



Sızma Zeytinyağı Fenoliklerinin İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde Oksidatif Mitokondriyal ve Nükleer DNA Hasarına Karşı Etkisi

Özlem Erol Tınaztepe^{1,*}

¹ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, Türkiye

Makale Tarihi

Gönderim: 03.02.2020

Kabul: 19.08.2020

Yayın: 29.12.2020

Araştırma Makalesi

Öz – Son yıllarda, zeytinyağının faydalı etkilerinin sadece yüksek oleik asit içeriğiyle ilişkili değil, aynı zamanda içerdiği fenolik bileşenlerin antioksidan aktivitesiyle de ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, sızma zeytinyağı fenolik ekstraktının (ZFE), insan periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMH) nükleer ve mitokondriyal DNA'sındaki bazal DNA hasarı ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarı üzerindeki etkisi incelendi. Hücreler, 35 yaşındaki sağlıklı iki erkek ve iki kadın gönüllünün kan örneklerinden izole edildi. Hücrelere diyetle alınabilecek ve sitotoksik etkisi olmayan ZFE konsantrasyonları ile ön-uygulama yapıldı. Hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturmak için 30 dakika hidrojen peroksit (H_2O_2 , 200 μM) ile uygulama yapıldı. DNA hasarları gene-özümlü QPCR yöntemi ile ölçüldü. Hücrelere ZFE ile ön uygulama yapılması her iki genomdaki bazal DNA hasar seviyesi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadı. H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres, nDNA (nükleer DNA) (1.43 hasar/10kb) ile karşılaştırıldığında mtDNA'da (mitokondriyal DNA) (2.76 hasar/10kb) iki kat daha fazla hasara neden oldu. Bununla birlikte, oksidatif stres öncesi ZFE ile ön-uygulama yapılması hem mtDNA hem de nDNA üzerinde koruyucu etki göstermedi. Sonuçta, sızma zeytinyağı tüketimi sonrası doku ve vasküler sistemde bulunabilecek iki farklı fenolik ekstrakt konsantrasyonunun, insan PKMH'lerde oksidatif DNA hasarlarını önleyici bir etkiye sahip olmadığı belirlendi. Bu sonuçlar, zeytinyağının sindirim sistemi üzerinde daha fazla sahip olduğu bilinen faydalı etkisinin tüketiminden hemen sonraki daha yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler – Fenolik bileşikler, gene-özümlü QPCR, oksidatif DNA hasarı, oksidatif stres, zeytinyağı

The Effect of Virgin Olive Oil Phenolics Against Oxidative Mitochondrial and Nuclear DNA in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

¹ Vocational School of Health Services, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey

Article History

Received: 03.02.2020

Accepted: 19.08.2020

Published: 29.12.2020

Research Article

Abstract – In recent years, evidence has accumulated that the beneficial effects of olive oil are related to not only its high oleic acid content, but also the antioxidant activity of its phenolic components. This study examined the effect of virgin olive oil phenolic extract (VOPE) on basal and oxidative stress-induced DNA damage within nuclear and mitochondrial genomes of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Cells were isolated from the blood samples of the healthy volunteers, 35 year old two male and two female. Cells were pre-treated with VOPE at a dose range that is dietary-relevant and non-cytotoxic. To create oxidative stress, cells were exposed to hydrogen peroxide (H_2O_2 , 200 μM) for 30 minutes. The DNA damages were measured by gene-specific QPCR method. Pretreatment with VOPE did not change the level of basal DNA damage in both mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA). H_2O_2 -induced oxidative stress caused two-fold higher DNA damage in mtDNA (2.76 lesions/10kb) than nDNA (1.43 lesions/10kb). However, VOPE treatment before oxidative stress did not show any protective effects on both mtDNA and nDNA. As a result, two different phenolic extract concentrations that could be found in the tissues and vascular system after virgin olive oil consumption do not have a capacity to prevent oxidative DNA damage in human PBMCs. These results indicate that the beneficial effect of olive oil, which is known to have more on the digestive system, may be due to its higher concentrations immediately after consumption.

