

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ İNSAN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA
HÜCRELERİNDE TİROZİN KİNAZ, İNSÜLİN RESEPTÖR-1, GLUT4 VE GLUT2
PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burçin KASAP

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

NİSAN 2018

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ İNSAN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA
HÜCRELERİNDE TİROZİN KİNAZ, İNSÜLİN RESEPTÖR-1, GLUT4 VE GLUT2
PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Burçin KASAP
(150305123)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

NİSAN 2018

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150305123 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Burçin KASAP, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Zeytin Yaprağı Ekstraktının İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde Tirozin Kinaz, İnsülin Reseptör-1, GLUT-4 ve GLUT-2 Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç Dr. Şehabettin SELEK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Ata ALTURFAN
İstanbul Üniversitesi

Teslim Tarihi : 09.04.2018

Savunma Tarihi : 18.04.2018



Kıymetli Aileme...

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım esnasında bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e çok teşekkür ederim.

Tezimi yazarken gerek kurallar hakkında gerekse laboratuvar çalışmalarımda fazlasıyla destek olan hocam Eray Metin GÜLER ve Ersin KARATAŞ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamın uygulama kısmında yardımcı olan Hümeysra Nur KALELİ, Derya ARAS, Merve TOPACA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamın uygulama kısmını gerçekleştirirken teknik cihazları kullanmada yardımcı olan ve laboratuvar malzemelerinin teminini gerçekleştiren Mustafa KARABONCUK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve şefkatle yanımda olan, bana inanıp güvenen, arkamda hep destek olan sevgili kardeşim Burak Kasap, çok kıymetli annem Zeynep Kasap ve babam Ömer Kasap'a tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 6.2016/57 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Nisan 2018

Burçin KASAP
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burçin Kasap

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Diabetes Mellitus Tarihçesi.....	4
2.2 Diabetes Mellitusun Tanımı.....	4
2.3 Diabetes Mellitusun Tipleri.....	5
2.3.1 Tip I Diyabet.....	5
2.3.2 Tip II Diyabet.....	6
2.4 Diabetes Mellitus Belirtileri.....	6
2.5 İnsülin Yapısı.....	7
2.5.1 İnsülin reseptörü ve etki mekanizması.....	7
2.5.2 İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine etkileri.....	8
2.6 Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi.....	10
2.7 Fitoterapinin Tarihçesi.....	10
2.7.1 Fitoterapi tedavisi ve seçenekler.....	11
2.8 <i>Olea europae</i> L.'nin Bilimsel Sınıflandırılması.....	11
2.8.1 Oleuropein.....	12
2.8.2 Zeytin yaprağının tıbbi özellikleri.....	13
2.8.3 <i>Olea europaea</i> L'nin antioksidan aktivitesi.....	14
2.8.4 <i>Olea europaea</i> L'nin fenolik madde içeriği.....	14
2.8.5 <i>Olea europaea</i> L.'nin antidiyabetik ve hipoglisemik etkisi.....	16
2.9 İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinin Özellikleri.....	17
2.10 Kanser ve Diyabet İlişkisi.....	18
2.11 Tirozin Kinaz.....	19
2.12 Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	20
2.12.1 Difenil pikril hidrazil (DPPH) yöntemi.....	20
2.12.2 Kuprak yöntemi.....	21
2.12.3 Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi.....	21
2.13 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	21
2.14 Western Blot Tekniği.....	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1 Gereç.....	24
3.1.1 Cihazlar.....	24
3.1.2 Kullanılan kimyasallar.....	25
3.2 Yöntem.....	27
3.2.1 Zeytin yaprağının ekstresinin eldesi.....	27
3.2.2 Farklı çözücülerde hazırlanan zeytin yaprağı ekstralarında HPLC ile oleuropein miktar tayini.....	28
3.2.2.1 Kullanılan ekipmanlar.....	28
3.2.2.2 Standart çözeltiler.....	28
3.2.2.3 Kromatografik koşullar.....	28
3.2.2.4 Kalibrasyon.....	28
3.2.2.5 Oleuropein RP-HPLC metodu.....	29
3.2.3 Total fenolik içerik.....	29
3.2.4 Total flavanoid içerik.....	29
3.2.5 Prooksidan aktivite.....	29
3.2.6 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal giderim aktivite yöntemi.....	30
3.2.7 Bakır indirgeyici antioksidan kapasite (KUPRAK).....	31
3.2.8 ABTS radikal katyon yakalama aktivitesi.....	31
3.2.9 Hepatoselüler karsinoma hücrelerinin canlılık testi.....	32
3.2.10 Hepatoselüler karsinoma hücrelerinin apoptoz ölçümü.....	32
3.2.11 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin miktar tayini.....	32
3.2.12 Western blot analizi.....	33
3.2.13. İstatistiksel analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1 Oleuropein Konsantrasyonları.....	35
4.2 Total Fenolik İçerik.....	37
4.3 Total Flavanoid İçerik.....	38
4.4 Prooksidan Aktivite Tayini.....	39
4.5 Difenil Pikril Hidrazil Reaktif Ölçümü.....	40
4.6 Kuprak metodu.....	41
4.7 ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).....	42
4.8 Zeytin Yaprığı Ekstresi Miktarı ve Hücre Canlılığı.....	43
4.9 Apoptoz.....	45
4.10 Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri.....	49
4.11 Western Blot Analizi.....	50
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	73

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ACE	: Asetonitril
ADA	: American Diabetes Association
AMPK	: AMP-activated protein kinase
AO	: Akridin orange
AOA	: Antioksidan aktivite
AOK	: Antioksidan kapasite
APS	: Amonyum persülfat
BHA	: Bütil hidroksi asetat
BHT	: Bütilendirilmiş Hidroksi Toluen
BSA	: Bovin Serum Albumin
CAT	: Katalaz
CO₂	: Karbondioksit
CuCl₂	: Bakır(II) Klörür
DCM	: Diklorometan
ddH₂O	: İyonu giderilmiş su
dh₂O	: Distile su
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: Difenil pikril hidrazil
DSO	: Dünya Sağlık Örgütü
EB	: Etidyum bromür
ET	: Elektron transferi
EtOH	: Etanol
FCR	: Folin Ciocalteu Reaktifi
g	: Gram
GAE	: Gallik asit eş değeri
GDPH	: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GLUT 2	: Glukoz Taşıyıcı Protein Tip 2
GLUT 4	: Glukoz Taşıyıcı Protein Tip 4
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GTB	: Glukoz tolerans bozukluğu
H₂DCF-DA	: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HAT	: Hidrojen atomu transferi
HBA1C	: Hemoglobine bağlanmış glikoz
HCC	: Hepatosellüler Karsinoma
HepG₂	: İnsan Karaciğer kanser hücresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRP	: Horseradish peroksidaz
IDDM	: İnsülin Depented Diabetes Mellitus

IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
Irs-1	: İnsülin Reseptör Protein 1
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
KCl	: Potasyum Klörür
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LDL	: Low Density Lipoprotein
MetOH	: Metanol
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MT	: Metallotiyonin
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Di sodyum hidrojen peroksit
NH₄AC	: Amonyum asetat
PBS	: Phosphata buffered salin
PBST	: Phosphate buffered saline
PVDF	: Polyvinylidene floride
RIPA	: Radio Immuno Precipitation Assay
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPSS	: Sosyal bilimler için statistik programı
STZ	: Streptozotosin
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TAT	: Tamamlayıcı alternatif tedavi
TBST	: Tris-buffered saline
TCA	: Trikloroasetik asit
TEAC	: Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite
TEMED	: Tetramethyl ethylene diamine
TK	: Tirozin kinaz
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu
UDPG	: Uridin difosfoglukoz
UHY-ME	: Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkililik
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	: World Health Organization
°C	: Celsius
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik maddelerin miktarları.	15
Tablo 3.1 : Kullanılan cihazların listesi.	24
Tablo 3.2 : Kullanılan kimyasalların listesi.	25
Tablo 3.3 : Prooksidan aktivite ölçümü için kullanılan kimyasallar ve zeytin yaprağı ekstresi miktarları.	30
Tablo 3.4 : Çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinde DPPH antioksidan aktivite tayini için kullanılan miktarlar.	31
Tablo 3.5 : Protein ekspresyon analizinde elektroforez için yükleme tamponu içeriği.	33
Tablo 3.6 : Protein ekspresyon analizinde elektroforez için ayırma jeli içeriği.	34
Tablo 4.1 : Ekstraktların oleuropein içeriklerini gösteren tablolar.	35
Tablo 4.2 : Ekstrelerin organik çözücülerdeki ortalama oleuropein miktarları (DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MetOH:Metanol).	35
Tablo 4.3 : Hepg2 hücrelerine farklı dozlarda verilen ekstrelerin canlılık yüzdeleri.	43
Tablo 4.4 : Hepg2 hücrelerinin canlılık, nekrotik, apoptotik yüzdeleri. (V:Viability, A:Apoptotik, N:Nekrotik)	45
Tablo 4.5 : Hepg2 hücrelerine verilen farklı dozlardaki zeytin yaprağı ekstresi sonucunda reseptör sayıları ve yüzdeleri.	51

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Proinsülin zincir yapısı.....	7
Şekil 2.2 : İnsülinin glukoz metabolizmasına etkisi.	8
Şekil 2.3 : İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi.	9
Şekil 2.4 : Oleuropein yapısı.....	12
Şekil 2.5 : Oleuropein ile ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları.	13
Şekil 2.6 : Diyabette oksidatif stresin artış metabolizması.....	15
Şekil 2.7 : Oksidatif stresin hiperglisemi ile bağlantısı.....	16
Şekil 2.8 : Sinyal iletim mekanizmasında tirozin kinaz rolü.	19
Şekil 2.9 : Membran temelli immün tespit yöntemi.	23
Şekil 4.1 : Farklı organik çözücülerle yapılan ekstraksiyon sonucu seri grafik.....	36
Şekil 4.2 : Farklı organik çözücülerle gerçekleştirilen oleuropein konsantrasyonu (**: $p<0.01$).....	36
Şekil 4.3 : Metanol, asetonitril, diklorometan, etanol organik çözücülerle yapılan ekstraksiyonlardaki fenolik içerik. (*: $p<0.05$) (DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MeOH:Metanol, EtOH:Etanol).....	37
Şekil 4.4 : Farklı konsantrasyonlarda çözücülerle yapılan ekstraksiyondaki fenolik içerik.	38
Şekil 4.5 : Zeytin yaprağı ekstresinin dört farklı organik çözücüdeki flavanoid içerikleri.(*: $p<0.05$)(DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MeOH:Metanol, EtOH:Etanol).....	38
Şekil 4.6 : Farklı konsantrasyonlarda çözücülerle yapılan ekstraksiyondaki flavanoid içerik.	39
Şekil 4.7: Zeytin yaprağı ekstresinin metanol, asetonitril ve diklorometan çözücülerindeki prooksidan aktivitesi.	39
Şekil 4.8 : Farklı organik çözücülerle yapılan ekstraksiyonun % inhibisyon değerleri.	40
Şekil 4.9 : Zeytin yaprağı ekstreslerinin yüzde inhibisyonlarının grafikleri.	41
Şekil 4.10 : Kuprak metoduyla organik çözücülerle yapılan ekstraksiyon yüzdeleri.	41
Şekil 4.11 : ABTS yöntemiyle yapılan ekstraksiyonun yüzde inhibisyon değerleri.	42
Şekil 4.12 : Çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresi verilen Hepg2 hücrelerinin canlılık değerleri. (-> :Aralığındaki değerler dahil) (*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$)	44
Şekil 4.13 : Apoptoz ölçüm sonucunda görünen canlı hücreler. (Yeşil:canlı)	46
Şekil 4.14 :Apoptoz ölçüm sonucunda görünen nekrotik ve canlı hücreler. (Kırmızı:nekrotik, Yeşil:canlı)	47
Şekil 4.15: Apoptoz ölçüm sonucunda görünen apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler. (Kırmızı:nekrotik, Turuncu:apoptotik, Yeşil:canlı)	47
Şekil 4.16 : Hepg2 hücrelerinin verilen çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresi sonucunda canlılık, apoptotik ve nekrotik değerleri. (*: $p<0.05$)(Yeşil:canlı, Kırmızı:nekrotik, Sarı:Apoptotik hücreler)	48

Şekil 4.17 : Hücre içi reaktif oksijen türleri (*:p<0.05 **:p<0.01).	49
Şekil 4.18 : Zeytin yaprağı ekstresinin farklı dozlarında Hepg2 hücrelerindeki reseptör oranları. (*:p<0.05 **:p<0.01 ***:p<0.001)	51
Şekil 4.19 : Hepg2 hücrelerindeki tirozin kinaz, Irs-1 reseptörleri ve Glut 4, Glut 2 transport roteini ekspresyonları.	52



**ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ İNSAN HEPATOSELÜLER KARSİNOMA
HÜCRELERİNDE TİROZİN KİNAZ, İNSÜLİN RESEPTÖR-1, GLUT4 VE GLUT2
PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Zeytin ağacı dünyadaki en dayanıklı ağaçlardandır. Yaprığı asırlardır yeryüzünde halk tarafından çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır. Zeytin yaprağının içerdiği, antioksidan özelliklere sahip olan yüz kadar farklı kimyasal madde günümüzde çeşitli kanser tiplerine sahip olan hastalarda ve Tip II diyabet hastalarında medikal tedaviye destek amaçlı kullanılmaktadır. Diyabetli bireylerde hipergliseminin karsinogenezde rol oynayan moleküller, antiapoptotik mekanizmalar, hücresel migrasyon ve invazivlik aracılığıyla kanser biyolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. İnsülin direnci sonucu ortaya çıkan inflamatuvar sitokinler hepatosteatoza yol açarak hepatoselüler karsinomlara zemin hazırlamaktadır. Tip II Diyabet, toplumun giderek yaşlanmasına ve sağlıksız beslenme tarzına bağlı olarak hızla artan, tedavi edilmediğinde morbidite, mortalitenin yükselmesine neden olan yaygın kronik bir hastalıktır. Günümüzde tedavisi için kimyasal kökenli ilaçların yanında bitkisel ürünler de kullanılmaktadır. Diyabetin bitkisel tedavisinde yaygın olarak kullanılan zeytin yaprağının önemli etken maddesi olan ‘oleuropeinin’ diyabetli bireylerde sıkça görülen kalp yetmezliği, damar tıkanıklığı gibi komplikasyonları önlediği; ayrıca zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin damar içi plak oluşumunu engellediği ve bireylerde kan glukoz seviyesinde anlamlı düşüş sağladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak etki mekanizmaları ile ilgili yeterince bilgi mevcut değildir.

Bu proje ile amacımız zeytin yaprağı ekstrelerinin in vitro hücre kültürü ortamında insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücreleri üzerinde insülin reseptör protein (Irs-1), tirozin kinaz reseptörlerinin, GLUT-4 ve GLUT-2 transport proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkilerini araştırmaktır.

Bu amaçla, zeytin yaprağı %70 metanol, / %30 su karışımı ile ekstrakte edildi ve liyofilizatörde liyofilize edildikten sonra %0.1 dimetilsüfoksit (DMSO) ile çözülerek, total fenol ve flavonoid içerikleri fotometrik yöntem ile belirlendi. Oleuropein konsantrasyonları HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) metoduyla analiz edildi. Analiz sonuçlarından sonra farklı konsantrasyonlarda dilüe edilen zeytin yaprağı ekstraktının farklı konsantrasyonları Hücre kültürü ortamında Hepg2 hücreleriyle muamele edilip 24 saat inkübe edildi. Ardından sitotoksikite testi luminometrik ATP seviyesi tayini ile, reaktif oksijen türleri (ROS) florometrik yöntem ile analiz edildi. Elde edilen hücre lizatlarından IRS-1, Tirozin kinaz, GLUT-4 ve GLUT-2 protein ekspresyon seviyeleri Western Blot tekniği ile analiz edildi. İstatistiksel analizle de deney ve kontrol hücre gruplarının değerlendirilmesi yapıldı.

Zeytin yaprağı ekstraktının düşük konsantrasyonlarda (10µg/ml'ye kadar) proliferatif etki gösterdiği, 10 µg/ml'nin üzerinde doza bağımlı olarak sitotoksik etkinin arttığı, aynı şekilde 10 µg/ml'ye kadar ROS seviyelerinin düştüğü, 10 µg/ml üzerinde doza bağımlı arttığı, ROS ile hücre canlılığı arasında negatif güçlü ilişkinin olduğu tespit edildi. Protein ekspresyon analizi sonucunda zeytin yaprağı ekstresinin glukozun hücre içine girişini sağlayan reseptörlerin ve transport proteinlerin ekspresyonunu artırdığı, maksimum artışın 10 µg/ml dozunda gerçekteştiği görüldü.

Sonuçta, geleneksel olarak kullanılan zeytin yaprağı ekstresinin, hücre içine glukoz girişini sağlayan reseptörler ve transport proteinlerin ekspresyonunu artırdığı, dolayısıyla Tip II Diyabet'in tedavisinde kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Tip 2 Diyabet, zeytin yaprağı, insan karaciğer kanser hücresi, GLUT-2, GLUT4, tirozin kinaz, IRS-1

RESEARCH OF THE IMPACT WHICH OLIVE LEAF EXTRACT CAUSES IN HUMAN HEPATOCELULAR CARCINOMA CELLS THAT INVOLVES TYROSINE KINASE, INSULIN RECEPTOR-1, GLUT4 AND GLUT2 PROTEIN EXPRESSION LEVELS

SUMMARY

Olive tree is one of the most durable tree on earth. The leaf of olive tree have been used by folks in the treatment of various diseases. The reason why olive leaf is commonly used as a supplement in the recovery process of Type II Diabetes and various cancers is because it involves hundreds of antioxidant chemicals. Hyperglycemia in individuals with Diabetes is considered to be beneficial for cancer biology thanks to the molecules in carcinogenes, antiapoptothic mechanisms, cell migration and invasion. Inflammatar cytokines, which formed due to insulin resistance, leads to hepatosteatosi which may cause hepatocelular carcinom after.

Type II Diabetes is a widespread chronic disease that leads morbidity and mortality to rise when the population is getting untreated, increasing rapidly due to the age of the population and the unhealthy diet. Today, both chemical and herbal products are widely used for treatment. 'Oleuropeinin', an important ingredient of olive leaf, prevents complications such as heart failure, vascular occlusion, which are common in diabetic individuals; also phenolic compounds existing in the olive leaf block the formation of intravenous plaque and result in a significant decrease in blood glucose levels of individuals. However, there is insufficient information on the mechanisms of action.

The aim of this project is to investigate the effects of olive leaf extract on the expression of insulin receptor protein (Irs-1), tyrosine kinase, GLUT-4 and GLUT-2 receptor proteins on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells on in vitro cell culture medium.

For this purpose, olive leaf was extracted with 70% methanol / 30% water mixture and lyophilized in lyophilizer and then dissolved with 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO), total phenol and flavonoid contents were determined by photometric method. Oleuropein concentrations were analyzed by HPLC (viability test). After the analysis results, different concentrations of the olive leaf extract diluted and they were treated in HepG2 cell culture medium and incubated for 24 hours. The cytotoxicity test was then analyzed by luminometric ATP level assay and reactive oxygen species (ROS) were analyzed by fluorometric assay. Within the obtained cell lysates; IRS-1, tyrosine kinase, GLUT-4 and GLUT-2 protein expression levels were analyzed by Western Blot technique. Statistical analysis also assessed the experimental and control cell groups.

It was determined that the olive leaf extract has a proliferative effect at low concentrations (up to 10 mg / ml) and it has an increase in cytotoxicity proportionally with dose (after 10mg/ml). Also, ROS levels were decreased until 10mg/ml and then proportionally increases proportionally (after 10 mg/ml) with dose. There was a strong negative correlation between ROS and cell viability. Protein expression

analysis revealed that olive leaf extract promoted the expression of glucose receptors and transport proteins, with a maximum increase of 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

As a result, it has been concluded that the conventionally used olive leaf extract can be used in the treatment of diabetes mellitus. It also increases the expression of receptors and transport proteins that provide glucose entry into the cell.

