüle ettiği ortaya koyulmuştur (26).

Hücrelerin morfolojik görüntüleri boyama ile daha da netleştirilmiştir. Bu aşamada SA-β-galaktozidaz boyama yapılmıştır. Senesensin bilinen biyokimyasal karakteristiği, SA-β-gal yani senesense bağlı olarak ortaya çıkan β-galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artıştır. Bu sayede bu boyama yöntemiyle, senesense bağlı olarak görülen β-galaktozidaz aktivitesindeki artış hücrelere verilen X-gal substratının β-galaktozidaz enzimi tarafından parçalanması sonucu mavi ile boyanan hücreler tespit edilmiştir. Kılınçlı (2013), resveratrolün hücre yaşlanmaya etkisi üzerine yaptığı çalışmada dermal fibroblastlarda SA-β-galaktozidaz boyama yapmıştır. Bunun sonucunda resveratrol verilen gruplarda mavi boyanmanın görülmediği hücrelerin yaşlanma mekanizmasından ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, 24 saat sonunda, kontrol hücrelerinde, herhangi bir mavi renge boyanma tespit edilmemiştir. H2O2 ile oksidatif stres oluşturulmuş ve oleuropein ile muamele edilmemiş hücre grubunda mavi ile boyanan hücreler oldukça yoğun ve hücre morfolojileri bozulmuş görülmektedir. Bu da oksidatif stres koşullarının hücrelerde ileri derecede yaşlanmaya neden olduğunu göstermektedir. H2O2 ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra oleuropein ile muamele edilen hücre gruplarında yaşlanma etkilerinin daha az ortaya çıktığı mavi boyanan hücre sayısındaki azalıktan tespit edilmiştir. Bir başka deyişle, H2O2 ile oksidatif stres oluşturulmuş ve buna bağlı olarak da yaşlanmaya uğrayan hücrelerde mavi boyanma daha fazla gözlemlenirken, oleuropein dozları uygulanan hücrelerde maviye boyanma yaşlanma görülen hücrelere oranla az gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmada BJ dermal fibroblast hücreleri oleuropein ile muamele edilmiş ve oleuropeinin fibroblast hücrelerinde antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı ve buna bağlı olarak oksidatif stres koşullarında hücrelerde meydana gelen yaşlanma mekanizmalarını azalttığı gözlemlenmiştir.

Son yıllarda yapılmış in vitro çalışmalara benzer sonuçlar aldığımız bu çalışmamız, oleuropeinin, doz artımıyla antioksidan etkilerinin ortaya konulmasında literatüre destek sağlamaktadır. Belirlenen bu özellikleriyle fibroblast hücrelerinde diğer tedavilere ek olarak destek tedavi niteliğinde kullanılabilceği görüşünü desteklenmektedir.

Ancak, yapılmış çalışmalarda yaşlanmaya neden olan bir çok mekanizma üzerinde belirlenen parametreler çalışılmıştır. Oleuropeinin BJ dermal fibroblast hücrelerindeki antioksidan etkisinin yaşlanmayı inhibe ettiğinin başka mekanizmalar ile açıklanarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Öksüzökyar MM, Eryiğit SÇ, Düzen KÖ. et al. Biyolojik Yaşlanma Nedenleri Ve Etkileri. MAKÜ Sağ. Bil. Enst. Derg. 2016; 4(1): 34-41.
2. Skinner JS. Exercise Testing And Exercise Prescription For Special Cases. Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore. Third Edition. 2005; p5.
3. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. Cardiovascular Research. 1998; 40: 426 –32
4. Demircan G. Aspirinin Vasküler Endotel Hücre Kültüründe Oksidatif Ve Nitrozatif Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Samsun. Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Biyoloji Anabilim Dalı. 2011
5. Gökalp H, Kaya M, Zorba Ö. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. 2002; 320: 137
6. Sevim D. Antioksidanlar Ve Zeytinyağı. Zeytin Bilimi 1 (1) 2011; 43-47
7. Taner G. Serbest Radikallere Karşı Antioksidan Savunma, Bilim Teknik, 2005; 113: 453
8. Brown JE. Nutrition Now. 2nd Edition, 1999; West/Wadsworth, Belmont.
9. Fernandez-Pancho MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant Activity Of Phenolic Compounds: From In Vitro Results To In Vivo Evidence. Critical Reviews In Food Science And Nutrition 2008; 48: 649-671
10. Servili M, Montedoro GF. Contribution Of Phenolic Compounds To Virgin Olive Oil Quality. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002; 104, 602-613
11. Yorulmaz A, Tekin A. Zeytin Ve Zeytinyağı Fenolikleri. I. Ulusal Öğrenci Kongresi. 17-18. 2008; 24-31.

12. Omar SH. Oleuropein In Olive And Its Pharmacological Effects, *Sci Pharm.* 2010; 78: 133–154
13. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, et al. Effects Of The Olive Derived Polyphenol Oleuropein On Human Health, *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15. 18508-18524
14. Elmazoğlu Z, Ergin V, Şahin E, Kayhan H, Karasu Ç. Oleuropein And Rutin Protect Against 6-OHDA-Induced Neurotoxicity In PC12 Cells Through Modulation Of Mitochondrial Function And Unfolded Protein Response. *Interdiscip Toxicol.* 2017; 10(4): 129–141
15. Zhao Q, Bai Y, Li C, et al. Oleuropein Protects Cardiomyocyte against Apoptosis via Activating the Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway In Vitro: 2017; 2017: 2109018
16. Harman D. Aging: A Theory Based On Free Radical And Radiation Chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
17. Karabulut H, Gülay M. Serbest Radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 2016; 4(1): 50-59
18. Akkuş İ. Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*, 1995; 38, Kuzucular Ofset, Konya.
19. Schieber M, Chande NS, ROS Function In Redox Signaling And Oxidative Stress. *Current Biology.* 2014; 24;10. 453-462
20. Karabulut H, Gülay M. Serbest Radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 2016; 4(1): 50-59
21. Öğüt S, Atay E. Yaşlılık Ve Oksidatif Stres. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2012; 19(2)/68-74.
22. Esposito T, Sansone F, Franceschelli S, et al. Hazelnut (Corylus Avellana L.) Shells Extract: Phenolic Composition, Antioxidant Effect And Cytotoxic Activity On Human Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(2), 392
23. Achat S, Rakotomanomana N, Madani K, Dangles O. Antioxidant Activity Of Olive Phenols And Other Dietary Phenols In Model Gastric Conditions: Scavenging Of The Free Radical DPPH And Inhibition Of The Haem-Induced Peroxidation Of Linoleic Acid. *Food Chemistry.* 2016; 213;15. 135-142
24. Upton JH, Hannen RF, Bahta AW, et al. Oxidative Stress–Associated Senescence In Dermal Papilla Cells Of Men With Androgenetic Alopecia. *Journal Of Investigative Dermatology.* 2015; 135;5. 1244-1252
25. Hu W, Lv X, Yang J, et al. Effects Of Potassium Deficiency On Antioxidant Metabolism Related To Leaf Senescence In Cotton (Gossypium Hirsutum L.). *Field Crops Research*, 2016; Volume 191. Pages 139-149
26. Geyikoğlu F, Emir M, Çolak S, et al. Effect Of Oleuropein Against Chemotherapy Drug-Induced Histological Changes, Oxidative Stress, And DNA Damages In Rat Kidney Injury. *J.Food. Drug Anal.* 2017; 25(2):447-459