Keywords – Phenolic compounds, gene-specific QPCR, oxidative DNA damage, oxidative stress, olive oil

¹ ozlemerol@comu.edu.tr

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. Giriş

Zeytinyağı, değerli bir doğal fenolik bileşik kaynağı ve ayrıca Akdeniz diyetinin en önemli bileşenidir. Zeytinyağının antioksidan kapasitesi, yağın fenolik bileşiklerinin miktarı ve içeriği ile yakından ilişkilidir (Gorzynik-Debicka vd., 2018). Bazı çalışmalar, zeytinyağının oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin öncelikle doğrudan antioksidan etki yoluyla ve aynı zamanda dolaylı olarak bazı genlerin anlatımının ve bazı antioksidan enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesini içeren mekanizmalar yoluyla ortaya çıktığını göstermektedir (Konstantinidou, Covas, Sola, ve Fitó, 2013). Fakat zeytinyağının insan sağlığı üzerindeki faydaları ile ilgili deneysel çalışma sonuçlarına rağmen, zeytinyağı tüketiminin yararlarına dair biyolojik mekanizmalar halen tartışmalıdır (Fitó vd., 2007). Fenolik bileşiklerin hücreleri oksidatif stresin yıkıcı etkilerine karşı koruduğu; ayrıca anti-kanserojen, antihipertansif, antitrombotik, antioksidan ve antienflamatuvar aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Buckland ve Gonzalez, 2015).

Reaktif oksijen türleri (ROT) vücudumuzda çeşitli endojen süreçlerle ve farklı fizyokimyasal koşullara veya patofizyolojik durumlara maruz kalmanın bir sonucu olarak üretilen, kimyasal olarak reaktif moleküllerdir (Devasagayam vd., 2004). ROT lipidlerde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara yol açar. Memeli hücresindeki biri çekirdekte ve diğeri mitokondride bulunan DNA molekülleri, yaşamın sürekliliği için gereklidir. ROT, DNA'da bazsız bölgeler, oksitlenmiş bazlar, tek/çift zincir kırıkları gibi birçok DNA hasarı türüne neden olur (Kryston, Georgiev, Pissis, ve Georgakilas, 2011). Nükleer ve mitokondriyal genomlarda oksidatif hasar birikiminin yaşlanma sürecinde ve yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Jang ve van Remmen, 2009). Ayrıca, DNA hasarları bazı kanserlerin gelişimi ile de yakından ilişkilidir (Bishop vd., 2015).

Zeytinyağının fenolik bileşiklerinin yaşlanma, dejeneratif hastalıklar ve kansere karşı korunmada katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bulguların çoğu zeytinyağı tüketiminin meme kanseri ve sindirim sistemi kanserleri riskini azaltabileceğini ortaya koymuştur (Buckland ve Gonzalez, 2015). Ancak olası mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiştir. Zeytinyağının koruyucu etkilerinin kanserleşme sürecinin farklı aşamaları ile ilişkili olabileceği kabul edilmektedir (Romani vd., 2019). Önceki çalışmalarda, bazı fenoliklerin ve zeytinyağı ekstraktının nükleer DNA'yı hasara karşı koruyabileceği ileri sürülmüştür (Weinbrenner vd., 2004; Salvini vd., 2006; Fabiani vd., 2008). Ancak bu çalışmaların çoğunda, tek hücreli alkalın jel elektroforezi (COMET analizi) yöntemi kullanılarak sadece nükleer DNA'daki zincir kırıkları ve bazı DNA onarım ürünleri ölçülmüştür.

Zeytinyağı fenolikleri tarafından oksidatif DNA hasarının azaltılması/önlenmesi, zeytinyağının olası kanser önleyici etkisinin altında yatan bir mekanizma olabilir. Bu nedenle, çalışmamızda zeytinyağı fenolik bileşiklerinin normal insan hücrelerinin hem nükleer DNA (nDNA)'sı hem mitokondriyal DNA (mtDNA)'sı üzerindeki potansiyel koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Sızma Zeytinyağından Toplam Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Sızma zeytinyağı, Çanakkale'de yerel bir marketten satın alındı. Toplam fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, Nosis ve diğerleri (2005) tarafından tarif edilen yöntemle gerçekleştirildi. Elde edilen sızma zeytinyağı fenolik ekstraktı (ZFE), DMSO içerisinde çözündürüldü ve -20 °C'da saklandı. Ekstraktın toplam fenolik içeriği Ragazzi ve Veronese (1973) tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak ölçüldü ve fenolik miktarı; kg zeytinyağı başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