Key Words: Type 2 diabetes, olive leaf, human hepatocellular carcinoma, GLUT-2, GLUT-4, tyrosine kinase, IRS-1



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Zeytin, dünyanın çeşitli bölgelerinde yaygın olarak bulunan uzun ömürlü bir ağaçtır. Zeytin yaprağı yüz yıllardır kullanılan geleneksel tedaviye katkı sağlayan bitkiler arasında bulunmaktadır. Akdeniz diyetinin önemli bir bileşeni olan zeytinyağı gibi geleneksel tedavi seçenekleri arasında yer alan zeytin yaprağının da, sahip olduğu özellikler nedeniyle modern tıpta günümüzün önemli sağlık problemlerinden olan çeşitli kanserler ve diyabet gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Zeytin yapraklarından elde edilen oleuropeinin oksidatif stres, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar üzerine etkileri oleuropeinin hiperglisemi ve oksidatif stresi inhibe etme potansiyeli olduğu ve oksidatif stresle ilişkili komplikasyonların önlenmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir [1]. Zeytin yaprağının serbest radikalleri nötralize etme yeteneğinin iyi bilinmesi, özellikle reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin insan vücudunda oluşturduğu hasarı azaltan fenolik antioksidan bileşiklere sahip olması, yaşlanma belirtilerini ve hücre degradasyonunu azaltarak birçok dejeneratif hastalığı önleyebilmesi onu geleneksel tedavide tercih edilen bitkiler arasında bulundurmaktadır. Oksidatif hasarın, kalp damar hastalıkları, kanser, diyabet ve diğer kronik hastalıkların riskinde bir artış ile ilişkili olduğu bilinmektedir [2]. Diabetes Mellitus (DM), gelişmiş toplumlarda sıklıkla en sık rastlanılan endokrinolojik hastalıktır. Günümüzde, birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede, epidemik hastalık olarak kabul edilmekte ve çoğu gelişmiş ülkenin, ilk beş ölüm nedeni arasında dördüncü sırada yer almaktadır. DM, genetik ve immün yapının neden olduğu bir seri patolojik olaylar sonucu, pankreas beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun, mutlak veya göreceli azlığı ya da etki gösterememesi sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan, hemen hemen tüm sistemlerde komplikasyonlara neden olan, kronik, hiperglisemik, metabolik bir hastalıktır [3,4]. Diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin; diyabet etiyojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bilinmektedir [5]. Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri esnasında görüldüğü gibi, organizmada bazı yabancı maddelerin (ksenobiyotikler) metabolize

edilmesi sırasında ve organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz bırakılmasıyla da meydana gelebilir. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bunu antioksidanlar aracılığıyla yapmaktadır. Dünya üzerinde farklı bitki türleri üzerinde bu bitkilerin terapötik etkinlikleriyle ilgili birçok araştırma yapılmaktadır. Güneş ışığı ve oksijenin neden olduğu oksidatif stresi kontrol etmek amacıyla bitkilerin antioksidan özellikleriyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır ve yeni antioksidan kaynakları aranmaktadır [6,7].

DM'nin görülme sıklığının ve tedavi masraflarının fazla olması, bunun yanı sıra kesin tedavi yönteminin henüz geliştirilememiş olması onu gündemde olan bir araştırma konusu yapmaktadır. Bu sebeple bu hastalığın tedavisi için birçok araştırma yapılmakta ve yeni tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bazı araştırmacılar yüksek antioksidan içerikli bitkilerin ekstrelerini diyabet hastalığında denemişler ve oksidatif stresi baskılamaya çalışmışlardır. Zeytin yaprağının da bu bağlamda (*Olea europaea L.*) geleneksel antidiyabetik ve antihipertansif bitkisel bir ilaç olduğu ileri sürülmektedir. Zeytin yaprağının güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu hayvan deneyleriyle de gösterilmiştir [8]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda zeytin yaprağının önemli bir etken maddesi olan 'oleuropeinin' diyabetli bireylerde sıkça görülen kalp yetmezliği, damar tıkanıklığı gibi komplikasyonları önlediği; ayrıca zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin damar içi plak oluşumunu engellediği ve bireylerde kan glukoz seviyesinde anlamlı düşüş sağladığı gösterilmiştir. Ancak etki mekanizmalarına dair yeterince bilgi mevcut değildir [8].

Projemiz kapsamında elde edilecek zeytin yaprağı ekstrelerini Hepg2 hücreleri ile muamele ederek, glukoz metabolizmasını etkileyen ve özellikle glukozun hücre içerisine girişini kontrol eden reseptör ve transport proteinler üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Bu çalışma; kontrol ve deney grubu insan hepatoselüler karsinoma hücrelerine çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinin, terapötik etkinlikleri konusunu ve aynı zamanda glukozun hücre içine girişini sağlayan reseptörlerin ve transport proteinlerin moleküler mekanizmalarını anlamamızı sağlayacak ve günümüzde tedavi seçeneklerine dair çeşitli yaklaşımlar olan Tip II Diyabetli hastalar için, zeytin

yaprağı ekstresinin, hücre içine glukoz girişini sağlayan reseptörleri ve transport proteinleri aynı zamanda bunların protein ekspresyonunu ne derece etkilediği hakkında bilgi verecek, medikal tedaviye desteğini de kanıtlayarak gelecekte moleküler düzeyde yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Bu çalışma ile uzun dönemde diyabetli hastaların dışarıdan insülin alma oranları azaltılmaları konusunda yardımcı olacağı düşünölmektedir. Belirlenecek olan uygun dozda zeytin yaprağı ekstreleri sayesinde diyabetli hastalarının medikal tedavilerinin yerine geçmesi öngörölmektedir. Uzun dönemde dışarıdan ithal edilen anti diyabetik ilaçlara bağımlı olan ölkemizde, geleneksel tıpta kullanılan zeytin yaprağının kullanımının modern tıbbın araştırma yöntemleri ile araştırılması optimizasyonunun sağlanması ile diyabet hastalarında antidiyabetik olarak kullanılması yolu ilaç tüketiminin azaltılması, hedeflenen somut yararlar arasındadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diabetes Mellitus Tarihçesi

Diabetes Mellitus (DM), geçmişten günümüze bilinen bir hastalıktır. DM ile ilgili en eski kayıtlar, M.Ö. 1500 yıllarında Mısır'da yazılmış Ebers papirüsünde yer almıştır. Bu papirüste sık idrara çıkmayla seyreden bir durum bulunur. "Diabetes" kelimesini, ilk kez Kapadokya'da M.S. 2. yüzyılda Areteus kullanmıştır. Areteus, diyabeti, idrar miktarında artış, aşırı susama ve kilo kaybının olan bir hastalık olarak tanımlamıştır. 1625 yılında Thomas Willis bu hastaların idrarlarının tatlı olduğunu belirtmek için "mellitus" şeklinde eklemiştir. Hindistan'da Ayurveda'da diyabetli hastaların idrarının tatlı olduğunu bu yüzden böcek, sinek ve karıncaların, bazı insanların idrarını yaptığı yerlere toplandığını belirtmiştir. 1776 yılında Matthew Dobson idrarın tatlı olmasının diyabet hastalarının kanlarındaki ya da idrarlarındaki şeker miktarının artışı yüzünden oluştuğunu kanıtlamıştır [9]. Diyabet hastalarının idrarının tatlı olduğu 17. yüzyılda İngiliz bir doktor olan Thomas Willis tarafından yeniden keşfedilmiştir [10]. Geçmişten günümüze kadar şekerin karaciğerde glikojen olarak depo edilmesinden, insülin elde edilmesi, alfa ve beta polipeptid zincirlerinden oluşup 51 aminoasit içeren yapıda olması ve 3 boyutlu yapısının ortaya konmasına dair birçok yol kat edilmiştir [10].

Hastalığın etiopatogenezi ile ilgili pek çok bilgi ise 1900'lü yıllarda edinilmiştir. Günümüzde immünolojik ve genetik çalışmalar sürdürülmektedir. Yaygın görülen bir endokrin ve metabolik hastalık olan DM, batı toplumlarında önde gelen ölüm nedenlerindedir [3].

2.2 Diabetes Mellitusun Tanımı

DM, hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik bir hastalıktır. Hastalığın ilerlediği sıralarda mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar gelişebilmektedir. Pankreas insülin salgılanmasının yetersizliği, insülin eksikliği veya insülin

molekülündeki yapısal bozukluklar sonucunda oluşan bu hastalık, etiyojisi, genetik ve klinik tablosu ile karmaşık özellikte olan bir sendromdur [3,4]

2.3 Diabetes Mellitusun Tipleri

Diyabet oluşmadan önceki aşamada kişinin kan glikoz değerleri normalin üzerinde görülüp kan glikoz düzeyleri tanı koymak için yeteri kadar yüksek olmadığı durumlarda prediyabetir. American Diabetes Association (ADA) tarafından diabetes mellitus 4 tip olarak sınıflandırılmıştır [11].

Tip 1 Diyabet: Pankreas tarafından vücutta insülin hormonunun üretimini yetersiz ya da hiç olmaması sonucunda gelişen diyabet tipidir. İmmünolojiktir.

Tip 2 Diyabet: İnsülin yetersizliği ile ilişkili ve insülin direnci sonucu gelişen diyabet tipidir.

Gestasyonel Diyabet: Gebelik sırasında gelişen diyabet tipidir. Gebelik sonrası gestasyonel diyabet olan kadınların %5-10'unda Tip 2 diyabet gelişir.

Diğer Tipler: Beta hücre ya da insülin fonksiyonunda genetik bozukluklar, pankreas hastalıkları, endokrin hastalıklar, enfeksiyonlar, ilaçlar ve diğer kimyasal maddelerin neden olduğu diyabet tipleridir.

2.3.1 Tip I Diyabet

İnsüline bağımlı, -İnsulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) - diyabet olarak tanımlanabilir. Bu tip diyabet total veya kısmi insülin eksikliği olarak tanımlanır. Polidipsi, poliüri, zayıflama ve ketoasidoz gibi semptomları gösterir. Hiperglisemi ve ketoasidoz oluşumunu engellemek amacıyla insülin tedavisine gereksinim göstermektedir. Bu tipte pankreasın insülin salgılayan β -hücrelerinin virüs kaynaklı enfeksiyonlar veya otoimmünitedeki değişimlerden dolayı tahrip olduğu gösterilmiştir [12].

Diabetes mellituslu bireylerin yaklaşık % 10-15'i Tip I diyabetiktirler. Semptomlar (örneğin; poliüri, polidipsi ve hızlı kilo kaybı) genellikle akut olarak ortaya çıkar. Diyabetik bireylerde pankreas adacık beta hücreleri kaybı görüldüğü için insülin yetersizliği mevcut olduğundan yaşamlarını sürdürebilmek ve ketozu önlemek için insüline bağımlıdırlar. Genellikle bu hastalık çocukluk ve genç erişkinlikte en fazladır. Yaklaşık olarak % 75'inde hastalık 30 yaşından önce başlar [13].

2.3.2 Tip II Diyabet

Bu tip diyabet daha çok yetişkinlerde görülmektedir bu sebeple, ergin tipi diyabet, sekonder (ikincil) diyabet, insüline bağımlı olmayan diyabet denir. Genellikle orta yaşın üzerindeki yaşlarda görülmeye başlamış olsa da son dönemlerde genç erişkinlerde ve çocukluk çağında da görülmeye başlamıştır [14].

Tip II diyabetli bireylerde 2 grup altında tanımlanabilir. Birincisi; insülinin periferik dokuları etkileme yeteneğindeki azalmadır. Bu azalma insülin direnci olarak isimlendirilir ve bazı araştırmacılar tarafından primer patolojik olay olarak düşünülmektedir. Diğeri beta hücre disfonksiyonudur. Bu, insülin direncini dengelemek için yeterli insülin üretmede pankreasın yetersizliğidir. Böylece hastalıkta önce insülinin göreceli yetersizliği oluşur ve sonra mutlak insülin eksikliği gelişir. İnsülin direnci ve insülin sekresyonundaki temel moleküler bozukluklar çevresel ve genetik faktörlerin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır [13].

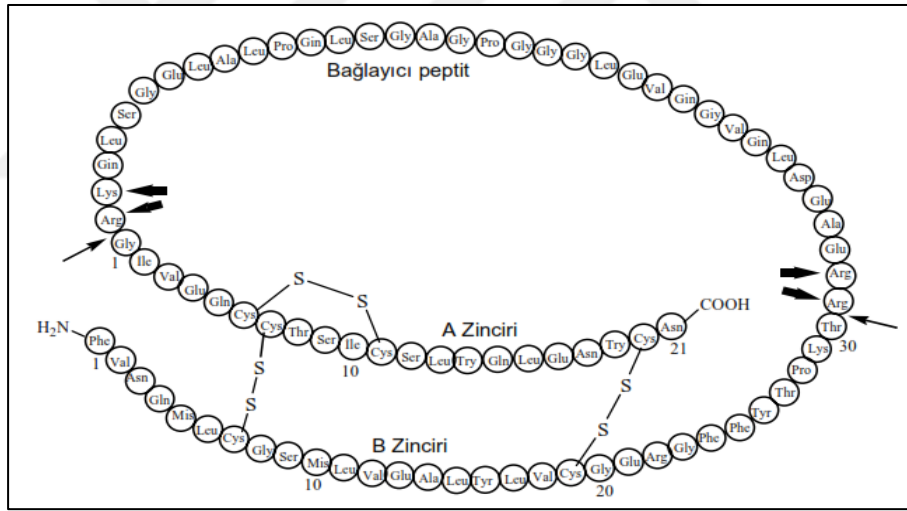
Bu tip diyabette beta hücrelerinde insülin oluşumu, salınımı, depo edilmesi ve beta hücrelerinin sayısı normaldir. Kandaki insülin düzeyi azalmış, normal ya da yüksek olabilir. Asıl bozukluk, insülinin etkilediği hedef hücrelerde insülin reseptör sayısının azlığı ya da hücre içinde postreseptör düzeyde insülin etkinliğinin azalması ve insüline karşı direnç gelişmesinden kaynaklanmaktadır. Bunun sonucu olarak glukoz hücrelere yeterince giremez ve hücrelerde glukoz kullanılmadığından bu tür diyabet gelişir. Az miktarda salgılanan insülin, kan glukozunu normal düzeyde tutmasa da yağları depo edecek düzeydedir. Bu nedenle genellikle kilo artışı vardır. Ağır bir enfeksiyon ya da hastalık durumunda hastalar komaya girebilir [15,16].

2.4 Diabetes Mellitus Belirtileri

- Poliüri
- Polifaji
- Polidipsi
- Yorgunluk
- Kuru ve kaşıntılı cilt
- Bulanık görme
- Sık sık enfeksiyon gelişmesi
- Ellerde ve ayaklarda uyuşma [17,18,19]

2.5 İnsülin Yapısı

İnsülin, vücuttaki bütün dokuları etkileyen glukoz, amino asitler, lipidler gibi besin maddelerinin hücre içinde tutulup depolanmasını sağlayan ve hemeostazına katkıda bulunan antikatabolik bir hormondur. İnsülin, pankreas langerhans adacıklarında bulunan hücrelerde üretilir ve ada içerisinde yaklaşık olarak %70 oranında bulunur. İnsülin A ve B polipeptid zincirinden oluşmuş 51 amino asit içeren bir yapıya sahiptir. A7, B7, A20 polipeptid zincirlerini B19 zincirine bağlayan, iki disülfid köprüsü ile birleşmiştir. Üçüncü bir zincir içi disülfid köprüsü ile de A zincirinde 6. Ve 11. Amino asitleri birleştirir. A ve B zincirinde sırası ile 21 ve 30 amino asit yer almaktadır. İnsan insülini geni, 11. Kromozomun kısa olanında yerleşmiştir. Molekül ağırlığı 5808 daltondur. Domuz insülinini insan insülininden, B zincirinin C terminalinde threonin yerine alanin geçmesiyle farklı iken, sığır insülini 3. amino asidin pozisyonuyla farklıdır [20,21]. Proinsülin zincir yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir [22].



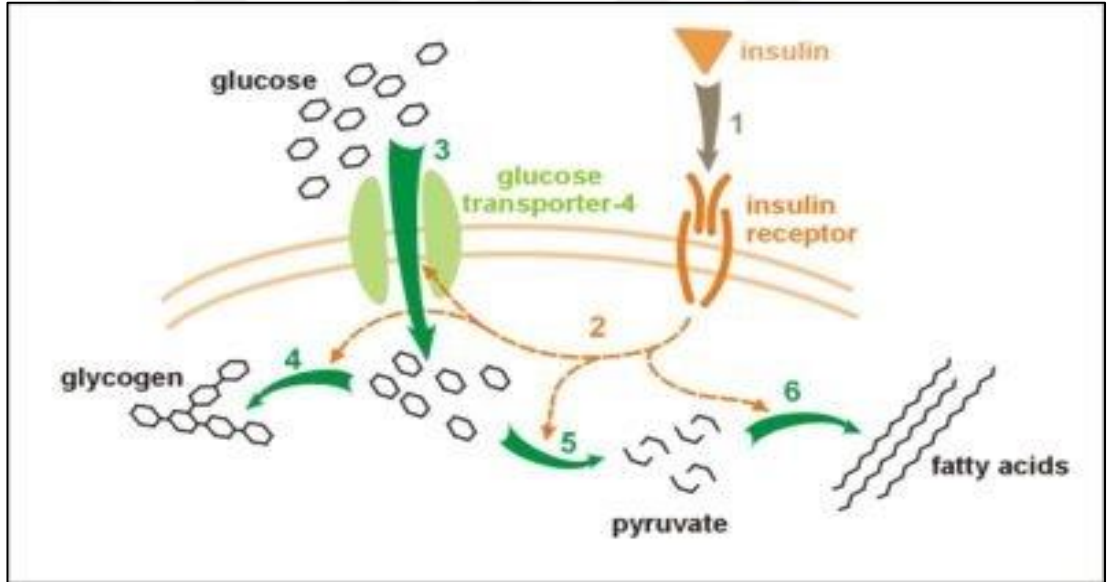
Şekil 2.1 : Proinsülin zincir yapısı.

2.5.1 İnsülin reseptörü ve etki mekanizması

İnsülinin çizgili kas, miyokard, karaciğer ve yağ hücrelerinde kendine özgü spesifik reseptörleri vardır. İnsülin reseptörü hücre membranında bulunur. Aminoasit transport sistemiyle veya glukoz transport sistemiyle bağlıdır. Bu reseptör uyarıldığı zaman glukoz, aminoasitler hücre içine girer. İnsülin reseptörü, iki alfa ve iki beta alt ünitesinden oluşur. İki alfa alt ünitesi membranın dış yüzüne bakar, hormonu tanıma bölgesidir. İki beta alt ünitesi ise membrana gömülmüş şekildedir, tirozin protein kinaz aktivitesine sahiptir. İnsülin dış yüzdeki alfa ünitelerine bağlanır, internalize

edilir, kinaz aktivitesi uyarılır. Kinaz aktivitesi, reseptör proteinini ve hücre içi diğer proteinleri fosforile ederek aktivitelerini değiştirir ve böylece biyolojik cevapları oluşturur [23].

İnsülin reseptörünün fosforilasyon substratları olarak çeşitli intraselüler proteinler tanımlanmıştır. Üzerinde en çok çalışılmış olan insülin reseptör substratı 1 veya IRS-1'dir. Fosforilasyon sonucu IRS-1 aktive edildiğinde birçok olay tetiklenir ve diğer enzimlerin de aktivasyonu sonucu insülinin etkileri oluşturulur [24]. IRS-1 aktif hale geçince, fosfoinozitol-1,3-kinaz'ı aktifleştirir. Bunu sonucunda GLUT-4 glukoz taşıyıcısı transloke olur ve glukoz hücre içine alınır Böylece GLUT-4'ler hücre içindeyken translokasyon sonucu membrana yerleşirler. Tirozin kinaz aktivitesi ile başka pek çok protein/enzim de aktive edilir. Çekirdekdeki transkripsiyon olayları tetiklenir. İnsülin reseptör etki mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmiştir [25,26].

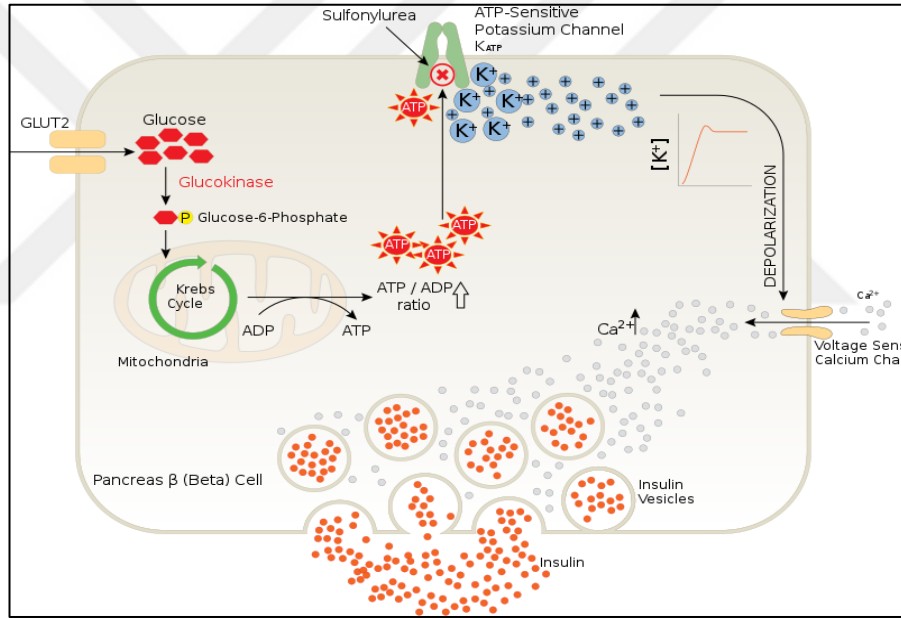


Şekil 2.2 : İnsülinin glukoz metabolizmasına etkisi.

2.5.2 İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine etkileri

İnsülinin en iyi bilinen etkisi plazma glukoz konsantrasyonunu azaltmaktır. İnsülin glukozun çizgili kaslar, miyokard ve yağ dokusu hücreleri içine girişini artırır. Hürelere glukoz girişi kolaylaştırılmış difüzyon olayı ile (GLUT-4 taşıyıcısı kullanılarak) olur. İnsülin translokasyon yaptığı gibi, taşıyıcı moleküllerin sayısında da artmaya neden olur. GLUT-1 ve GLUT-2 nin de insülinle uyarıldığını bilinmektedir. Glukozun hücre içine alınmasından sonra bir takım mekanizmalarda

kullanılmasını sağlar. Hücre içine giren glukoz, heksokinaz enzimi tarafından fosfatlanır. Oluşan glukoz-6-fosfat hücre membranından geçemediği için dışarı çıkamaz. İnsülin bu maddenin glikoliz yolağı üzerinden laktik asite kadar yıkılmasını hızlandırır. Ayrıca glukoz-6-fosfataz enzimini inhibe ederek bu maddenin glukoz dönüşümünü inhibe eder. Ayrıca bu maddenin gliseraldehit-3-fosfat (gliserol fosfat)'a dönüşümünü stimüle eder. Bu madde lipit metabolizması açısından önemli. Bu maddenin (glukoz-6-fosfat'ın) glukuronik asit yolağında önce uridindifosfoglukoz (UDPG)'a dönüştürülmesini ve daha sonra glikojen sentaz enzimini indükleyerek (sentezini, miktarını arttırarak) glikojen oluşumunu stimüle eder. Glikojenez olayını artırır. İnsülin glikojen yıkılması olayı (glikojenoliz)'ni inhibe eder (amaç glikozu glikojen deposu şeklinde tutmak). İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine etkileri Şekil 2.3'te gösterilmiştir [27].



Şekil 2.3 : İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi.

Bu olay katekolaminler, glukagon, glukokortikoidler ve büyüme hormonu tarafından aktive edilir. İnsülin bu hormonların bu etkisini inhibe eder. İnsülin glukoneogenezi, yani aminoasitlerden glukoz yapımı olayını azaltır. Bütün bu etkiler kan glikozunu azaltıcı etkiye katkıda bulunur [28].

2.6 Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi

Diyabetli hastaların %90-97'sini Tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde diyabet prevalansının hızla artacağı düşünülmektedir. World Health Organization (WHO) verilerine göre diyabetik hasta sayısı Hindistan'da günümüzde 19 milyon iken 2025 yılında 57 milyona, Çin'de 16 milyondan 38 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. Pakistan, Endonezya ve Meksika'da bu anlamda önemli artışların görüleceği ülkelerdendir. Bu artış doğrultusunda DM dünyanın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir [29]. 2003 Ulusal Hastalık Yükü ve Maliyet Etkililik (UHY-ME) Çalışması Hane Halkı Araştırmasında diyabet insidansı toplamda yüzde 3820, erkeklerde 3210.2 ve kadınlarda 4280.1 olarak bulunmuştur. Türkiye'de ulusal düzeyde ölüme neden olan ilk 10 hastalığın yüzde dağılımı incelendiğinde diyabet %2.2 ile 8. sırada yer almaktadır. Diyabet tüm yaş gruplarında %1.9 ile ulusal düzeyde sakatlığa uyarlanmış yaşam yıllarına neden olan 12. hastalıktır [29].

DM'nin prevalans ve insidansı, coğrafi bölge, ırk ve yaşa göre farklılıklar göstermektedir. Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) 2002 yılında ülkemizde Tip 2 DM prevalansını %7,2; Glukoz Tolerans Bozukluğu (GTB) prevalansını ise %6,7 olarak açıklamıştır [30]. TURDEP II çalışma sonuçlarına göre Türk erişkin toplumunda diyabet sıklığının %13.7'ye ulaştığı görülüp 12 yılda diyabet sıklığı %90 artmıştır [31]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; 2009 sonu itibari ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında tüm dünyadaki diyabetli birey sayısının 438 milyona ulaşacağı düşünülmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde ise bu oranın tüm diyabetlilerin %80'inden fazla olacağı yönündedir. Bu sayının %90-95'i Tip II, yani insüline bağımlı olmayan diyabettir [32].

2.7 Fitoterapinin Tarihçesi

M.Ö. 3000 yıllarında Mezopotamya'dan Hititlere, Grek uygarlığından Roma Bizans uygarlığına, İslam ve Selçuklu uygarlığından Osmanlı uygarlığına kadar birçok tıp adamı yetişmiş ve çeşitli bitkisel yöntemler kullanmışlardır. Çağdaş tıp döneminde, tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) yöntemleri kullanımı gelişmekte olan ve endüstrileşmiş birçok ülkede artmıştır. '*Fitoterapi* (phytos=bitki, therapy=tedavi)', doğal bitkileri kullanarak hastalıkları tedavi etme yöntemidir. Bitkiler insanların

hayatı için ve hastalıkların tedavisinde kullanımları sebebiyle önemli canlılardır. Besin, yakacak ve giyecek elde etmede insanlar bitkilerden büyük ölçüde yararlanmışlardır [33]. Ülkemizdeki sıklığı bilinmemekle birlikte çok sayıda hasta tıbbi tedavilerin yanı sıra bitkisel tedavilere de başvurmaktadır [34]. Bitkilerin kimyasal ve biyolojik etki zenginliğinden “insan sağlığı” için akılcı bir şekilde yararlanılabilmesi önemlidir. İzole edilen saf bileşen tedavide kullanılabilir. Bitki ekstraktları içerisinde bileşenlerin “Ekstre” halinde sinerjistik/antagonistik etkileşmelerle, terapötik etkileri artabilir, yan etki profili azaltılabilir. Bu tip formülasyonlar kullanılarak daha etkin ve sürekli tedavi cevabı sağlanabilmesi mümkün olabilmektedir [35].

2.7.1 Fitoterapi tedavisi ve seçenekler

Tamamlayıcı ve alternatif tedaviler (TAT), Amerikan Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi tarafından “standart tıbbi tedavilerin dışında kalan çeşitli sağlık bakım sistemleri, uygulamaları ve ürünleri” olarak tanımlanmaktadır. Alternatif tıbbin amacı, hastalığı meydana getiren genetik, sosyal, çevre, iş faktörleri ve organdaki bozukluktan etkilenen diğer organsal fonksiyonel değişiklikleri bunun oluşturduğu psikolojik ve ruhsal farklılaşmaları birlikte değerlendirerek bunlara çözüm aramaktır [36].

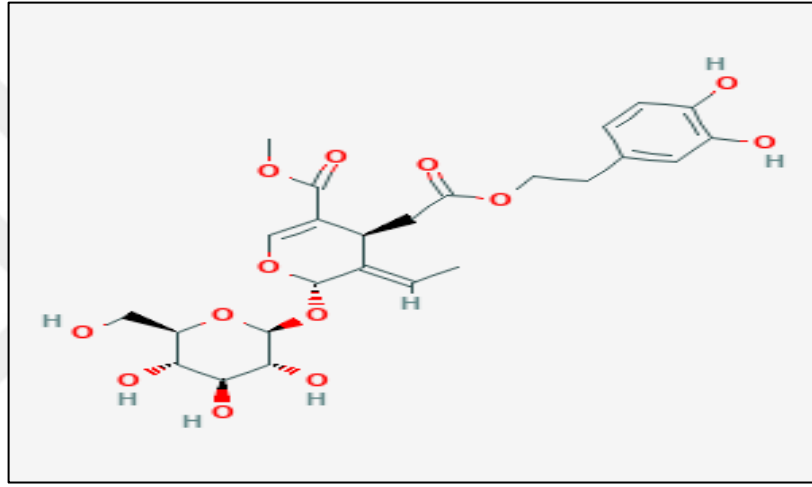
2.8 *Olea europae* L.’nin Bilimsel Sınıflandırılması

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Lamiales
Familya	: Oleaceae
Cins	: Olea
Tür	: O. Europae
Binominal adı	: <i>Olea europaea</i> L.

2.8.1 Oleuropein

Zeytin meyvesinin ilk dönemlerinde meyvede daha fazla bulunan, olgunlaşmanın ilerlemesi ile zamanla metabolize olarak miktarı azalan ve meyveye acılık veren bir maddedir [37,38,39,40]. Zeytin yaprağında en çok bulunan biyoaktif bileşik oleuropein ve rutindir. Oleuropein doğada en yoğun olarak zeytin yapraklarında bulunmaktadır [1,37,38,39,40,41].

Oleuropein ilk kez 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından tespit edilmiştir [8]. Yapısı ise 1960 yılında tanımlanabilmiştir. Oleuropein molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir [8,42].



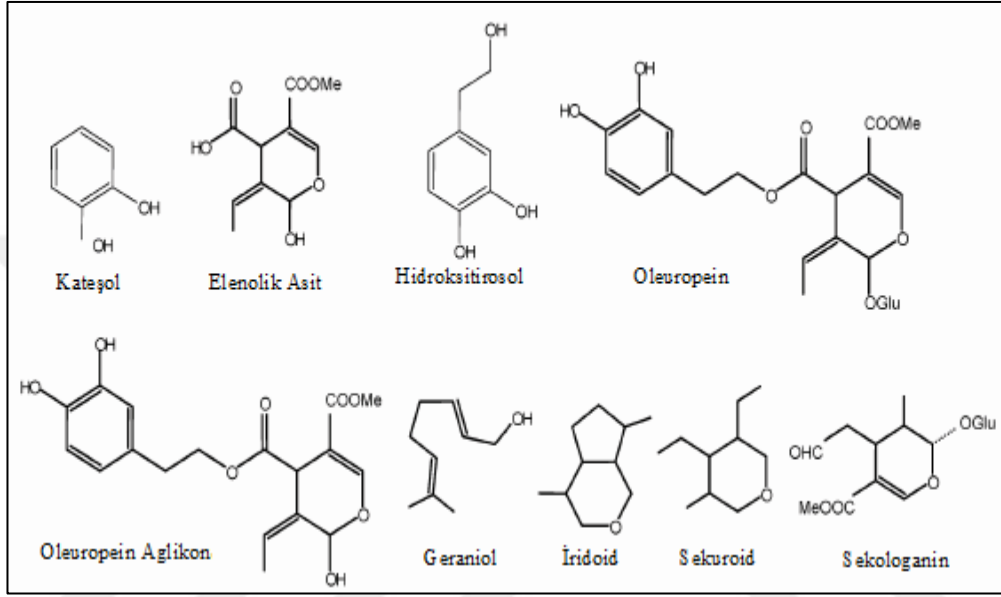
Şekil 2.4 : Oleuropein yapısı.

Oleuropein;

- Antimikrobiyal
- Antioksidatif
- Antiatherojenik
- Yüksek antioksidan potansiyeli
- Hipotansif aktivitesi (Kan basıncını düşürücü)
- Antienflamatuvar etkisi (5- lipoksigenaz enzimini inhibe ederek)
- Kardiyoprotektif (LDL oksidasyonu inhibisyonu ve trombosit-kan hücresi aggregasyonu)
- Hipoglisemik (Kan şekeri düşürücü)
- Antihipertansif (Vasodilatator-hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar)

- Antiviral (HIV vürüsüne karşı etkili)
- Stostatik (McCoy hücrelerine karşı)
- Mollusisidal (Salyangozlara karşı olan toksik etki)
- Endokrinal-hormonal
- Enzim modülatörü [43].

Oleuropein ile ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.5'te gösterilmiştir [44].



Şekil 2.5 : Oleuropein ile ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları.

2.8.2 Zeytin yaprağının tıbbi özellikleri

Zeytin yaprakları tanen, uçucu yağ, organik asitler ve rezin taşır. 1960 yılında, Panizzi ve arkadaşları acı bir glikozid olan oleuropeini zeytin yapraklarından izole etmişlerdir. Daha sonra bu maddenin bir fenolik bileşik olduğu iridoid gruba ait olduğu göstermişlerdir [45]. Bu ayrıca zeytinde de mevcuttur. Oleuropein zeytin ağacında, yaprakta, tomurcukta, meyvede, odunda ve ağaç kabuğunda da bulunmaktadır. Zeytin yaprakları ortalama her gramında 60-90 mg (kuru ağırlık) oleuropein içermektedir. İlâveten önemli seviyede içerdiği elenoik asidin glikozidik esteri ve hidroksitirizol, oleuropein ve onun hidrolize ürünleri olan oleuropein aglycone, elenoik asit, beta-3,4 dihidroksifenetil alkol ve metil-o-metil elelonat, biyolojik olarak ilgi çeken moleküllerdir [29].

2.8.3 *Olea europaea L*'nin antioksidan aktivitesi

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri; detoksifikasyon, kimyasal sinyalizasyon, enerji gereksinimi ve bağışıklık fonksiyonları için gereklidir. Onlar sürekli olarak insan vücudunda üretilir ve SOD, GPx ve CAT gibi endojen enzimler tarafından kontrol edilir. Bu reaktif türlerin aşırı bir üretim olursa, dış oksidant maddelere maruz kalma ya da savunma mekanizmasında anormal bir durum ve çeşitli biyomoleküllerde (DNA, lipidler, proteinler) hasar meydana gelebilir. Bu hasar kardiovasküler, kanser ve diğer kronik hastalıkların artan riskiyle ilgilidir. Antioksidanlar bu hasarı önlerken, aynı zamanda diyetle alınan antioksidanların artışı kronik hastalıkların riskini düşürür. Kardiovaskular hastalıklara ve belli kanserlere karşı sebze ve meyvelerdeki zengin diyetlerin koruyucu etkileri kısmi olarak antioksidanlara bağlıdır [8].

2.8.4 *Olea europaea L*'nin fenolik madde içeriği

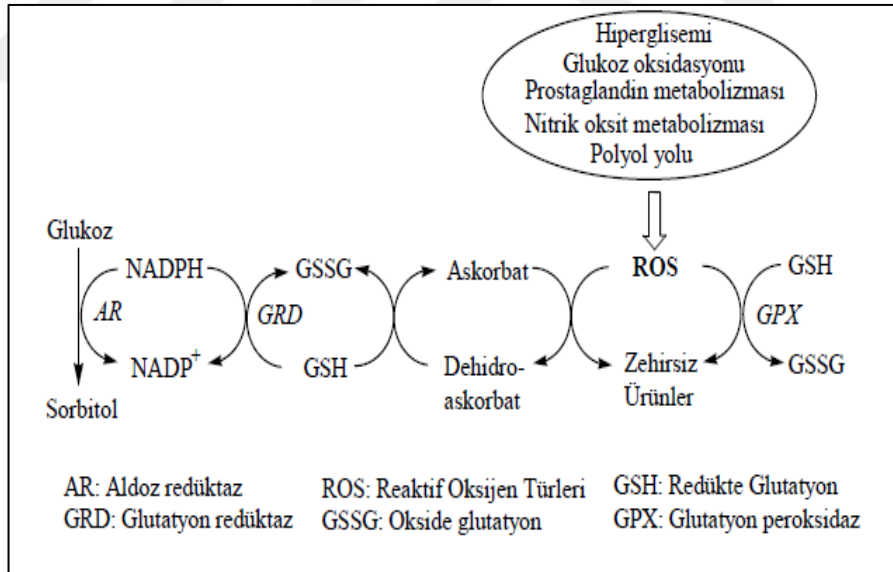
Yapılan çalışmalarda zeytin yaprağı ekstraktında bulunan temel fenolik maddelerin oleuropein ve onu takiben hidroksitirosol olduğu belirlenmiştir [8]. Zeytin yaprağı ekstraktında belirleyici fenolik maddenin oleuropein olmasına rağmen oleuropeinin saf haldeki antioksidan kapasitesi sınırlıdır. Ancak zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan kapasitesi güçlü bir antioksidan olan hidroksitirosol ile yakın, C ve E vitamininden ise çok daha yüksek düzeydedir. Bu durum iki farklı şekilde açıklanabilir [8].

1. Oleuropein ekstrakt içerisinde kendisinden çok daha güçlü olan hidroksitirosole parçalanmaktadır ve ekstraktın toplam antioksidan kapasitesini yükseltmektedir.
2. Ekstrakt içerisindeki fenolik maddeler sinerjistik etki göstermektedir. Zeytin yaprağındaki fenolik maddeler ve miktarları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1 : Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik maddelerin miktarları.

Fenolik Maddeler	% miktar (kuru temel)	TEAC (mM)
Ekstrakt	-	1,58 ± 0,06
Oluropein	24,54	0,88 ± 0,09
Hidroksitirosol	1,46	1,57 ± 0,12
Luteolin-7-glukosit	1,38	0,71 ± 0,04
Apigenin-7-glukosit	1,37	0,42 ± 0,03
Verbaskosit	1,11	1,02 ± 0,07
Tirosol	0,71	0,35 ± 0,35
Vanilik asit	0,63	0,67 ± 0,09
Diosmetin-7-glukosit	0,54	0,64 ± 0,09
Kafeik asit	0,34	1,37 ± 0,08
Luteolin	0,21	2,25 ± 0,11
Rutin	0,05	2,75 ± 0,05
Diosmetin	0,05	1,42 ± 0,07
Vanilin	0,05	0,13 ± 0,01
Kateşin	0,04	2,28 ± 0,04

Diyabette oksidatif stresin artış metabolizması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

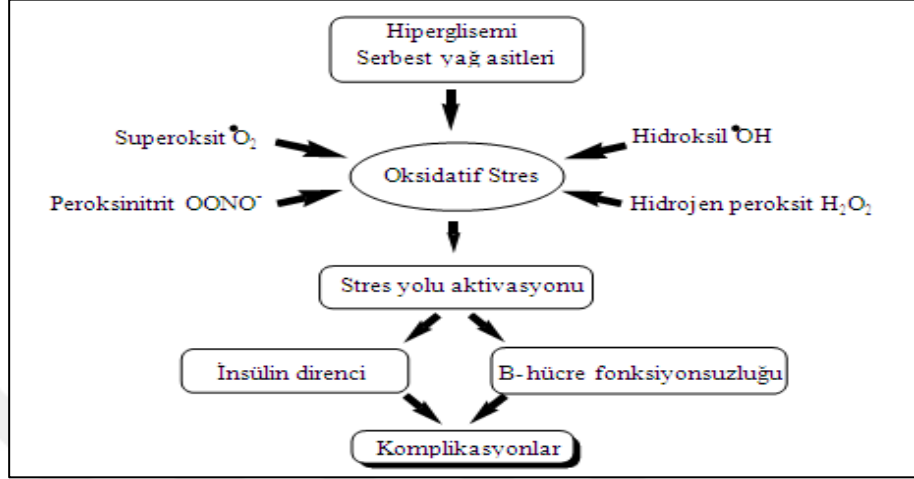


Şekil 2.6 : Diyabette oksidatif stresin artış metabolizması [46].

Metabolik stres oksidatif olayların artmasına neden olmaktadır. Diyabet komplikasyonlarının gelişimini kolaylaştıran bu durum, yapısal ve fonksiyonel hasarı oluşturmaktadır. Normalde çok düşük olan HbA1C düzeyinin kan konsantrasyonu, yüksek kan glukozu ile seyreden kişilerde total hemoglobinin %12 kadarına veya

daha üzerine çıkabilmektedir. Ortalama eritrosit ömrü 120 gün olduğundan HbA1C düzeyleri son dört aylık süreyi kapsayacak şekilde dolaşımdaki kan şekeri düzeyi için iyi bir gösterge olmaktadır [47,48].

Oksidatif stresin hiperglisemi ile bağlantısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir [47].



Şekil 2.7 : Oksidatif stresin hiperglisemi ile bağlantısı.

Hiperglisemideki aşırı oksidatif stresin vasküler duvarlarda ve plazmada lipid peroksidasyonunu artırmasıyla aterosklerozis oluşumu arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca diyabette vasküler ve diğer komplikasyonların sebebi olarak sigara, hipertansiyon ve dislipitemi gibi faktörler gösterilmektedir. Bazı araştırmacılar bu risk faktörlerinin oksidatif stresi artırarak diyabetin patofizyolojisine ve komplikasyonların gelişimine katkıda bulunduğunu bildirmektedirler [48].

2.8.5 *Olea europaea L.*'nin antidiyabetik ve hipoglisemik etkisi

Zeytin yaprakları, antidiyabetik ve antihipertansif bir bitkisel ilaç olarak bilinir [49]. Aynı zamanda diyabetik hiperglisemi, hipertansiyon ve bulaşıcı hastalıkları tedavi etmede kullanılır, hipertansiyon ve diyabet için geleneksel bir tedavi olarak tanımlanır [50]. Diyabette oleuropeinin hipoglisemik etkisini açıklamak için iki mekanizma ileri sürülmektedir [2].