2.2. Katılımcılar

Bu çalışma Helsinki Bildirgesine uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya; Akdeniz'e özgü diyet ile beslenen, sigara içmeyen, yüksek kolesterol, hipertansiyon öyküsü, diyabet, kanser veya diğer önemli kronik hastalık durumları olmayan, antioksidan, vitamin veya başka bir ilaç kullanmayan sağlıklı 2 erkek ve 2 kadın gönüllü

birey katılımcı olarak dâhil edildi. Çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

2.3. İnsan Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin (PKMH) İzolasyonu

PKMH'ler gönüllü bireylerden alınan taze, heparinize edilmiş tam kanlardan ficol-hypaque gradiyent santrifüj yöntemi ile elde edildi ve üç kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, pH 7.4) ile yıkandı (Gill, 2019). Yeni izole edilmiş PKMH'ler, antibiyotik/antimikotik karışımı [streptomisin (100 µg / ml), penisilin (100 U/ml), amfoterisin B (0.25 µg/ml)] ve %10 (h/h) fetal sığır serumu (FBS) ile zenginleştirilmiş besi ortamında (RPMI 1640) süspanse edildi. Hücreler %5 CO₂, %95 hava atmosferi içinde 37 °C'da 1.5 saat adapte olmaları için inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı tripan mavisi tekniği ile (>%95 olarak) belirlendi. Hücreler tripan mavisi çözeltisi (%0.4) ile 1:1 (h:h) oranında seyreltildi ve hemositometre ile sayıldı. Hücre yoğunluğu, 2x10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı ve bu hücre süspanasyonu deneyler için kullanıldı.

2.4. PKMH'lere ZFE ve H₂O₂ Uygulaması

PKMH süspanasyonu, %10 FBS ile zenginleştirilmiş besi ortamında ZFE'nin 2 farklı konsantrasyonu (15 µg/ml, 25 µg/ml) ve DMSO (%0.5) ile 37 °C'da 3 saat uygulamaya tabi tutuldu. Hücrelere uygulanan ZFE konsantrasyonu, zeytinyağı tüketimi sonrası doku ve vasküler sistemde bulunabilecek konsantrasyon aralığı referans alınarak seçildi (Rubió vd., 2012). Uygulanan ZFE konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi tripan mavisi tekniği ile ölçüldü. Herhangi sitotoksik bir etki göstermediği belirlendikten sonra diğer analizler için bu konsantrasyonlar kullanıldı. Hücreler santrifüj (3000 g) ile toplandı ve PBS ile yıkandı. Hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturmak için standart inkübasyon koşullarında 30 dakika boyunca 200 µM H₂O₂ ile uygulama yapıldı. H₂O₂, PBS ile seyreltildiği için kontrol olarak PBS kullanıldı (Aebi, 1974). Uygulama süresinin sonunda, hücreler santrifüj ile toplandı ve PBS ile yıkandı. Elde edilen hücre peleti genomik DNA izolasyonunda kullanıldı.

2.5. DNA İzolasyonu

Toplam genomik DNA, üreticinin protokolüne göre PureLink™ Genomik DNA İzolasyon Kiti (Invitrogen, ABD) ile izole edildi. İzole edilen yüksek moleküler ağırlıklı hücresel DNA'ların konsantrasyonları Quant-iT™ dsDNA Yüksek Hassasiyetli Test Kiti ve Qubit™ florimetre (Invitrogen, ABD) kullanılarak ölçüldü.

2.6. DNA Hasarının Belirlenmesi

DNA hasarının belirlenmesinde Erol, Arda ve Erdem (2012) tarafından tarif edilen yöntem kullanıldı. nDNA'da yer alan APEX1 genine ait 2082 bç'lik fragmandaki (aktif olarak transkribe edilir) ve mtDNA'nın 2232 bç'lik fragmanındaki DNA hasarları gene-özümlü QPCR yöntemi ile belirlendi. İnternal kontrol olarak nDNA için 180 bç'lik APEX gen bölgesi, mtDNA için 160 bç bir bölge kullanıldı. Aynı DNA örneğinden 3tekrarlı olarak PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri tris-asetat-EDTA tamponu (pH 8.0) içinde %2 (a/h) yatay agaroz jel üzerinde 45 dakika boyunca elektroforeze tabi tutularak kontrol edildi. PCR ürünlerinin miktarı florometrik olarak ölçüldü (Quant-iT™ dsDNA Yüksek Hassasiyetli Test Kiti®, Invitrogen). Daha sonra hasar frekansını belirlemek istediğimiz dizilerin PCR ürünlerinin miktarları internal kontrollere ait PCR ürünlerinin miktarlarına göre normalize edildi. Öncelikle elde edilen PCR ürünlerinin bağlı miktarı belirlendi ve daha sonra fragman başına ortalama hasar frekansı Poisson denklemi kullanılarak hesaplandı (Furda, Santos, Meyer, ve van Houten, 2014).