1. Glukoz kaynaklı insülin salınımını etkileme potansiyeli
2. Periferik glukoz alınımını artırma etkisi

Alloxan ile diyabet oluşturulan tavşanlarda oleuropeinin antioksidan ve hipoglisemik etkileri incelenmiştir. Tavşanlar 16 hafta boyunca oleuropein ile tedavi edilmiş. Tedaviden sonra oleuropein ile tavşanların kan glukoz seviyelerinin önemli bir şekilde azalttığı ve oleuropeinin diyabet ve hipoglisemiyi engellemede faydalı olabileceğini belirtilmiştir [2].

Diyabetik ratlara yemlendikten sonra zeytin yaprağı ekstresi verilerek kan glukozundaki değişimleri incelenmiş ve hem luteolin hem de alealonik asitin yemlenme sonrası diyabetik ratlardaki kan glukozunun artmasını engellediğini tespit edilmiştir [50].

2.9 İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinin Özellikleri

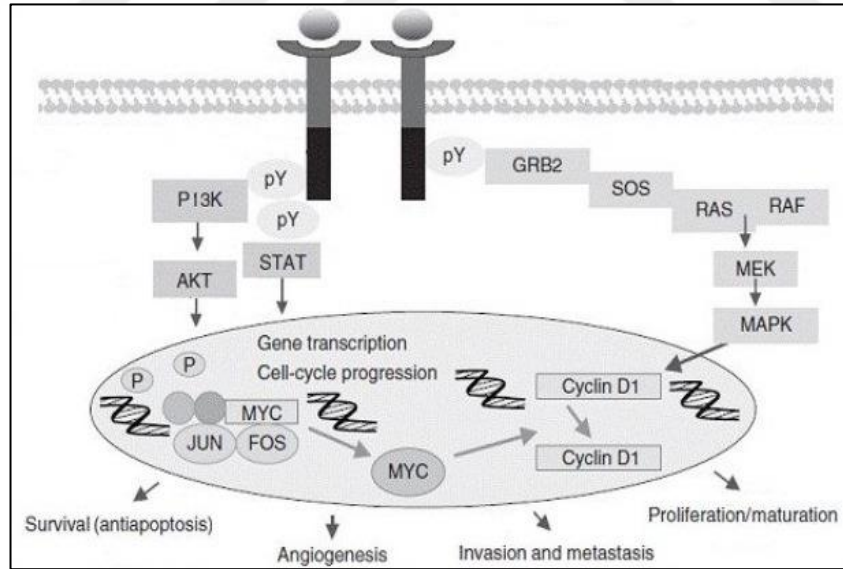
Hepg2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücre hattı, Amerika’da bulunan beyaz ırka sahip 15 yaşında erkek bireyin farklılaşma gösteren hücelere sahip olan hepatoselüler karsinoma örneğinden hazırlanmıştır. Hepg2 hücrelerinin diğer hücre hatlarına göre kültüre edilmesi daha kolay olduğu için oldukça avantajlı yönleri bulunmaktadır. Aynı zamanda bu yönleri nedeniyle in vitro modellemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajlı yönlere bakılacak olursa; biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, metal ve organik bileşiklere maruz kaldığında metalotiyonin (MT) oluşturması, yüksek-düşük yoğunluklarda lipoproteinlerin sentezlenmesi, serumsuz besiyerinde üretilmesi durumunda ise karaciğere özel çeşitli serum proteinlerini üretebilmesi, sitokrom p450 (CYP450)“ ye bağımlı monooksijenaz enzimlerine sahip olması ve glukuronat-sülfatla birleşme tepkimelerini gerçekleştirebilmesi sonucu 14 detoksifikasyon işlemlerinde gerekli olan normal biyotransformasyon etkinliklerinin çoğunu yapmakta ve dolayısıyla in vitro toksisite modellemesi olarak yaygın kullanılmaktadır [51]. Hepg2 hücreleri birçok bitki sitotoksitesisi araştırmalarında da kullanılmıştır [52-53]. Bu çalışmada karaciğer kanser hücrelerinde insülin transport proteinleri olan Glut tiplerinin çoğunun çalışılabilmesi ve daha çok hücre soyu üretilmesi gibi özellikleri nedeni ile Hepg2 hücreleri kullanılmıştır.

2.10 Kanser ve Diyabet İlişkisi

Diyabet ve kanser tüm dünyada yüksek ölçüde mortalite ve morbidite oranları olan en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Diyabete benzer şekilde kanser prevalansı da gün geçtikçe artmaktadır ve mortalite sıralamasında 2. basamakta yer almaktadır [54]. Geçmişten günümüze yapılan tüm çalışmalar, diyabet ile kanserin ortak patogenetik mekanizmaları olduğunu ve diyabetli bireylerde sağlıklı bireylere oranla bazı kanser tiplerinin daha sık görüldüğünü desteklemektedir. Bunun yanında diyabet tedavisinde kullanılan bazı ajanların da kanser riskini arttırdığına dair bulgular mevcuttur. Her iki hastalık arasındaki ilişkiye dair ilk bulgu 1934'te diyabetli hastalarda pankreas kanseri sıklığının diyabet olmayan bireylere kıyasla daha yüksek olduğunun fark edilmesi ile elde edilmiştir [55]. Sonrasında çeşitli klinik ve epidemiyolojik araştırmalarda diyabetli bireylerde çeşitli hematolojik malinitelerin riskinde artış görülmüştür. Risk artışının pankreas, karaciğer ve endometrium kanserinde en yüksek olduğu belirlenmiştir. Birçok epidemiyolojik çalışmada, tip 2 diyabetin hepatoselüler karsinoma gelişme riskini 2-3 kat arttırdığı gösterilmiştir [56,57]. Risk hepatit C ve hepatit B'li olgularda en yüksek olarak belirlenmiştir [58,59]. Karaciğerin ven yoluyla endojen insüline en fazla maruz kalan organlardan biri olması, hiperinsülinemi durumunda uyarılan insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)'in karaciğerde hücrel proliferasyonu artırarak apoptozu inhibe etmesi ve karsinogenezi tetiklemesi nedeniyle gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalar bulunmaktadır [60,61]. Hipergliseminin karsinogenezde rol oynayan anahtar yollardaki moleküller (epidermal büyüme faktörü, protein kinaz C, peroksizom proliferatör-aktive reseptörler, siklin-bağımlı kinaz 2), antiapoptotik mekanizmalar, hücrel migrasyon ve invazivlik (E-kaderin, reaktif oksijen radikalleri, çinko) üzerinden kanser biyolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir [62]. Bunun yanında insülin direnci sonucu ortaya çıkan inflamatuvar sitokinler hepatosteatoza yol açarak HCC'ye zemin hazırlamaktadır [63]. Ayrıca diyabet tedavisinde kullanılan insülin salgılatıcı bazı antidiyabetik ajanların kanser riski oluşturduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Yakın zamanda yayınlanan ve sülfonilürelerin kullanıldığı 18 çalışmayı içeren bir analizde sülfonilüre kullanımının kanser riskini arttırdığı belirtilmiştir [64]. Bununla birlikte, çalışmaların bazılarında insülin direnci üzerinden etki gösteren oral antidiyabetik ajan olan metforminin insülin-duyarlılaştırıcı ajanlar dışındaki diğer antidiyabetiklere kıyasla kanser riskini azalttığı bildirilirken, bazı çalışmalarda da etkisi olmadığı belirtilmiştir [65,66,67].

2.11 Tirozin Kinaz

Tirozin Kinaz (TK), protein fosforilasyonunu sağlayan protein kinaz ailesine mensup bir enzimdir. Kinazlar yoluyla proteinlerin fosforilasyonu, sinyal iletim mekanizmasında önemli rol oynar. Sinyal iletimi hücrelerin çoğalması ve apoptozisi gibi işlevleri kontrol ettiğinden, burada meydana gelen değişimler kanser gelişiminde ve metastazlarda önemli rol oynar. TK'lar buldukları yere göre 2 gruba ayrılır; membran yerleşimli (reseptör) ve sitoplazmik yerleşimli (non-reseptör). Membranda yerleşenlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denir. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri reseptörleri ve efrin reseptörleri örnek gösterilebilir [68]. Bilinen yaklaşık 2000 kinaz arasında, 90'dan fazla TK insan genomunda bulunmaktadır. Bunların hücresel aktivitelerde (büyüme, diferensiyasyon, metabolizma, adezyon, motilite, ölüm vs.) önemli rolü vardır. Birçok RTK, gen mutasyonu veya kromozom translokasyonu nedeniyle değişime uğrayarak kanser gelişimde etkin rol oynar. Bu patolojik durum kısaca aşırı-ekspresyon olarak da tanımlanabilir [69]. Sinyal iletim mekanizmasında tirozin kinazın rolü Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 : Sinyal iletim mekanizmasında tirozin kinaz rolü.

2.12 Antioksidan Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasitesini ölçmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir [70]. Bu yöntemlerde antioksidan kapasite (AOK); reaksiyon termodinamiği ile ölçülürken antioksidan aktivite (AOA); reaksiyon kinetiği oranı ile ilişkilendirilerek ölçülür. Bu metotların en geniş kabul gören sınıflandırma şekli hidrojen atomu transfer (HAT) temelli ve elektron transfer (ET) temelli analiz yöntemleridir [71]. HAT temelli yöntemler genel olarak azo bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan rekabetli reaksiyonlardır. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgenme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. [70]. HAT reaksiyonları; çözücü, pH etkisinden bağımsızdır ve kısa bir sürede gerçekleşir. ET reaksiyonları; çözücü, pH'a bağlı olarak ve daha yavaş şekilde gerçekleşirler [72].

2.12.1 Difenil pikril hidrazil (DPPH) yöntemi

Bu metot ilk olarak Brand-Williams ve arkadaşları tarafından 1995 yılında geliştirilmiştir sonrasında yapılan çalışmalarda Sanchez ve arkadaşları tarafından 1998 yılında farklı olarak kullanılmaya başlanmıştır [73]. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir [74]. DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri ekstraktların antioksidan içeriğini ölçmede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [75]. Bu yöntem de temel olarak antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına sebep olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabit olana kadar takip edilmesi prensibine dayanmaktadır [70]. DPPH radikali metanolik çözeltide okside formunda yaklaşık 520 nm'de en yüksek absorbansa sahip bir kimyasaldır. Bu yöntem basit, hızlı ve birçok örneğin radikal süpürme aktivitesini gözlemlemek için farklı örneklerin çözünürlüklerine elverişli bir metot olarak belirlenmiştir. Ancak ışığa, oksijene ve kirliliğe olan hassasiyeti bu metodun kullanımında sınırlamalara sebebiyet vermektedir [75].

2.12.2 Kuprak yöntemi

Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (KUPRAK) Yöntemi İlk olarak Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Temelde 2,9- dimetil-1, 10-fenantrolin (Neokuproin Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de en yüksek absorbans veren bakır (I)- neokuproin (Cu(I)-Nc)'e indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır [76]. KUPRAK yönteminin toplam antioksidan kapasite (TAC) analizinde diğer transfer yöntemlerinden ayırıcı avantajı kolay pH ayarlaması, rejanların kolay kullanılabilmesi ve stabil olması, düşük maliyetli ve basit olması, hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara da uygulanabilmesidir [71].

2.12.3 Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi

Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC veya ABTS) Yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından gösterilmiş [77] olup daha sonra yapılan çalışmalarla Re ve arkadaşları tarafından da geliştirilmiştir [78]. TEAC analizi 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanır. TEAC'ın karakteristik dalga boyu 660, 734 ve 820 nm'de en yüksek absorbansı yapar [79]. Radikal katyon formunda üretilen ABTS, temel spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için uygulanır. Deneyle renksiz sıvı potasyum persülfid ile ABTS'nin oksidasyonu aracılığında ABTS'deki renk üretimini içermekte olup hem lipofilik bileşenlere hem de hidrofilik bileşenlere uygulanabilir. ABTS çözeltisi seyreltilir ve 10 dakika içinde absorbansı ölçüldükten sonra 1 ml çözeltiler ile farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların ilk hazırlanan karışımları ölçülür. Trolox, vitamin E'nin suda çözünen kısmı olup referans standart olarak kullanılır. Analiz bitkilerin antioksidan özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır [73].

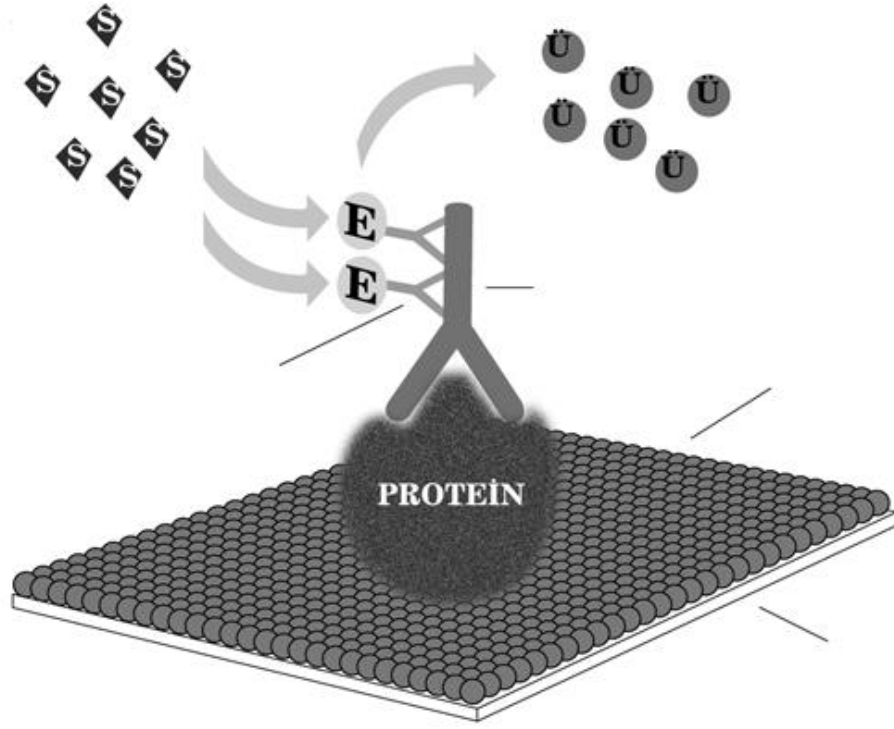
2.13 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Son zamanlarda yeni kolon dolgu maddelerinin geliştirilmesiyle HPLC metodu biyomoleküllerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylece birçok molekülü yapısal ve işlevsel olarak analiz etmek için biyomoleküller kısa sürede

saflaştırılmaktadır. Günümüzde HPLC'nin modern olarak kullanılan sıvı kromatografilerine göre önemli üstünlükleri bulunmaktadır. Kolonları yeniden doldurulmadan ve yenilenmeksizin sürekli kullanılabilmesi, tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olması, verilerin analizinin kolaylıkla otomatikleştirilmesi; büyük boyutlardaki ayırım süreçlerine uygulanması sebebiyle diğer klasik yöntemlere göre, ayırıştırma ve analiz hızı oldukça yüksektir [80].

2.14 Western Blot Tekniği

1979 yılında Towbin ve arkadaşları tarafından bulunan bu tekniğe protein blotlama ya da Western blotlama ismi verilmiştir. “Western blot” ya da “Immunoblot” tekniği, antikor tespitinin özgüllüğü ile jel elektroforezinin çözünürlüğünü bir araya getiren bir yöntemdir. Blotlama tekniği, bir antijenin moleküler ağırlığı, varlığı ve miktarı, antijen izolasyonunun etkinliği gibi protein antijenlerinin önemli özelliklerini belirlemede kullanılabilir. Kompleks bir örnek içerisinde düşük miktardaki proteinlerin tespit edilmesi ya da protein sentezi görüntülenmesi için kullanılır. “Western blot”, protein karışımının jel elektroforezi ile ayırıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transfer edilmesi prensibine dayanır. Protein spesifik olarak işaretli antikor veya antijenle reaksiyona girmektedir. Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Bu yöntem ile spesifik bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve işlenmiş ürünlerden izoformların ayırımı mümkündür. Protein uygun bir membrana transfer edildikten sonra görüntüleme için boyanabilir, N ucundan sekanslanarak direkt olarak tanımlanabilir, kütle spektrofotometri ya da immüntespit yapılabilir [81,82].



Şekil 2.9 : Membran temelli immün tespit yöntemi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1 : Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Distile su cihazı	Sartorius Stedim	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Santrifüj	Nüve, NF 400	Yüksek hızda (maksimum: 14000 rpm) ayırıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır (Hettich). Düşük hızda ve büyük hacimde ayırıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır (Nüve).
Vortex	Stuart	Küçük hacimdeki sıvı karışımlarını homojen hale getirmede kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4)	Uğur	Örnekler, belirli kit çözeltileri, tampon ve stok çözeltilerin saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Haier	Örneklerin uzun süreli saklanması için kullanılmıştır.
pH metre	Mettler Toledo	Tampon çözeltilerin pH ayarlamasında kullanılmıştır.
Liyofilizatör	Christ	Ekstrelerin kalan su içeriğinden arındırılması amacıyla kullanılmıştır.
Evaporatör	Boeco	Ekstrelerdeki çözücülerin uçurulması amacıyla kullanılmıştır.
Hassas Terazı	GR 200	Numunelerin tartılmasında kullanılmıştır.
Balon Joje	Hanna Instruments	Standart çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Membran Filtre	Filmtec	HPLC analizine zeytin yaprağı ekstresini hazır hale getirmede kullanıldı.
Çeker Ocak	Stuart	Kalan çözücülerden ekstreyi uzaklaştırmada kullanılmıştır.
İnkübatör	Samheung	Çözeltilerin inkübasyona bırakılmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.1 (devam) : Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Florometrik Kültür Flaskları	Jet Biofil	Hücre içi ROS tayininde hücrelerin ekilmesinde kullanılmıştır.
Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı	Collégien, Fransa	Protein ekspresyon analizinde görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğunu tespit etmede kullanılmıştır.
Spektrofotometre	Thermo	Western Blot analizinde kullanılmıştır.
Floresan Mikroskop	Cnoec	Hücre canlılık ve apoptoz tayininde hücre sayımında kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de yer almaktadır.

Tablo 3.2 : Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
PBS	Sigma Aldrich	Tüm çalışmalarda kullanılan fizyolojik tampon olarak kullanılmıştır.
TEMED	Sigma Aldrich	SDS-PAGE analizinde jellerin hazırlanmasında ve proteinleri denatüre etmede kullanılmıştır.
SDS	Sigma Aldrich	SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır
APS	Sigma Aldrich	SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır
Coomassie blue boyası R250	Sigma Aldrich	SDS-PAGE jellerinin boyanmasında ve protein ölçümlerinde kullanılmıştır
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Glut 2 Antikoru	Cell Signaling	Western Blot yönteminde kullanılmıştır.
Glut 4 Antikoru	Cell Signaling	Western Blot yönteminde kullanılmıştır.
Tirozin Kinaz Antikoru	Santa Cruz	Western Blot yönteminde kullanılmıştır.
İnsülin Reseptör Protein -1Antikoru	Santa Cruz	Western Blot yönteminde kullanılmıştır.
Sekonder Antikor	Cell Signaling	Western Blot yönteminde kullanılmıştır.

Tablo 3.2 (devam) : Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
RIPA Buffer	Sigma Aldrich	Proteaz inhibitörü olarak WesternBlot yönteminde kullanılmıştır.
Metanol	Sigma Aldrich	Zeytin yaprağındaki antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.
Etanol	Sigma Aldrich	Zeytin yaprağındaki antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.
Asetonitril	Sigma Aldrich	Zeytin yaprağındaki antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.
Diklorometan	Sigma Aldrich	Zeytin yaprağındaki antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.
Folin Ciocalteu	Sigma Aldrich	Total fenolik içerik belirlemede kullanılmıştır.
Gallik Asit	Sigma Aldrich	Total fenolik ve prooksidan içerik belirlemede standart olarak kullanılmıştır.
Kersetin	Sigma Aldrich	Total flavanoid içerik belirlemede standart olarak kullanılmıştır.
DFCH-DA	Sigma Aldrich	Hücrelerin reaktif oksijen türlerini belirlemede kullanılmıştır.
Neokuprin Reaktif	Sigma Aldrich	Kuprak Yönteminde kullanılmıştır.
TCA	Sigma Aldrich	Prooksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.
Akridin Orange	Sigma Aldrich	Apoptoz testinde canlı hücreleri belirlemede kullanılmıştır.
Etidyum Bromid	Sigma Aldrich	Apoptotik hücrelerin tayininde kullanılmıştır.
Horseradish peroksidaz	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD	Protein ekspresyon analizinde kullanılmıştır.
2-β-merkaptetanol	Sigma Aldrich	Protein ekspresyonu aşamasında jel yükleme tampon içeriği olarak kullanılmıştır.
Bromfenol mavisi	Sigma Aldrich	Protein ekspresyonu aşamasında jel yükleme tampon içeriği olarak kullanılmıştır.
Süt tozu-TBST	Sigma Aldrich	Protein ekspresyon analizinde antikörlerin membrana tutturulmasında kullanılmıştır.
Phospat Buffer Salin	Sigma Aldrich	Protein ekspresyon analizinde bağlanmamış antikörlerin yıkanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2 (devam) : Kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
Gliserol	Sigma Aldrich	Protein ekspresyonu aşamasında jel yükleme tampon içeriği olarak kullanılmıştır.
Kemiluminesans kit (20X LumiGLO ve 20X Peroxide)	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD	Protein ekspresyon analizinde kullanılmıştır.
Bovin Serum Albumin	Sigma Aldrich	Protein konsantrasyonu hesaplamada standart olarak kullanılmıştır.
Akrilamid	Sigma Aldrich	Protein ekspresyon analizinde yükleme ve ayırma jelinde tampon olarak kullanılmıştır.
Precision Plus Protein Standardları	Bio-Rad, Hercules, Kaliforniya, ABD	Protein ekspresyonunda protein markırı olarak kullanılmıştır.
Tripsin EDTA	Sigma Aldrich	İnkübasyon sonrası hücrelerin kaldırılması amacıyla kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Komitesi'nden alınan 6.2016/57 sayılı etik kurul onayı ile deneysel çalışmalara başlanmıştır.

3.2.1 Zeytin yaprağının ekstresinin eldesi

- Tekirdağ/Şarköy'den toplanan zeytin yaprakları botanikçi tarafından tür tayini yapıldıktan sonra dallarından ayrılıp distile suyla yıkanarak -20°C'de 1 hafta saklandı. Daha sonra zeytin yapraklarının %70 metanol (MetOH), %70 asetonitril (ACE), %70 etanol %30 su (EtOH) ve %70 diklorometan (DCM) gibi farklı organik çözücülerde ekstraksiyonu yapılması için aynı miktarlarda tartılıp (1 g/ 1 ml) sokslet ekstraksiyon cihazında 24 saat ekstrakte edildi. Böylelikle tüm bitkisel metabolitler ekstraksiyon sıvısına geçmiş oldu.
- Ekstraksiyon sıvısından organik çözücülerini uzaklaştırmak için döner evaporator yardımıyla ekstrelerin çözücülerini uçurulmuş, çeker ocak altında 7

gün süre ile bekletilerek eser miktarda kalan çözücünün de uçması sağlanmıştır.

- Elde edilen ekstrelerin su içeriğinden tamamıyla kurtulmak amacıyla liyofilizatörde iki gece -80°C 'de (düşük sıcaklıkta) bekletilerek dondurulmuş ve yüksek basınç 5mbar altında liyofilize edilmiştir.

3.2.2 Farklı çözücülerde hazırlanan zeytin yaprağı ekstrelerinde HPLC ile oleuropein miktar tayini

Numune kalıntısı 50 mL HPLC saflıkta uygun çözücü ile çözüldükten sonra $0,45\ \mu\text{m}$ filtreden süzülerek HPLC analizine hazır hale getirildi.

3.2.2.1 Kullanılan ekipmanlar

HPLC analizi Shimadzu (Japan) LC 20A modeli ile yapılacak olup UV dedektör ile $20\ \mu\text{L}$ 'lik otomatik enjeksiyonların pik alanları LC solution bilgisayar yazılımı ile hesaplandı. Kromatografik ayırım C18 ($5\ \mu\text{m}$, $150 \times 4.6\ \text{mm}$) ve C8 ($5\ \mu\text{m}$, $150 \times 4.6\ \text{mm}$) kolonlar kullanılarak optimize edildi. Miktar tayinlerinin tümü dış standart yöntemiyle pik alanları hesaplanarak yapıldı.

3.2.2.2 Standart çözeltiler

Standart etken maddeler (25.00 mg) hassas terazide tartılıp 25 mL'lik balon jöjelere aktarıldıktan sonra HPLC saflıktaki metanol ile hacmine tamamlandı.

3.2.2.3 Kromatografik koşullar

HPLC kromatografik ayırımlar değişik izokratik ve gradient koşullarda, kolon sıcaklığı, akış hızı, mobil faz derişim optimizasyonu yapıldıktan sonra uygun dalga boyunda gerçekleşti. Analiz için kullanılan tüm çözeltiler $0.45\ \mu\text{m}$ filtrelerden süzöldükten sonra ultrasonik banyoda gaz giderimi yapıldı.

3.2.2.4 Kalibrasyon

100 - 1000 mg/mL aralığında hazırlanan 5 standart çözeltilinin 3 tekrarlı enjeksiyonlarını takiben alan verilerinin konsantrasyona bağıli lineer matematiksel denklemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinden kalibrasyon katsayısı hesaplanarak doğrusallık hesaplandı. Doğrusallık 0.99-1.11 aralığında ise bulunan denklem bilinmeyen numune derişimini hesaplamada kullanıldı.

3.2.2.5 Oleuropein RP-HPLC metodu

C18 ODS-3 (150mm, 4.6×5mm) kolonu üzerinde 1 mL min⁻¹ akışta, su (pH:3):asetonitril (70:30) mobil fazı kullanılarak gerçekleştirilen ayırımın UV deteksiyonu 280 nm de gerçekleştirilmiştir. 100-1000 µg mL⁻¹ aralığında oluşturulan lineer kalibrasyon eğrisinin doğrusallık katsayısı 0,99 bulundu.

3.2.3 Total fenolik içerik

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik aside eşdeğer olarak belirlendi [83]. 100 ppm'lik gallik asit çözeltisi hazırlandı ve bu çözümden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri distile su ile 184 µL'ye tamamlandı. Zeytin yaprağının farklı çözümlerdeki ekstralarının 1000 ppm konsantrasyonda çözümleri hazırlandı. Bir miligram ekstre içeren örnek çözümlerinden 4 µL alındı, distile su ile 184 µL'ye tamamlandı. Gallik asit çözümleri ve örneklere 4 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 12 µL ilave edildi. Karışım 2 saat oda sıcaklığında bekletildi ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu.

3.2.4 Total flavanoid içerik

Hazırlanan ekstraların toplam flavanoid içerikleri kersetine eş değer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi [84]. 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözümden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 192 µL'ye tamamlandı. 4 µL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 4 µL %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de mikropilaka reader ile absorbansları okundu. Aynı şekilde zeytin yaprağının farklı çözümlerdeki ekstralarının tek konsantrasyonda (1000 ppm) hazırlanan çözümlerinin de absorbans değerleri okundu. Ekstrelerin toplam flavanoid içerikleri, standarda göre hesaplandı.

3.2.5 Prooksidan aktivite

İnkübe edilen zeytin yaprağının farklı çözümlerdeki ekstralarının prooksidan etkisini göstermek için, modifiye CUPRAC yönteminden geliştirilen bu yöntemde etken maddelerin inkübasyon öncesi ve sonrasında prooksidan düzeyleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tayin edildi [85].

Tablo 3.3 : Prooksidan aktivite ölçümü için kullanılan kimyasallar ve zeytin yaprağı ekstresi miktarları.

1 ml pH = 7.4	Fosfat Buffer
1 µL 1 mM	Bakır 2 Sülfat çözeltisi
1 µL 1 mM	AOX
1 ml	Zeytin yaprağı ekstresi
1 ml	1 ml dH ₂ O

- 5 dk vortekslendi.
- 25 dk RT inkübasyona bırakıldı.
- Üzerine 1 ml %10 TCA eklendi.
- 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- 10 dk 4000 rpm’de santifüj edildi.
- 3 kez 1 ml distile su ile yıkandı.
- 1 µl NC solüsyon eklendi.
- 1 µl NH₄AC eklendi.
- 2.1 ml distile su ile yıkandı.
- Membran filtreden geçirildi.
- Örnekler 450 nm’de okundu.
- Prooksidant aktivite için standart çözelti olarak gallic asit kullanıldı.
- Zeytin yaprağı ekstralarının antioksidan aktiviteleri tayin edildi. Serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1 Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali kullanılarak belirlendi.

3.2.6 2,2 ' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal giderim aktivite yöntemi

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali kullanılarak belirlendi [86]. Zeytin yaprağının farklı çözücülerdeki ekstralarından 10 µg tartılarak 10 mL etanolde çözüldü ve stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2-20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL’ye tamamlanıp üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{ekstrakt}})/A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Tablo 3.4 : Çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinde DPPH antioksidan aktivite tayini için kullanılan miktarlar.

DPPH Yöntemi	1.	2.	3.	4.
Zeytin yaprağı ekstresi (µl)	2	5	10	20
Uygun Çözücü (µl)	38	35	30	20
DPPH Reaktif (µl)	160	160	160	160
Toplam (µl)	200	200	200	200

3.2.7 Bakır indirgeyici antioksidan kapasite (KUPRAK)

Zeytin yaprağının farklı çözücülerdeki ekstralarının cupric iyonu (Cu^{2+}) indirgeme kapasiteleri, Apak ve arkadaşlarının kullandığı KUPRAK metodu modifiye edilerek uygulandı [76]. Hazırlanan hekzan ve metanol ekstralarının 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2,5-25 µL alınarak etanol ile hacimleri 67 µl'ye tamamlandı. Çözeltilerin üzerlerine 61 µL 10 mM CuCl_2 çözeltisi, 61 µL 7,5 mM neokuprin reaktifi ve 61 µL NH_4AC tamponu (1 M, pH=7) ilave edilerek vortekslendi ve çözeltiler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü. Her bir örnekten üç paralel çalışıldı. Standart olarak BHA ve α -Toc kullanıldı.

3.2.8 ABTS radikal katyon yakalama aktivitesi

Miller ve Rice-Evans'ın uyguladığı yönteme göre bir gece önceden hazırlanıp karanlıkta bekletilen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2- azinobis 3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu) çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 0,005 M Potasyum Fosfat tampon çözeltisinin (pH=8) ilavesiyle absorbans 1,2-0,9 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Test tüpüne konulan örneklerin ölçümünde; 0,1 mL örnek üzerine standart 1 mL $\text{ABTS}^{\bullet+}$ çözeltisi eklenmiştir. 10 sn karıştırılıp 30 sn beklenerek 734 nm'de suya karşı fotometrik okuma yapılmıştır [87].

3.2.9 Hepatoselüler karsinoma hücrelerinin canlılık testi

Hücrelerin canlılığını tespit etmek için, 96'lık kültür plaklarına her bir kuyuda 100 µl 5×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ilave edildikten sonra luminometrik yöntemi ile multiplate reader kullanılarak ATP seviyesi ölçülerek hücre canlılığı tespit edildi.

3.2.10 Hepatoselüler karsinoma hücrelerinin apoptoz ölçümü

Hepg2 hücrelerinde canlılık değerleri, nekroza ve apoptoza uğrayan hücrelerin tespit edilmesi acridine orange (AO) ve etidyum bromür (EB) boyalarının karıştırılıp hücrelere verilmesiyle belirlendi. Acridine orange, hem canlı hem de canlı olmayan hücreler tarafından absorbe edilmektedir. RNA veya DNA'ya bağlandığında yeşil floresan yaymaktadır. Etidyum bromür ise yalnızca ölü hücreler tarafından absorbe olur ve DNA'ya interkalasyon ile kırmızı floresan yaymaktadır. Boyama işlemi gerçekleştiikten sonra üç tip hücrenin analizi gerçekleştirilebilmektedir.

Bunlar;

- **Canlı hücreler:** organize yapıya sahip düz parlak yeşil çekirdeğe sahiptirler.
- **Apoptotik hücreler:** turuncu- kırmızı renk çekirdeğe ve fragmente olmuş kromatine sahiptirler.
- **Nekrotik hücreler:** yuvarlak kırmızı nükleusa sahiptir ve organize yapıdaki hücrelerdir.

Altı kuyulu plakalara Hepg2 hücrelerinden $1,5 \times 10^5$ hücre ekimi yapıldı ve 2 ml besiyeri eklendi. Hücreler 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda zeytin yaprağı ekstresinin uygulaması yapıldı. 24 saat inkübasyonun ardından hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp +4°C'de 900 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, pellete 1 ml dPBS eklenip tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp 100 µl AO/EB solüsyonu eklendi. Floresans mikroskopta hücreler sayılıp kaydedildi.

3.2.11 Hücre içi reaktif oksijen türlerinin miktar tayini

Hepg2 hücrelerinde süperoksit radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit reaktif oksijen türlerine bakıldı. Hücre içi reaktif oksijen seviyesi ölçümü için 96'lık florometrik kültür flasklarına her bir kuyuda 200 µl 5×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ilave edildikten sonra H₂DCF-DA ile inkübe edilip yıkandıktan sonra florometrik yöntemi ile multiplate reader kullanılarak ölçüm yapıldı.

3.2.12 Western blot analizi

İnsan hepatoselüler karsinoma hücrelerine zeytin yaprağı ekstresi verildikten sonra Tirozin Kinaz, İnsülin Reseptör-1 reseptörlerin, GLUT-4 ve GLUT-2 taşıyıcı proteinlerin ekspresyonlarını ölçmek için Western Blot tekniği kullanıldı. Öncelikle protein konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen hücre pelletleri RIPA Buffer ile muamele edildikten sonra total protein konsantrasyonu Bradford protein tayini (Biorad Protein Assay) ile ölçüldü. İlk olarak Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Her bir eppendorfa 4 µl standart veya örnek ve 200 µl çalışma ayıracağı (protein assay – biorad) eklendi. Daha sonrasında karanlık ortamda 5 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renk gözlemlenerek 595 nm’de spektrofotometrede ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı. Western Blot tekniğiyle protein ekspresyon analizi aşamasına geçildi. Her bir kuyuya 20 µg protein içerecek şekilde hazırlanan hücre pelletleri, 1 mM Tris-HCl, % 40 gliserol, %8 SDS, %20 2-β-merkaptöanol, % 0.03 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 1’e 4 oranında sulandırıldı ve 95°C’de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Sonrasında ise % 5 yükleme tamponu (1 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,05 (w/v) TEMED) pH 6.8’de hazırlandı ve % 12 ayırma (1.5 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0.05 (w/v) APS, % 0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8’de hazırlandı) jeline yüklendi. 2 L, elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Bio-Rad, Mini-PROTEAN 3 Cell, Hercules, Kaliforniya, ABD). Protein markırı olarak Precision Plus Protein Standardları (Bio-Rad, Hercules, Kaliforniya, ABD) kullanıldı.

Tablo 3.5 : Protein ekspresyon analizinde elektroforez için yükleme tamponu içeriği.

% 5 yükleme tamponu	
1 M	Tris-HCl,
% 30 (w/v)	Akrilamid
% 10 (w/v)	SDS
% 0,05 (w/v)	APS
% 0,05 (w/v)	TEMED

Tablo 3.6 : Protein ekspresyon analizinde elektroforez için ayırma jeli içeriği.

% 12 ayırma jeli	
1.5 M	Tris-HCl,
% 30 (w/v)	Akrilamid
% 10 (w/v)	SDS
% 0.05 (w/v)	APS
% 0.05 (w/v)	TEMED

Ayrıştırılan proteinler, immunoblotting ile ortam sıcaklığında 100 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren, pH 8.3'lük transfer tamponunda 2 saat sürede 0.2 µm kalınlıktaki PVDF membrana aktarıldı. Daha sonra membran ponceau S boyası ile muamele edilip proteinlerin transfer edildiği konfirme edildi, membran antikor ile tayin edilene kadar PBS içerisinde +4°C'de bırakıldı.

Seçilen antikorlar ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik primer antikor ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların PBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış horseradish peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD) ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, ABD) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışımaya membrana geçirerek bantların görünmesi sağlandı. Bant yoğunlukları ilber Lourmat Görüntüleme cihazı (Collégien, Fransa) kullanılarak saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu Vilber Loumart'ın image programı ile eşit büyüklükte alanlarda ölçüldü.

3.2.13. İstatistiksel analiz

Repeated Anova programı ile istatistiksel analiz yapılmıştır. Repeated anova; yinelenmiş ölçüler tasarımı ya da tekrarlanmış ölçüler tasarımı olarak adlandırılabilir. Tıp, mühendislik, ekonomi-finans, sosyoloji, psikoloji, eğitim bilimleri vb. alanlarda yayınlanmış kaynaklardan, tasarlanmış bir denemeden, anket sonuçlarından ve gözlem sonuçlarından toplanmış verilerin analizinde kullanılmaktadır [88].

4. BULGULAR

4.1 Oleuropein Konsantrasyonları

Zeytin yaprağı ekstresindeki etken madde olan oleuropein konsantrasyonları HPLC analizi ile belirlendi. 100 µg/ ml'den 1000 µg/ ml'ye kadar farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerin içerdiği oleuropeinin konsantrasyonları 3 tekrarlı olarak ölçüldü. En yüksek oleuropein seviyesi metanol ekstraktında görüldüğünden sonraki analizler için solvent olarak metanol kullanıldı. Tablo 4.1'de ekstraktların çeşitli dozlardaki oleuropeinin konsantrasyonları 3 tekrarlı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.1 : Ekstraktların oleuropein içeriklerini gösteren tablolar.

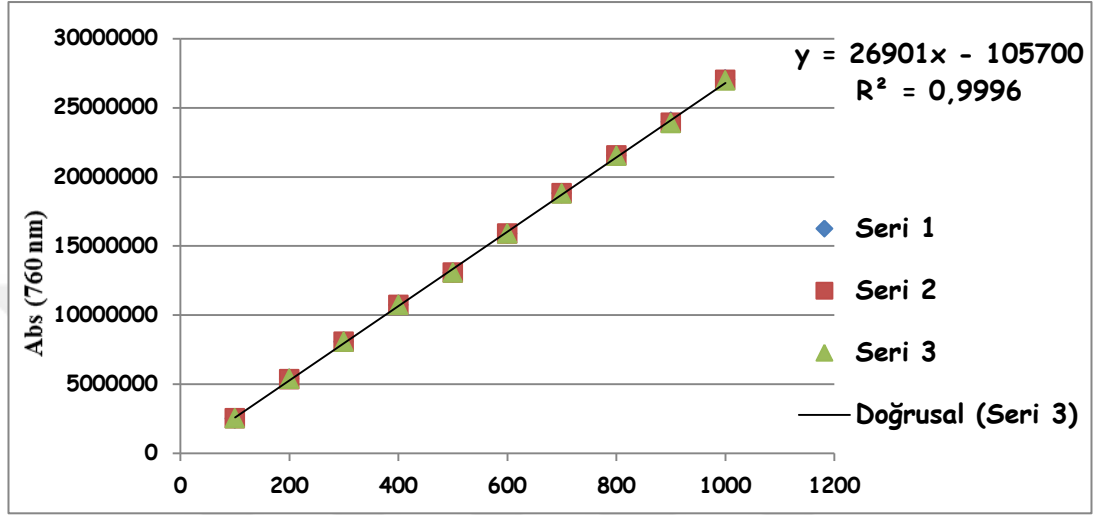
µg/ mL	1.Tekrar (mg/ml)	2. Tekrar (mg/ml)	3.Tekrar (mg/ml)
100	2521239	2536947	2543974
200	5375804	5369884	5376676
300	8075311	8078256	8069415
400	10729861	10731028	10731301
500	13079331	13071749	13072460
600	15903849	15906657	15898351
700	18823751	18815376	18798143
800	21563242	21561975	21541922
900	23997256	23923725	23893221
1000	27056294	27013499	26973064

Ekstraktların oleuropeinin miktarları 4 farklı organik çözücüde 3 tekrarlı olarak belirlenmiş olup en yüksek miktarın metanol organik çözücüsünde olduğu tespit edilmiştir. Tablo 4.2'de ekstrelerin organik çözücülerdeki ortalama oleuropein miktarları verilmiştir.

Tablo 4.2 : Ekstrelerin organik çözücülerdeki ortalama oleuropein miktarları (DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MetOH:Metanol).

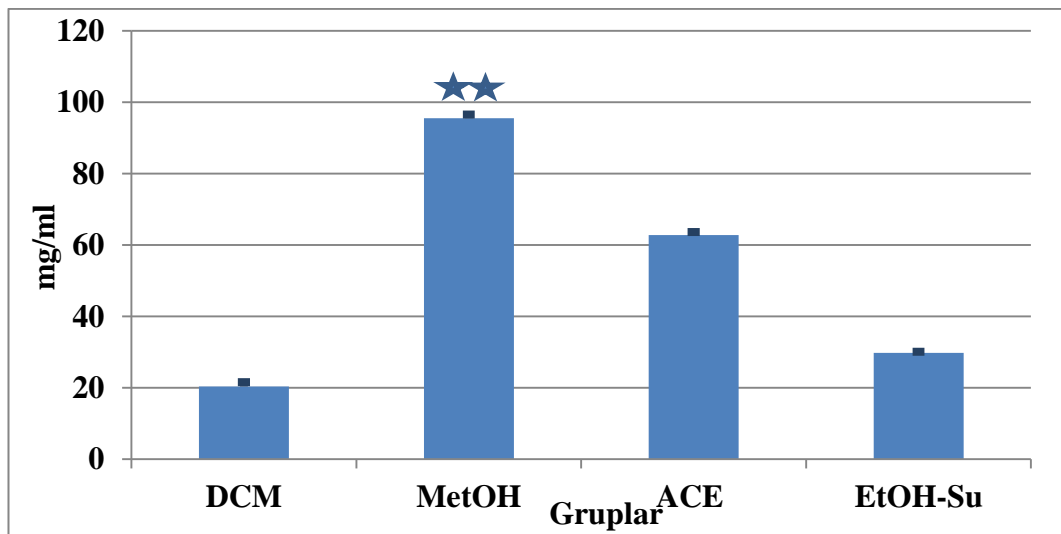
	DCM mg/ml	MetOH mg/ml	ACE mg/ml
1. Tekrar	21,15	95,41	62,12
2. Tekrar	20,87	94,57	62,44
3. Tekrar	18,98	96,62	63,74
Ort. Mg/ml	20,33	95,53	62,77

Diklorometan, metanol, asetonitril çözücülerıyla oleuropeinin miktarı 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür ve metanol organik çözücüsünde yüksek antioksidan aktivite görülmüştür. Zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu yükseldikçe metanolle ekstraksiyon sonucu oleuropein miktarı artmıştır. Şekil 4.1’de çözücülere ait seri grafik gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : Farklı organik çözücülerle yapılan ekstraksiyon sonucu seri grafik.