2.7. İstatistiksel Analizler

Her deney, 4 donörden 3 kez (n=3) elde edilen PKMH örnekleri kullanılarak tekrarlandı. Deney grupları arasında (GraphPad Prism, San Diego, CA) önemli farklılıklar olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardışık olarak Tukey testi kullanıldı.

3. Bulgular ve Tartışma

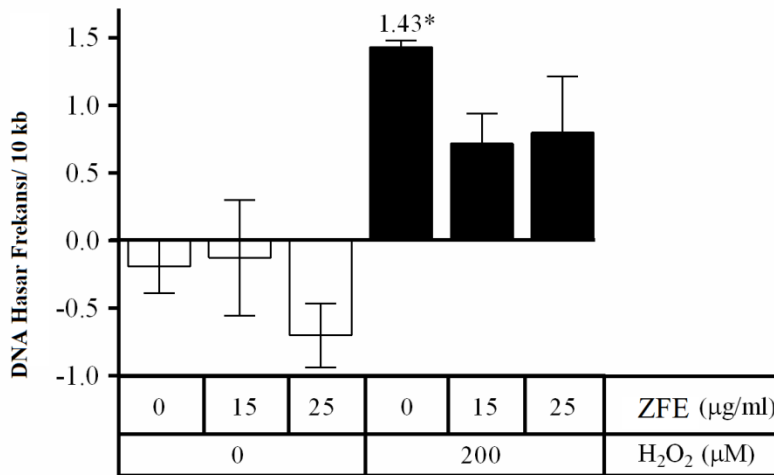
Sızma zeytinyağı, hidroksitirosol, oleosantal ve oleuropein gibi antioksidan fenolik bileşikler bakımından zengindir (Gorzynik-Debicka vd., 2018). Bu çalışmada Folin-Ciocalteu testinden elde edilen sonuçlara göre, kullanılan sızma zeytinyağındaki toplam fenolik bileşiklerin miktarı, zeytinyağının kg başına 104 mg GAE idi. Montedoro ve diğerleri (1992) zeytinyağlarını toplam fenolik içeriğine göre üç gruba ayırmıştır [1. grup (50±200 mg/kg), 2. grup (200±500 mg/kg) ve 3. grup (500±1000 mg/kg)]. Bu çalışmada kullanılmış olan sızma zeytinyağının fenolik içerik bakımından birinci gruba dâhil olduğu görülmektedir.

Zeytinyağı tüketiminin sağlığı geliştirici etkisinin, tüm bileşenlerinin sinerjistik etkisinin bir sonucu olduğu konusunda genel bir düşünce vardır. Bu nedenle, çalışmamızda zeytinyağının toplam fenolik ekstraktının fraksiyonlaması yapılmadan doğrudan etkinliği araştırıldı. Uygulanan ZFE konsantrasyonlarının (15 µg/ml ve 25 µg/ml) hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlendi.

H₂O₂ hücrel metabolizma sonucunda üretilir ve metabolizmada önemli roller oynar (Bienert, Schjoerring, Jahn, 2006). Fakat bunun yanında oksidatif strese neden olabilir ve sonuçta DNA da dahil olmak üzere hücrel makromoleküllere zarar vermektedir. Bu nedenle mevcut çalışmada oksidatif stres ajanı olarak H₂O₂ tercih edildi. Hasarlı DNA ürünleri, genellikle besin maddelerinin koruyucu etkisini veya ksenobiyotiklerin genotoksisitesini incelemek için biyobelirteç olarak kullanılır. Hasar frekansı, oksidatif stresin türüne, seviyesine ve diğer bazı faktörlere bağlı olarak değişir (Kryston vd., 2011).

Nükleer ve mitokondriyal genomlar üzerindeki hasarların tespiti için gene-özümlü QPCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, birçok DNA hasarının Taq DNA polimerazın ilerlemesini yavaşlatabileceğini veya engelleyebileceğini temel alır (Furda vd., 2014).