Oleuropein miktar tayini HPLC metoduyla yapılmış olup metanol organik çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonda 100 mg/ml’ye yakın bir değerde diğer çözücülere kıyasla maksimum antioksidan aktivite tespit edilmiştir.

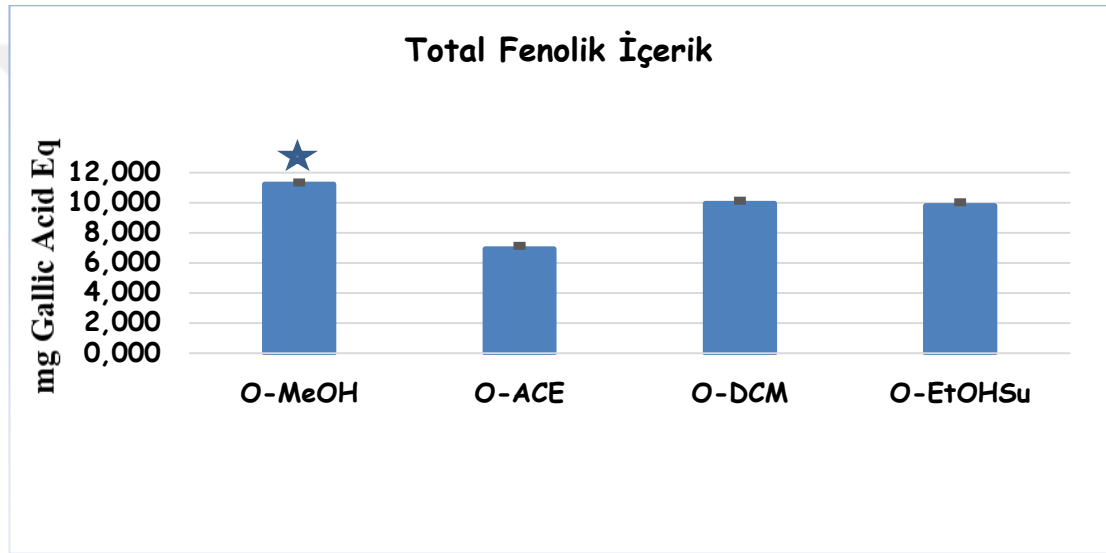


Şekil 4.2 : Farklı organik çözücülerle gerçekleştirilen oleuropein konsantrasyonu (**:p<0.01)

Repeated anova istatistiksel analiz testi sonucunda 100 µg/ mL'den 1000 µg/ mL'ye kadar olan analiz toplamda değerlendirildiğinde metanol organik çözücüsünde $p<0.01$ olup anlamlı olduğu tespit edildi.

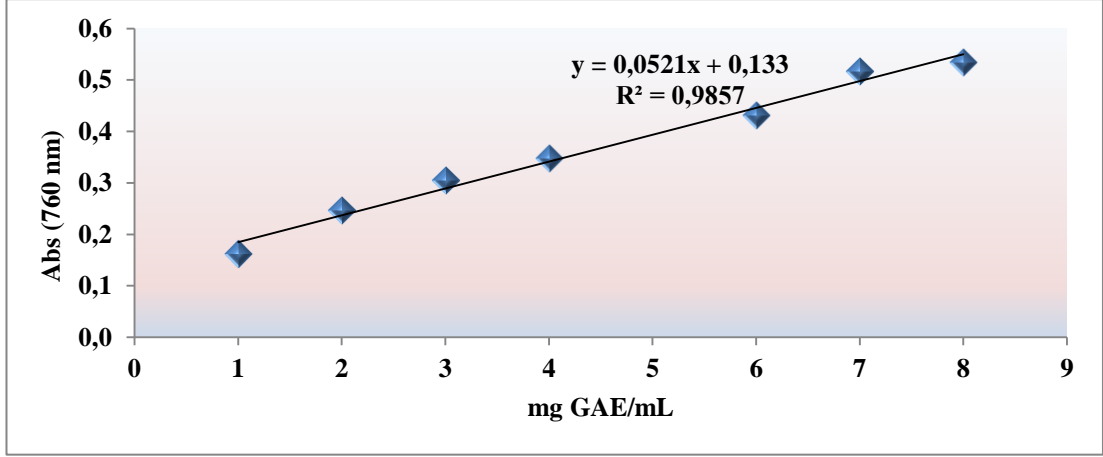
4.2 Total Fenolik İçerik

Zeytin yaprağı ekstrelerinin total fenolik içeriğinin tayininde yüksek fenolik antioksidan aktiviteyi metanol organik çözücüsünde gösterdiği görülmüştür. Bu değer yaklaşık 10.000-12.000 mg arasında ölçülmüştür. Şekil 4.3'te 4 farklı organik çözücüyle ekstraksiyon sonucu gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : Metanol, asetonitril, diklorometan, etanol organik çözücüleriyle yapılan ekstraksiyonlardaki fenolik içerik. (*: $p<0.05$) (DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MeOH:Metanol, EtOH:Etanol).

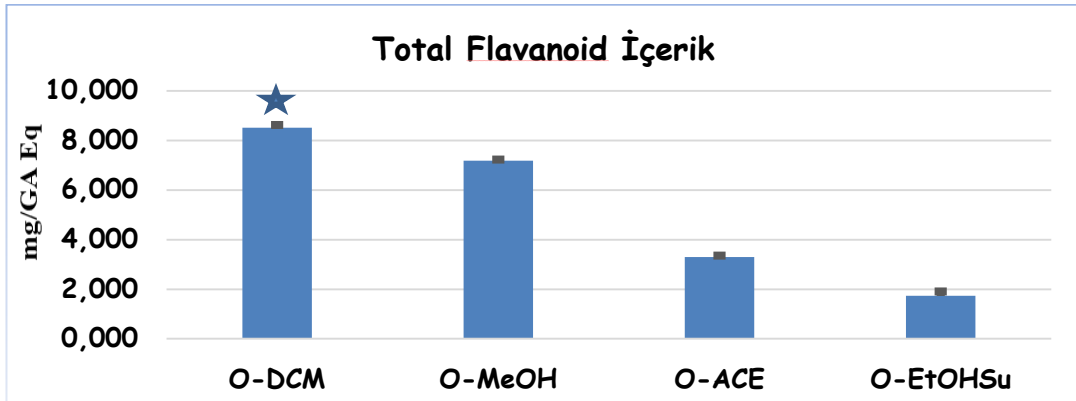
Şekil 4.4'te seri grafikte farklı konsantrasyonlarda fenol miktarı ölçülmüştür ve metanol organik çözücüsünde yüksek antioksidan aktivite görülmüştür. Zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu yükseldikçe fenolik içeriğin yükseldiği görülmüştür. Ekstraksiyon yönteminin en iyi metanol çözücüsünde olduğu görüldüğü için ve Repeated Anova istatistiksel analiz sonucu $p<0.05$ olup anlamlılık tespit edildiği için deney bu yolla devam edilmiştir.



Şekil 4.4 : Farklı konsantrasyonlarda çözücülerle yapılan ekstraksiyondaki fenolik içerik.

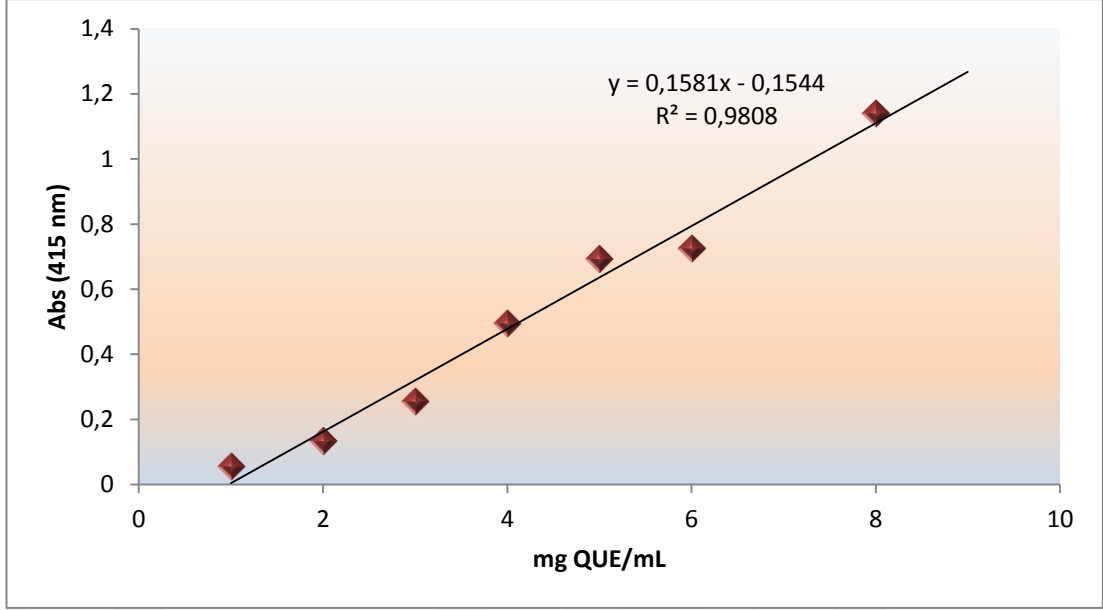
4.3 Total Flavanoid İçerik

Zeytin yaprağı ekstrelerinin total flavanoid içeriği tayininde diklorometan organik çözücüsünde yüksek flavanoid antioksidan aktiviteyi gösterdiği ve bu değer yaklaşık 8000 mg olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.5'te dört farklı organik çözücüyle yapılan ekstraksiyonda en yüksek antioksidan aktivitenin diklorometanla yapılan ekstraksiyonda olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.5 : Zeytin yaprağı ekstresinin dört farklı organik çözücüdeki flavanoid içerikleri. (*:p<0.05)(DCM:Diklorometan, ACE:Asetonitril, MeOH:Metanol, EtOH:Etanol)

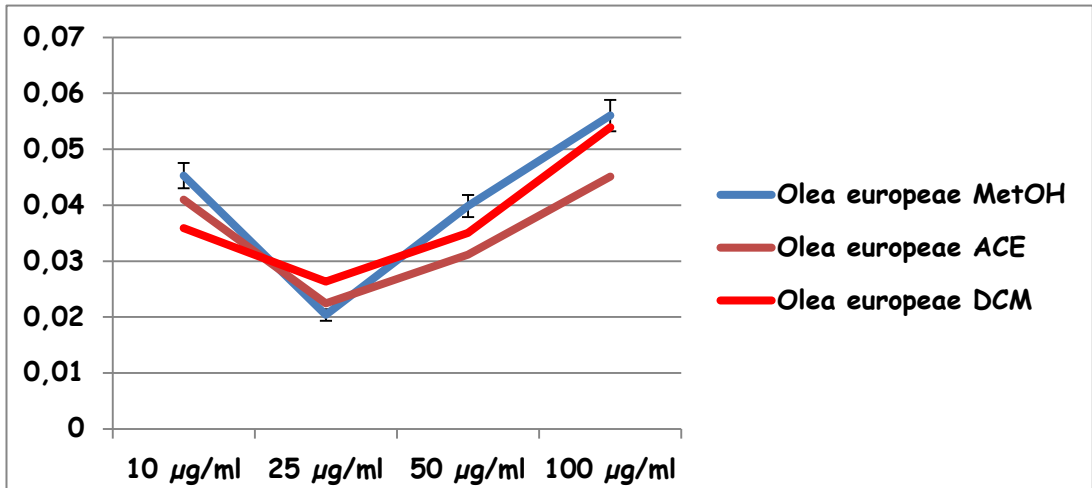
Şekil 4.6'da seri grafikte farklı konsantrasyonlarda flavanoid miktarı ölçülmüştür ve diklorometan organik çözücüsünde yüksek antioksidan aktivite görülmüştür. Zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu yükseldikçe flavanoid içeriğinin lineerliğe yakın olarak yükseldiği görülmüştür.



Şekil 4.6 : Farklı konsantrasyonlarda çözücülerle yapılan ekstraksiyondaki flavanoid içerik.

4.4 Prooksidan Aktivite Tayini

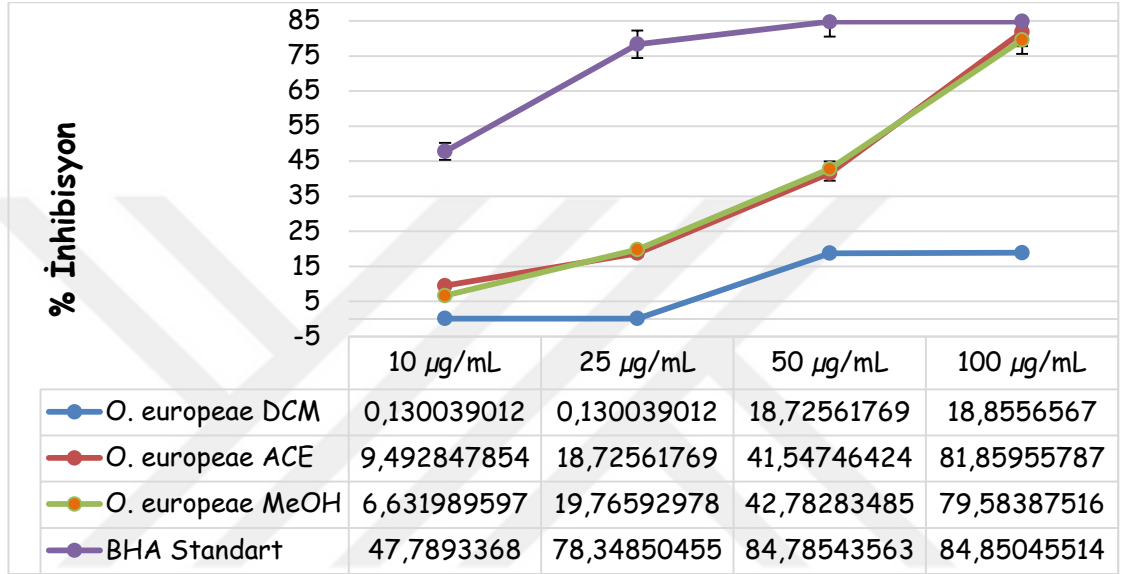
Zeytin yaprağı ekstresinin 10 µg/ ml'den 100 µg/ ml'ye kadar verilen dozlarında hangi organik çözücünde en yüksek prooksidan aktivite gösterdiğine bakılmıştır. Analiz edilen diğer organik çözücülere göre metanol organik çözücünde maksimum etkinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7: Zeytin yaprağı ekstresinin metanol, asetonitril ve diklorometan çözücülerindeki prooksidan aktivitesi.

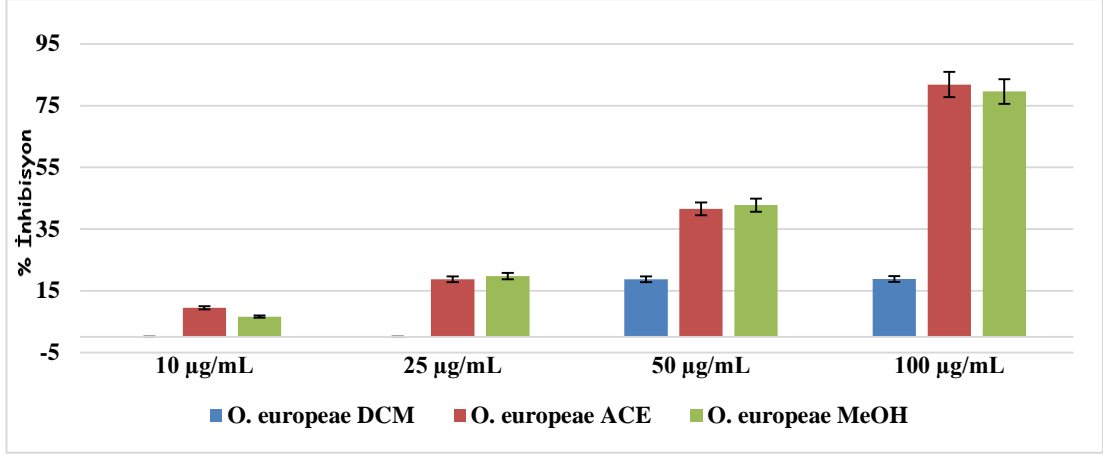
4.5 Difenil Pikril Hidrazil Reaktif Ölçümü

Zeytin yaprağı ekstrelerindeki difenil pikrif hidrazil antioksidan tayini çeşitli dozlardaki ekstrelerde belirlenmiştir. 100 µg/ml ekstre verildiğinde en yüksek antioksidan aktivite asetonitrilde görülürken doz artışı olduğunda hem metanol hem asetonitril çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonda birbirine yakın değerler elde edilmiştir. Ekstrelerin % inhibisyon değerleri Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 : Farklı organik çözücülerle yapılan ekstraksiyonun % inhibisyon değerleri.

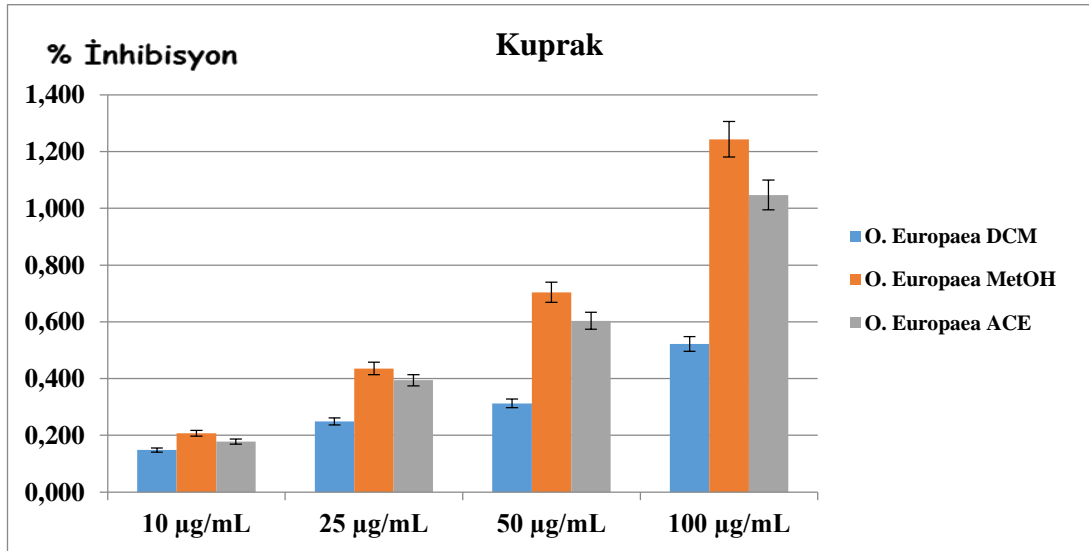
Standart olan bütül hidroksi asetat ile kıyaslama yapıldığında hem 10 µg/mL hem de 100 µg/mL dozlarında metanol ve asetonitril çözücülerıyla yapılan ekstraksiyonlarda birbiriyle yakın olarak yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir. Zeytin yaprağı ekstrelerinin farklı organik çözücülerdeki antioksidan yüzde inhibisyonları grafik olarak Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Elde edilen değerler Repeated Anova istatistik analiz programıyla değerlendirildiğinde de anlamlılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.9 : Zeytin yaprağı ekstralarının yüzde inhibisyonlarının grafikleri.

4.6 Kuprak metodu

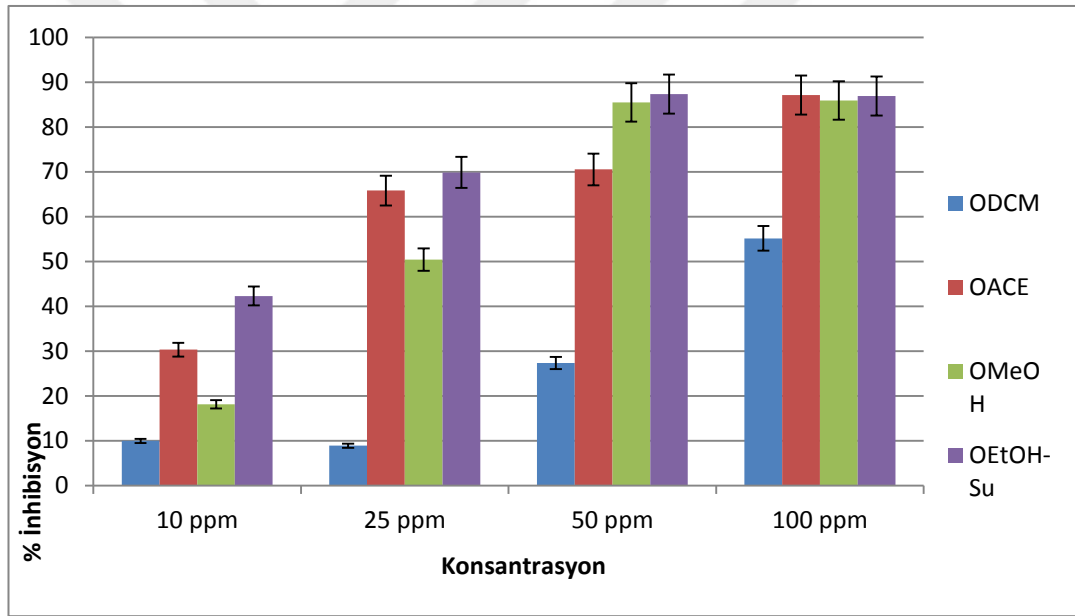
Zeytin yaprağı ekstraları 10-25-50-100 µg/mL dozlarında diklorometan, metanol, asetonitril organik çözücülerle kuprak metoduna göre ekstrakte edildiğinde en yüksek antioksidan aktivitenin metanol çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonda olduğu görülmüştür. Şekil 4.10'da ekstralarda hangi organik çözücüyle yapılan ekstraksiyon sonucunda yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.10 : Kuprak metoduyla organik çözücülerle yapılan ekstraksiyon yüzdeleri.

4.7 ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

Miller ve Rice-Evans'ın uyguladığı yöntemle göre bir gece önceden hazırlanıp karanlıkta bekletilen ABTS•+ (2,2- azinobis 3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit diamonyum tuzu) çözeltisi zeytin yaprağı ekstresine uygulanıp zeytin yaprağındaki antioksidan aktiviteyi belirlemek için kullanılmıştır. Diklorometan, asetonitril, metanol ve etanol gibi farklı organik çözücülerde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra Şekil 4.11'de % inhibisyon değerleri 10-25-50-100 ppm'de ölçülmüş ve etanol çözücüsünde en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. Bu değerlerin Repeated Anova istatistiksel analizi yapıldığında metanolla ekstraksiyon sonucu $p < 0.05$ olarak belirlenmiş olup anlamlılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.11 : ABTS yöntemiyle yapılan ekstraksiyonun yüzde inhibisyon değerleri.

4.8 Zeytin Yaprağı Ekstresi Miktarı ve Hücre Canlılığı

Tez çalışmamızda elde edilen zeytin yaprağı ekstresinin Hepg2 hücrelerine verilen çeşitli dozlarında hücre canlılığı üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Hücrelere çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinde hücrelerin canlılığına kontrol grubu dahil olmak üzere 2,5 µg/ml'den 500 µg/ml'ye kadar bakıldığında 10 µg/ml'de maksimum canlılık görülürken 10 µg/ml'den sonraki değerlerde canlılığın azalmaya başladığı görüldü. Kontrol grubuyla kıyaslandığında hücrelerde önce proliferatif etki görülüp sonra prooksidan etkinin görüldüğü ve bu sebeple hücre canlılığının azalmaya başladığı tespit edildi. Ekstre dozu 500 µg/ml olduğunda ise hücrelerin %90'ının canlılığını yitirdiği görüldü.

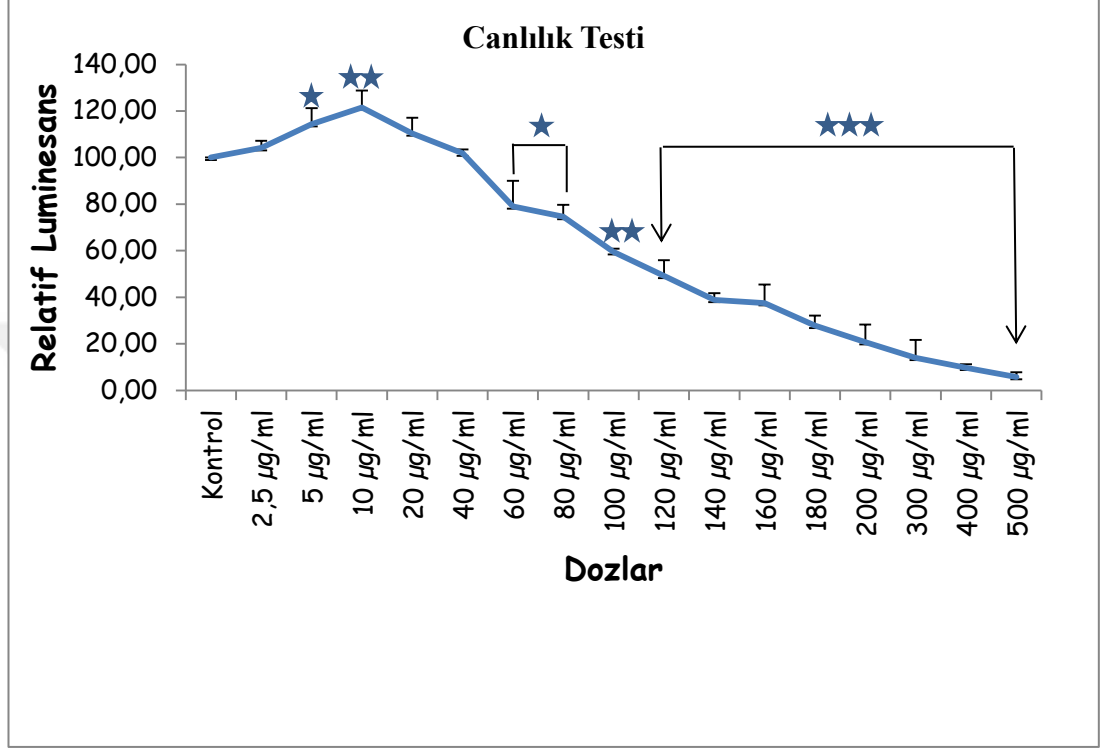
Tablo 4.3'te Hepg2 hücrelerine zeytin yaprağı ekstrelerinin 2.5 µg/ml'den 500 µg/ml'ye kadar dozu verilip ölçülen yüzde canlılık oranları gösterilmiştir. Ve 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3 : Hepg2 hücrelerine farklı dozlarda verilen ekstrelerin canlılık yüzdeleri.

	1%	2%	3%	4%
Kontrol	100	100	100	100
2,5 µg/ml	106,22023	107,06302	102,97397	100,3901
5 µg/ml	124,09337	113,98666	108,1685	111,18076
10 µg/ml	131,60198	121,96921	116,29928	116,00075
20 µg/ml	120,29521	108,46223	105,18355	107,71164
40 µg/ml	102,42396	103,75596	101,25901	99,79814
60 µg/ml	87,44636	71,96423	67,45253	89,40779
80 µg/ml	80,12261	75,76183	67,69507	74,70977
100 µg/ml	58,0929	60,44022	60,9164	58,40793
120 µg/ml	43,05966	52,96812	56,8257	43,88921
140 µg/ml	41,81089	39,26112	39,70762	34,96384
160 µg/ml	30,56732	48,53065	37,59447	33,40431
180 µg/ml	24,50271	33,28325	29,11898	24,4321
200 µg/ml	15,76987	28,42313	25,75209	12,93023
300 µg/ml	10,98326	24,91425	12,87175	7,24148
400 µg/ml	9,01297	11,84712	9,34825	8,82826
500 µg/ml	3,78496	4,26279	8,2721	6,4945

Şekil 4.12'de zeytin yaprağı ekstresi çeşitli dozlarda Hepg2 hücrelerine verildiğinde hücresel canlılıktaki değişimler gösterilmiştir. Grafikte kontrol grubu dahil 2.5

$\mu\text{g/ml}$ doz ile başlanmıştır ve bu doz $500 \mu\text{g/ml}$ 'ye kadar artırılmıştır. Doz $10 \mu\text{g/ml}$ 'ye kadar artırıldığında hücrelerde maksimum canlılık görülmüştür. $10 \mu\text{g/ml}$ 'den sonra artırılan dozlarda ortalama olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.12 : Çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresi verilen Hepg2 hücrelerinin canlılık değerleri. (-> :Aralığındaki değerler dahil) (*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$)

Repeated Anova istatistik analizi yapıp kontrol grubuna göre kıyaslandığında; $2.5 \mu\text{g/ml}$ olarak verilen 2. dozda sonuç $p>0.05$ olup anlamlı değilken 3. örnek $p<0.05$ olarak anlamlı tespit edildi. 4. verilen $10 \mu\text{g/ml}$ zeytin yaprağı ekstresinde maksimum canlılık görülüp istatistik analiz sonucu $p<0.01$ olup anlamlılık görüldü. Verilen 5. ve 6. dozda anlamlılık görülmedi. 7. ve 8. dozda $p<0.05$ olup anlamlı sonuç elde edildi. 9. dozda ise $p<0.01$ olup anlamlılık tespit edildi. 10. dozdan sonra verilen tüm dozlarda $p<0.001$ olduğu için anlam farkının arttığı görüldü. Böylece kontrol grubuna göre yapılan kıyaslamalarda son verilen dozlar kontrol düzeyinin altına düştüğü için canlılık azalmasında anlamlılık tespit edildi.

4.9 Apoptoz

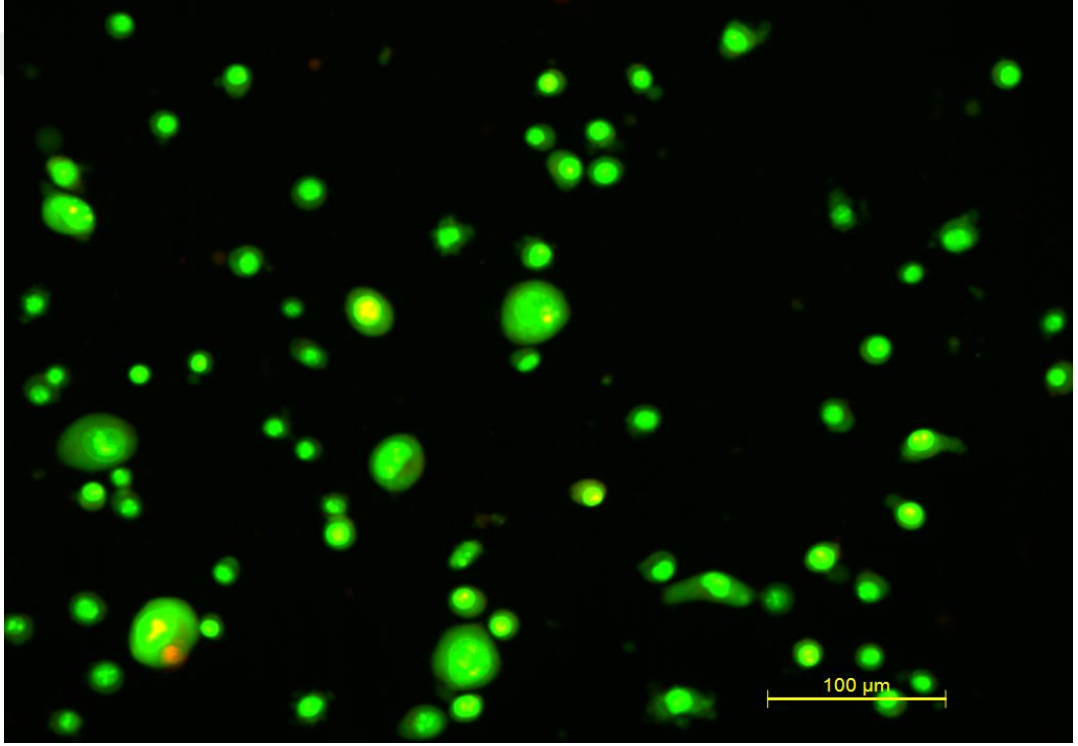
Zeytin yaprağı metanolle ekstraksiyon sonucunda Hepg2 hücrelerine verildi. Hücrelere 2.5 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile başlanıp 5-10-20-40-60-80-100-120-140-160 µg/ml ekstre verilerek canlılık, apoptotik ve nekrotik değerlerine bakıldı. Analiz 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu ile başlanarak hücre canlılığına bakıldığında zeytin yaprağı ekstresi miktarı artırıldıkça canlılığın azaldığı tespit edildi. Bu değer 40 µg/ml'ye kadar sabit kalıp sonrasında miktar artırıldıkça canlılığın azaldığı görüldü. Hücrelerin apoptoz testine bakıldığında zeytin yaprağı ekstresi miktarı arttıkça apoptoza uğrayan hücrelerin kademeli olarak arttığı görüldü. Hücrelerde 40 µg/ml dozdan sonra artış olduğu tespit edildi. Nekroza uğrayan hücrelere bakıldığında;40 µg/ml'den sonra hücrelerin canlılığını yitirdiği ve dolayısıyla hücrelerin ölümünün gerçekleştiği görüldü. Hücrelere verilen zeytin yaprağı ekstresinin farklı dozlarına karşılık gelen canlılık, nekrotik, apoptotik parametre değişimleri yüzdeler olarak Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Zeytin yaprağı ekstre miktarı arttıkça yüzdeler olarak da canlılığın azaldığı, apoptozun ve nekrozun arttığı gösterilmiştir.

Tablo 4.4 : Hepg2 hücrelerinin canlılık, nekrotik, apoptotik yüzdeleri. (V:Viability, A:Apoptotik, N:Nekrotik)

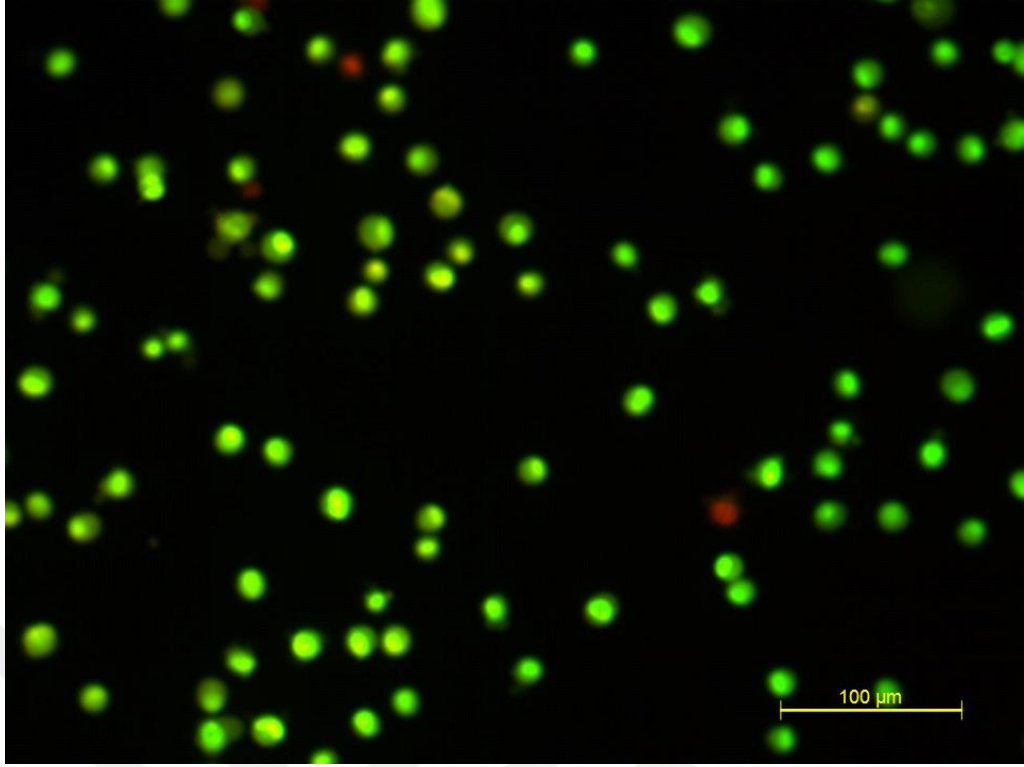
	% Relatif								
	V (3 tekrar)				A (3 tekrar)			N (3 tekrar)	
Kontrol	97	100	98	0	0	1,9	2	0	0
2,5 µg/ml	100	98	98	0	0	1,6	0	1	0
5 µg/ml	97	98	100	2	0	0	0	1	0
10 µg/ml	95	100	100	2	0	0	2	0	0
20 µg/ml	98	100	96	2	0	1,7	0	0	1,7
40 µg/ml	97	100	95	0	0	4	2	0	0
60 µg/ml	76	77	76	15	16	14	7	6	9
80 µg/ml	68	68	70	19	20	19	11	10	10
100 µg/ml	59	59	60	27	26	27	13	14	11
120 µg/ml	50	51	50	30	30	30	18	17	19
140 µg/ml	41	40	40	37	39	36	20	19	23
160 µg/ml	36	36	35	39	38	41	24	25	23

Apoptoz analizinde floresan mikroskopta görünen canlı kalan, nekroza ve apoptoza uğrayan hücrelerin renk değişimleri Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te

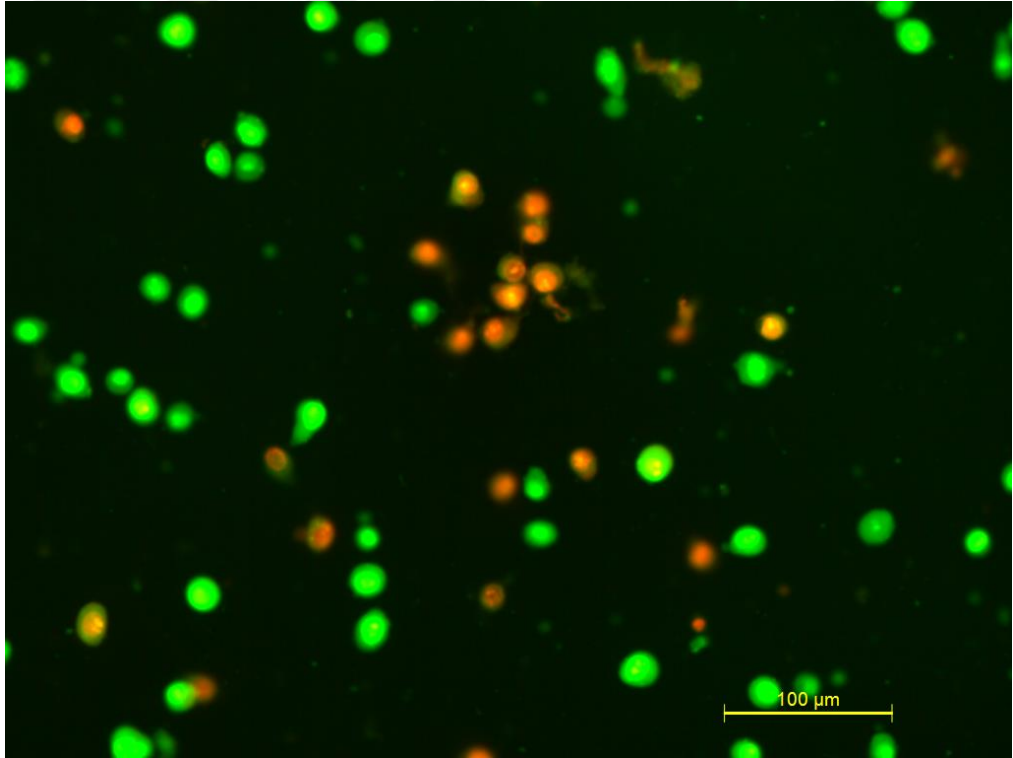
gösterilmiştir. Hücrelerin yeşil görünmesini sağlayan durum canlı olmalarından kaynaklanmaktadır. Akridin orange boyası yalnızca canlı hücelere girerek renk hücelerin yeşil renkte görünmesini sağlar. Etidyum bromür ise hücre, canlı olduğunda giremez ancak hüceler apoptoza uğramaya başladığında etidyum bromür hücreye girmeye başlar çünkü DNA spesifik bir boyadır ve böylece DNA'ya bağlanır. Hüceler tamamen parçalandığında sadece DNA boyanıp sitoplazma boyanmadığı için kırmızı küçük lekeler oluşur bu da nekrotik olan hüceleri göstermiştir.