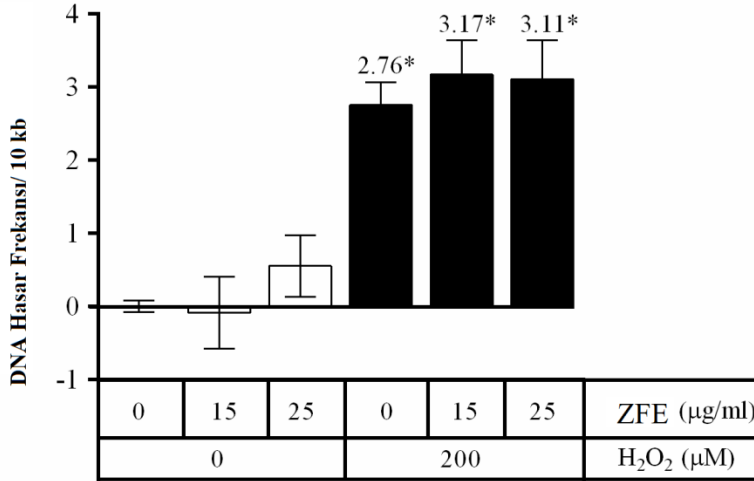
Bu çalışmanın ilk amacı, ZFE'nin PKMH nükleer ve mitokondriyal genomundaki bazal DNA hasarı üzerindeki etkisini değerlendirmektir (Hunter, Jung, Di Giulio, ve Meyer, 2010). Bu kapsamda elde edilen veriler ZFE'nin her iki uygulama konsantrasyonunun hücrelerin bazal nDNA (bkz. Şekil 1) ve mtDNA (bkz. Şekil 2) hasar frekansını etkilemediğini ortaya koydu.



Şekil 1. ZFE ve H₂O₂'in PKMH nDNA'sındaki hasar frekansı üzerine etkileri (* Kontrol grubuna kıyasla p<0.01) (Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir)

Çalışmanın ikinci amacı ise, oksidatif stres altında her iki genomda meydana gelen DNA hasarlarını belirlemektir. Hidrojen peroksit tarafından oluşturulan oksidatif DNA hasarları, QPCR analizi kullanılarak rutin olarak tespit edilmektedir. H₂O₂ (200 µM) uygulamasının hücrelerde oksidatif DNA hasar frekansını önemli ölçüde artırdığı belirlendi (bkz. Şekil 1 ve Şekil 2). Sonuçlarımız, mitokondriyal genomun (1.43 hasar/10 kb) nükleer genoma (2.76 hasar/10kb) göre oksidatif strese belirgin şekilde daha duyarlı olduğunu doğrulamıştır (Erol vd., 2012). mtDNA, oksidatif hasara daha duyarlıdır çünkü mtDNA intron bölgeleri

içermez ve yüksek transkripsiyon seviyesine sahiptir (Cline, 2012). Hücrelerin enerji kaynağı olan mitokondri, homeostaz için çok önemlidir ve apoptotik hücre ölümünde önemli bir rol oynar. Ayrıca mtDNA'daki hasarlar hücrede enerjinin tükenmesine, gen ekspresyonunda değişikliğe ve sonuçta mitokondriyal fonksiyon kaybına yol açar (Cline, 2012). Bu nedenle, yaşlanma ve kronik dejeneratif hastalıklarda nDNA hasarlarından çok mtDNA hasarlarının birikimi daha önemli bir rol oynar. Çalışmamızda ZFE ile ön uygulamanın, oksidatif stresin neden olduğu nDNA hasar düzeyini azaltmaya yönelik bir eğilim oluşturduğu fakat bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (bkz. Şekil 1). mtDNA üzerinde ise ZFE ön uygulamasının herhangi koruyucu bir etkiye sahip olmadığı ve hatta çok küçük miktarda artışa neden olduğu ama bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (bkz. Şekil 2).



Şekil 2. ZFE ve H₂O₂'in PKMH mtDNA'sındaki hasar frekansı üzerine etkileri (* Kontrol grubuna kıyasla p<0.01) (Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir)

Zeytinyağı fenolik bileşiklerinin DNA hasarına karşı koruyucu etkisine ilişkin, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. Sağlıklı yetişkinlerde diyet, yaşam tarzı ve içsel kaynaklı oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmada, oksidatif DNA hasarı ile sızma zeytinyağı tüketimi arasında bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır (Giovannelli vd., 2002). Fakat sık sık taze meyve ve sebze tüketiminin ve yüksek oranda antioksidan alımı (zeytinyağı tüketimi) ile periferik kan hücrelerinin DNA hasar oranı arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir (Palli vd., 2000). Diğer bir çalışmada ise COMET testi ile sağlıklı postmenopozal kadınlarda yüksek kaliteli sızma zeytinyağı (592 mg toplam fenolik/kg) alınımının toplam genomik DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir (Salvini vd., 2006). Ayrıca, sağlıklı erkeklerde kısa süreli zeytinyağı tüketimi ile DNA onarım ürünü olan 8-okso-dG miktarının idrardaki düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (Weinbrenner vd., 2004).

Fabiani ve diğerleri (2008), sızma zeytinyağı fenolik ekstraktının, 40 µM H₂O₂ (30 dak.) uygulamasına karşı PKMH DNA'sını hasardan koruduğunu öne sürmektedir. Bu çalışmada kullanılan fenolik ekstrakt konsantrasyonlarının (~2, ~6, ~10 ve ~20 µg/ml) bizim uyguladığımız konsantrasyonlar ile (15 µg/ml ve 25 µg/ml) benzer olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, fenolik ekstraktın besiyeri ortamına ilave edilmesinden hemen sonra, hücreler 40 µM H₂O₂ ile muamele edilmiştir. Bu nedenle, zeytinyağının fenolik bileşikleri, hücrelerin içine girmeden, ortamda doğrudan antioksidan aktivitesi yoluyla H₂O₂'e karşı koruyucu bir etki sergilemiş olabilir. Ek olarak, bu çalışmada kullanılan H₂O₂ konsantrasyonu 40 µM iken, çalışmamızda uygulanan konsantrasyon 200 µM olup, ZFE uygulaması bu yüksek konsantrasyona karşı koruyucu bir etki gösterememiş olabilir.

4. Sonuçlar

Gerçekleştirilen bu çalışmada, zeytinyağı toplam fenolik ekstraktının uygulanan düşük konsantrasyonlarının insan hücrelerinin hem nDNA hem de mtDNA'sında oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olmadığı *in vitro* olarak ilk kez ortaya konulmuştur. Çalışmamız kapsamında uygulanan (doku ve vasküler sistem için olası olan) konsantrasyonların koruyucu bir etki göstermek için düşük olabileceği ve DNA'yı koruyabilecek konsantrasyonların ancak zeytinyağı tüketimi sonrası bağırsaklarda bulunabilecek daha yüksek konsantrasyonlar olabileceği düşünülmektedir (Rubió vd., 2012). Akdeniz diyeti ve zeytinyağının insan sağlığı üzerindeki faydalarını oksidatif stresi azaltmak yanında; oksidatif stres ve kronik dejeneratif hastalıklarla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde etki göstererek de sağlayabileceğini ortaya koyan kanıtlar mevcuttur (Konstantinidou vd., 2013; Martín-Peláez, Covas, Fitó, Kušar, ve Pravst, 2013). Bu bakımdan zeytinyağının etkilerinin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi için; farklı hücre türlerinde fenolik bileşiklerin gen ekspresyonu ve düzenlemesi üzerindeki etkileri araştırılmalıdır.

Yazar Katkıları

Yazar Özlem EROL TINAZTEPE: Çalışmanın tüm aşamalarını gerçekleştirmiş ve makaleyi yazmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

- Aebi, H. (1974). In catalase. In H.U. Bergmeyer (Ed.), *In methods of enzymatic analysis* (pp. 673–684). New York, USA. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/book/9780120913022/methods-of-enzymatic-analysis>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. ve Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bishop, K.S., Erdrich, S., Karunasinghe, N., Han, D.Y., Zhu, S., Jesuthasan A. ve Ferguson L.R. (2015). An investigation into the association between DNA damage and dietary fatty acids in men with prostate cancer. *Nutrients*, 7, 405–422. <https://doi.org/10.3390/nu7010405>
- Buckland, G. ve Gonzalez, C.A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *British Journal of Nutrition*, 113, 94–101. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003936>
- Cline S.D. (2012). Mitochondrial DNA damage and its consequences for mitochondrial gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(9-10), 979–991. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.06.002>
- Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S. ve Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.06.002>
- Erol, Ö., Arda, N. ve Erdem, G. (2012). Phenols of virgin olive oil protects nuclear DNA against oxidative damage in HeLa cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3475–3479. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.048>
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G.F. ve 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. *The Journal of Nutrition*, 138(8), 1411–1416. <https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1411>
- Fitó, M., de la Torre, R., Farré-Albaladejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J. ve Covas, M.I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 375–381. <http://old.iss.it/publ/anna/2007/4/434375.pdf>
- Furda, A., Santos, J.H., Meyer, J.N. ve van Houten, B. (2014). Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells. In P. Keohavong ve S. Grant (Ed.), *Molecular toxicology protocols. Methods in molecular biology (Methods and protocols)* (pp. 419–437). Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-739-6_31

- Gill, P.K. (2019). Rapid isolation of peripheral blood mononuclear cells from whole blood with ficoll hypaque density centrifugation. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 17-20. <https://www.ikprpress.org/index.php/JIRMEPS/article/view/4566>
- Giovannelli, L., Saieva, C., Masala, G., Testa, G., Salvini, S., Pitozzi, V., Riboli, E., Dolara, P. ve Palli, D. (2002). Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a mediterranean population. *Carcinogenesis*, 23(9), 1483-1489. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.9.1483>
- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M. ve Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 28: 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030686>
- Hunter, S.E., Jung, D., Di Giulio, R.T. ve Meyer, J.N. (2010). The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. *Methods*, 51(4), 444-451. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.033>
- Jang, Y.C. ve van Remmen, H. (2009). The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Experimental Gerontology*, 44(4), 256-260. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.12.006>
- Konstantinidou, V., Covas, M.I., Sola, R. ve Fitó, M. (2013). Up-to date knowledge on the in vivo transcriptomic effect of the mediterranean diet in humans. *Molecular Nutrition Food Research*, 57(5), 772-783. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200613>
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P. ve Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(1-2), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>
- Martín-Peláez, S., Covas, M.I., Fitó, M., Kušar, A. ve Pravst, I. (2013). Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims. *Molecular Nutrition Food Research*, 57(5), 760-771. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200421>
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. ve Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1571-1576. <https://doi.org/10.1021/jf00021a019>
- Nousis, L., Doulias, P.T., Aligiannis, N., Bazios, D., Agalias, A., Galaris, D. ve Mitakou, S. (2005). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 39(7), 787-795. <https://doi.org/10.1080/10715760500045806>
- Palli, D., Vineis, P., Russo, A., Berrino, F., Krogh, V., Masala, G., Munnia, A., Panico, S., Taioli, E., Tumino, R., Garte, S. ve Peluso, M. (2000). Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the epic-Italy cross-sectional study. *The International Journal of Cancer*, 87, 444-451. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000801\)87:3<444::AID-IJC21>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000801)87:3<444::AID-IJC21>3.0.CO;2-%23)
- Ragazzi, E. ve Veronese, G. (1973). Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation, *Journal of Chromatography*, 77(2), 369-375. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92204-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92204-0)
- Romani, A., Ieri, F., Urciuoli, S., Noce, A., Marrone, G., Nediani, C. ve Bernini, R. (2019). Health effects of phenolic compounds found in extra-virgin olive oil, by-products, and leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients*, 11(8). pii: E1776. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>
- Rubió, L., Valls, R.M., MacIà, A., Pedre, A., Giralt, M., Romero, M.P., De La Torre, R., Covas, M.I., Solà, R. ve Motilva, M.J. (2012). Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites. *Food Chemistry*, 135(4), 2922-2929. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.085>
- Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., Masala, G., Ceroti, M., Giovacchini, V., Pitozzi, V., Galli, C., Romani, A., Mulinacci, N., Bortolomeazzi, R., Dolara, P. ve Palli D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 95(4), 742-751. <https://doi.org/10.1079/BJN20051674>
- Weinbrenner, T., Fitó, M., de la Torre, R., Saez, G.T., Rijken, P., Tormos, C., Coolen, S., Albaladejo, M.F., Abanades, S., Schroder, H., Marrugat, J. ve Covas, M.I. (2004). Olive oils high in phenolic compounds

modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2314-2321.
<https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2314>