Şekil 4.13 : Apoptoz ölçüm sonucunda görünen canlı hüceler. (Yeşil:canlı)

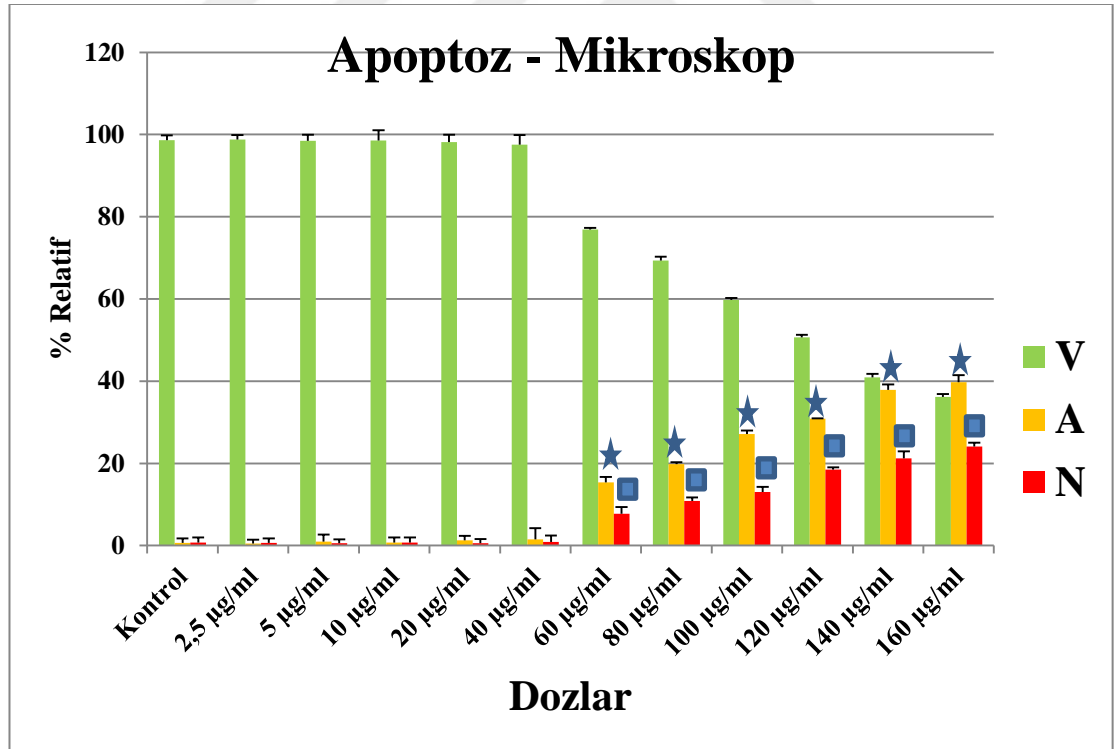


Şekil 4.14 :Apoptoz ölçüm sonucunda görünen nekrotik ve canlı hücreler.
(Kırmızı:nekrotik, Yeşil:canlı)



Şekil 4.15: Apoptoz ölçüm sonucunda görünen apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler.
(Kırmızı:nekrotik, Turuncu:apoptotik, Yeşil:canlı)

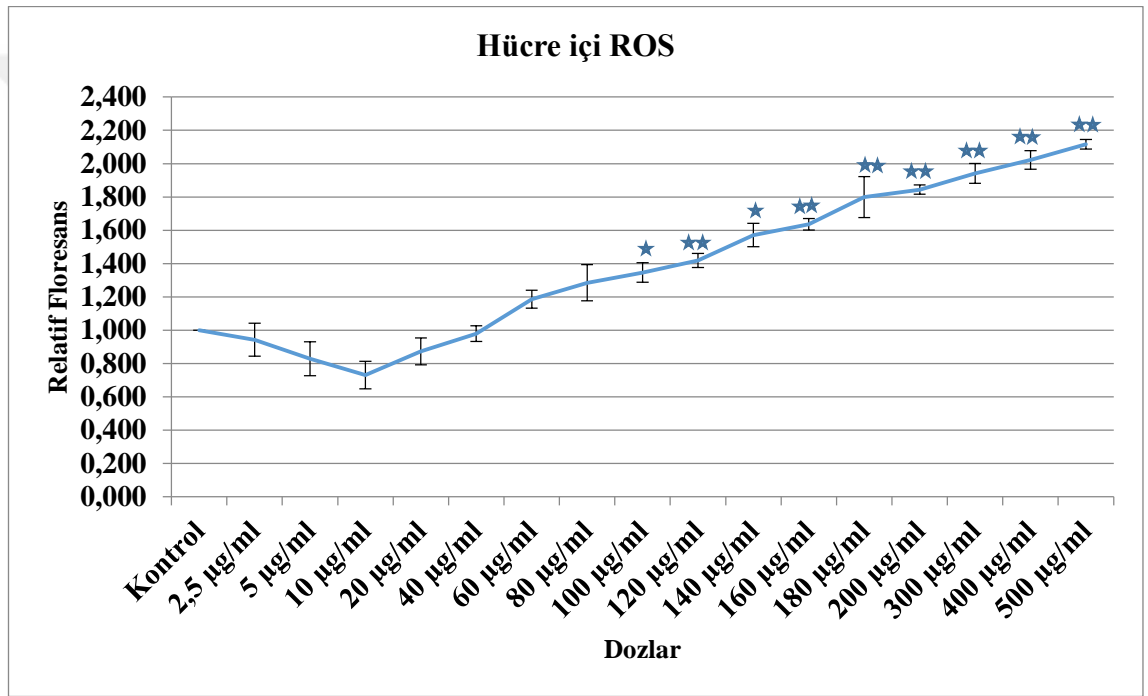
Hepg2 hücrelerine zeytin yaprağı ekstresinin verilen farklı dozlarındaki apoptotik, nekrotik, canlılık parametrelerindeki değişimlerin yüzdelik verileri grafik halinde Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Ekstre miktarı artırıldığında canlılığın azaldığı, apoptozun ve nekrozun arttığına dair verilerin istatistiksel analizi Repeated Anova programı ile yapılmıştır. Analiz sonucunda hücrelere verilen zeytin yaprağı ekstresinin 60 µg/ml dozunda $p < 0.05$ olmak üzere anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir. Hücrelere verilen 80-100-120-140-160 µg/ml zeytin yaprağı ekstrelerinde hücre canlılığı $p < 0.05$ olarak ölçülmüş olup azalmada anlamlılık tespit edilmiştir. Diğer yandan apoptotik ve nekrotik parametreleri ölçmek için hücrelere, zeytin yaprağı ekstreleri 60 µg/ml dozdan başlanarak 80-100-120-140-160 µg/ml dozlarda verilmiş olup hücre canlılığı ve nekrotik değerlerdeki anlamlı artış da repeated anova istatistik analiz programıyla belirlenmiştir ve değerler $p < 0.05$ olarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.16 : Hepg2 hücrelerinin verilen çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresi sonucunda canlılık, apoptotik ve nekrotik değerleri. (*: $p < 0.05$) (Yeşil: canlı, Kırmızı: nekrotik, Sarı: Apoptotik hücreler)

4.10 Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri

Hücre içi süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit reaktif oksijen düzeylerinden elde edilen sonuçlarda; Hücreye 2.5 µg/ml'den 500 µg/ml'ye kadar verilen çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresinde 2.5 µg/ml'den 10 µg/ml'ye gelene kadar reaktif oksijen düzeyinde azalma olduğu 10 µg/ml'den sonra verilen dozlarda reaktif oksijen düzeyinde artış gösterdiği böylelikle hücrenin canlılığını yitirdiği görülmüştür. Analiz sonucunda hücreye verilen en etkili dozun 10 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.17'de reaktif oksijen türlerinin artmasıyla canlılığın azaldığına dair grafik gösterilmiştir.



Şekil 4.17 : Hücre içi reaktif oksijen türleri (*:p<0.05 **:p<0.01).

Repeated Anova istatistik analizi yapıлып kontrol grubuna göre kıyaslandığında; 2.5-5-10-20-40-60-80 µg/ mL olarak verilen dozların istatistik analizinde p>0.05 olduğu için anlamlılık tespit edilmedi. 100 µg/ mL olarak verilen 9. Dozda p<0.05 olarak belirlenip anlamlılık görüldü. 120 µg/ mL olarak verilen 10. Dozda p=0.01 olarak belirlenip anlamlılık tespit edildi. 140 µg/ mL olarak verilen 11. Dozda p<0.05 değeri bulunup anlamlılık tespit edildi. 160 µg/ mL olarak verilen 12. Dozda p<0.01 değeri elde edilip anlamlılık görüldü. 180 µg/ mL olarak verilen 13. Dozda p<0.01 değeri bulunup anlamlılık tespit edildi. Sonrasında 200-300-400-500 µg/ mL olarak

artan dozlarda verildiğinde $p < 0.01$ değeri bulunup istatistik açıdan anlamlılık tespit edildi.

4.11 Western Blot Analizi

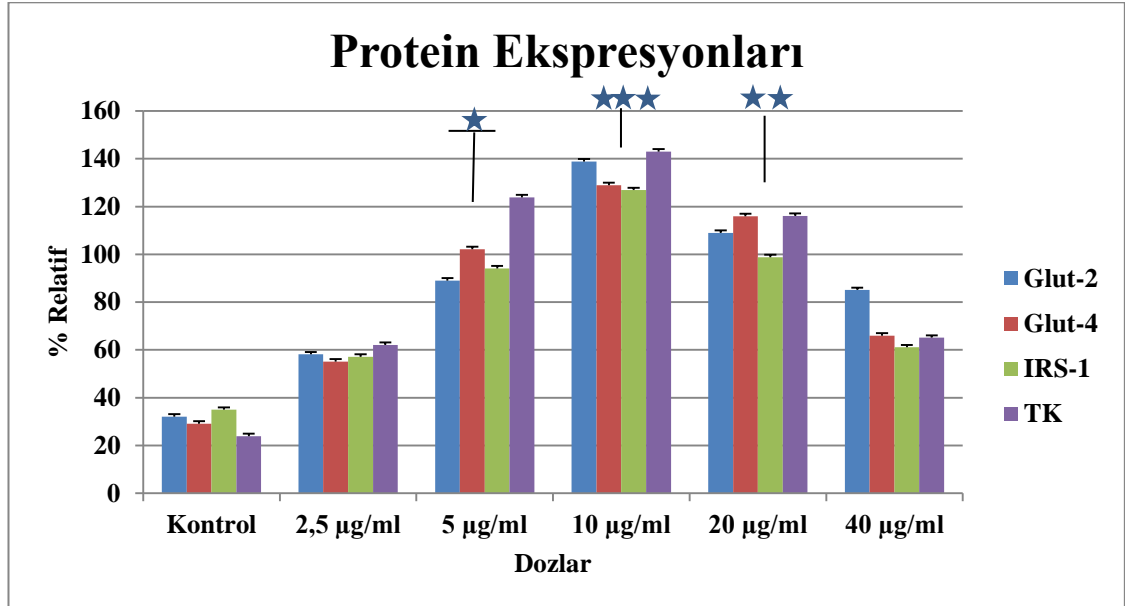
Yapılan protein ekspresyon analizinden elde edilen bulgularda zeytin yaprağı ekstresinin verilen çeşitli dozlarında Hepg2 hücrelerinde IRS-1, Tirozin kinaz reseptörleri, Glut-4 ve Glut-2 transport protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır ve kontrol olarak B-aktin standartı kullanılmıştır. Kontrolde başlanarak 2.5-5-10-20-40 $\mu\text{g/ml}$ zeytin yaprağı ekstresi Hepg2 hücresine verilip reseptör miktarları ölçülmüştür. Glut-2 reseptörüne bakıldığında kontrolde 7.515 μg iken 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 'de 10.911, 5 $\mu\text{g/ml}$ 'de 15.171, 10 $\mu\text{g/ml}$ 'de 20.404 μg artış olup bu değerden sonra verilen dozlarda reseptör ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir. Aynı şekilde 10 $\mu\text{g/ml}$ dozunda verilen ekstreye kadar yüzdeleri de paralel olarak artış göstermiştir. Glut-4 reseptörü incelendiğinde kontrolde 5.14 μg iken 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ekstre verildiğinde 9.20, 5 $\mu\text{g/ml}$ 'da 16.4, 10 $\mu\text{g/ml}$ 'da 19.0 μg kadar reseptör sayısı artmıştır fakat bu dozdan sonra verilen dozlarda reseptör miktarlarında azalma meydana gelmiştir. Yüzdeler karşılaştığında 10 $\mu\text{g/ml}$ ' kadar artış olup sonrasında azalma görülmüştür. IRS-1 reseptörü aktivitesine bakıldığında; kontrolde 7.896 μg iken 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 'de 12.312 μg 'ye artmış olup 5 $\mu\text{g/ml}$ 'da 19.833, 10 $\mu\text{g/ml}$ 'da 21.670'e kadar reseptör sayısı artmıştır. 20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ verilen dozlarda ise düşüş gözlenmiştir. Tirozin kinaz reseptörü incelendiğinde kontrolde 3.511 μg reseptör varken 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 'de 8.713, 5 $\mu\text{g/ml}$ 'de 17.774, 10 $\mu\text{g/ml}$ ekstre verildiğinde ise 21.834 μg olarak reseptör sayısı artmış olup 20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ ekstre dozu verildiğinde hücrelerdeki reseptör sayısında azalma meydana gelmiştir. Her bir reseptör için yüzdeler değerlerde eşit oranda 10 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar artış gösterip bu değerden sonra reseptör sayılarının yüzdelerinde azalma meydana gelmiştir. Bu değerler Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Hepg2 hücrelerine verilen farklı dozlardaki zeytin yaprağı ekstresi sonucunda reseptör sayıları ve yüzdeleri.

Glut-2			Glut-4		
	Area	%		Area	%
Kontrol	7.515	5.873	Kontrol	5.14	5.356
2,5 µg/ml	10.911	10.090	2,5 µg/ml	9.20	9.573
5 µg/ml	15.171	15.108	5 µg/ml	16.4	17.35
10 µg/ml	20.404	21.761	10 µg/ml	19.0	20.21
20 µg/ml	17.828	18.562	20 µg/ml	18.8	19.74
40 µg/ml	12.129	12.605	40 µg/ml	9.37	9.75

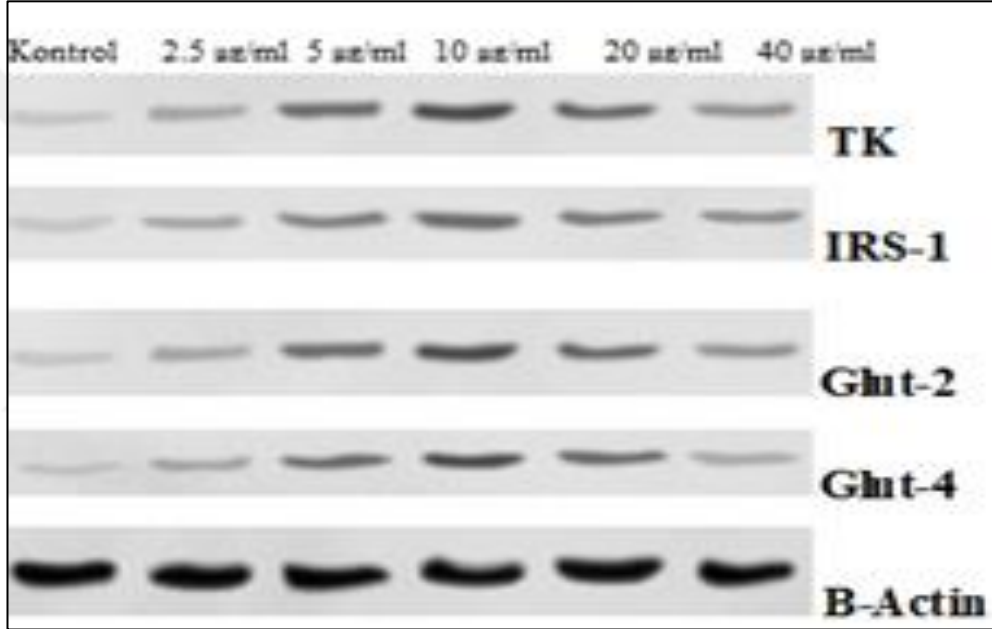
IRS-1		Tirozin Kinaz		β-Actin				
	Area	%	Area	%	Area	%		
Kontrol	7.896	6.3	Kontrol	3.511	4.3	Kontrol	27.419	18.24
2,5 µg/ml	12.312	9.9	2,5 µg/ml	8.713	10.7	2,5 µg/ml	25.986	17.29
5 µg/ml	19.833	15.9	5 µg/ml	17.774	20.9	5 µg/ml	25.464	16.94
10 µg/ml	21.670	19.8	10 µg/ml	21.834	22.4	10 µg/ml	23.576	15.68
20 µg/ml	20.834	16.7	20 µg/ml	16.051	19.8	20 µg/ml	25.610	17.04
40 µg/ml	10.551	9.06	40 µg/ml	6.054	9.6	40 µg/ml	22.23	14.79

Şekil 4.18’de IRS-1, Tirozin kinaz reseptörlerine ve Glut-2, Glut-4 transport proteinlerine ait ekspresyon grafiği gösterilmiştir. 2.5-5.10-20 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi hücrelere verilerek her bir reseptör için incelendiğinde 10 µg/ml zeytin yaprağı ekstresinin reseptörler için ideal bir doz olduğu görülmüştür.



Şekil 4.18 : Zeytin yaprağı ekstresinin farklı dozlarında Hepg2 hücrelerindeki reseptör oranları. (*:p<0.05 **:p<0.01 ***:p<0.001)

Şekil 4.19’da protein ekspresyon analiz sonuçları gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 10 µg/ml’de görülen bant yoğunluğunun bu dozun altında ve üstünde yoğunluğunu kaybettiği görülmektedir. Analiz sonunda zeytin yaprağı ekstresi, Irs-1, Tirozin Kinaz reseptörlerinin, Glut-4 ve Glut-2 transport proteinlerinin sayısını artırmış olup bunun optimum dozunun 10 µg/ml olduğu görülmektedir. Bulgu, Repeated Anova istatistiksel analiz programıyla analiz edilmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslama yapıldığında 5 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi Hepg2 hücresine verildiğinde $p<0.05$ olarak elde edilmiş olup anlamlılık görülmüştür. 10 µg/ml ekstre hücreye verildiğinde $p<0.001$ olup anlamlılık tespit edilmiştir. 20 µg/ml dozunda da $p<0.01$ olarak belirlenip anlamlılık görülmüştür.



Şekil 4.19 : Hepg2 hücrelerindeki tirozin kinaz, Irs-1 reseptörleri ve Glut 4, Glut 2 transport roteini ekspresyonları.

5. TARTIŞMA

Zeytin yaprağı geçmişten günümüze geleneksel tıpta kanser, diyabet gibi birçok hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Zeytin yapraklarından elde edilen oleuropeinin oksidatif stres, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar üzerine etkileri oleuropeinin hiperglisemi ve oksidatif stresi inhibe etme potansiyeli olduğu ve oksidatif stresle ilişkili komplikasyonların önlenmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir [1]. Aynı zamanda diyabetli bireylerde insülin salınımını ve glukozun hücre içerisine alımını artırarak etkili olduğu gösterilmiştir [89]. Ancak glukozun hücre içine alınımını sağlayan reseptörlerin ve transport proteinlerin etki mekanizmalarına dair yeterince bilgi mevcut değildir. Verilen zeytin yaprağı ekstresinin reseptörler ve transport proteinler üzerindeki etkili dozu da tam olarak bilinmemektedir. Bu alışma; kontrol ve deney grubu insan hepatoselüler karsinoma hücrelerine çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinin; terapötik etkinlikleri konusunu, glukozun hücre içine girişini sağlayan reseptörleri ve transport proteinlerinin ekspresyon seviyelerini anlamak, ve günümüzde tedavi seçeneklerine dair çeşitli yaklaşımlar olan Tip II Diyabetli hastalar için, zeytin yaprağı ekstresinin, hücre içine glukoz girişini sağlayan reseptörleri ve bu reseptörlerin protein ekspresyonunu ne derece etkilediği hakkında bilgi vermek, medikal tedaviye desteğini de kanıtlamak amacıyla yapılmıştır.

Zeytin yaprağından izole edilen oleuropeinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada oleuropeinin verilen 3 grup erkek tavşandan birinci grup sağlıklı hayvanlardan, ikinci grup tedavi almayacak olan diyabetli hayvanlardan ve nc grup oleuropein verilecek diyabetli tavşanlardan oluşturulmuştur. 16 haftanın sonunda oleuropein verilen tavşanlarda kan glukoz seviyesinde anlamlı düşüş gözlenirken kontrol grubundaki diyabetli tavşanlarda anlamlı düşüş tespit edilmemiştir [2]. Son yıllarda yapılan araştırmalar, zeytinyağı kadar zeytin yaprağı ekstrelerinden elde edilen bileşiklerin antihipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, antimikrobiyal, antiviral, antitümöral, anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [90,91]. Bu bağlamda zeytin yaprağı

ekstresinin insülin salınımını sağlayan mekanizmayı olumlu yönde etkilediği deney hayvanlarında gösterilmiş olup tez çalışmamızda Hepg2 hücrelerine verilen zeytin yaprağı ekstresinin insülin reseptörünü artırmasıyla paralellik göstermiştir.

Çalışmamızda ekstrelerin total fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gallik aside eşdeğer olarak belirlenirken [83] flavonoid içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlenmiştir [84]. Ekstrelerin fenol ve flavanoid tayinleri sonucunda total fenolik içerikte yüksek antioksidan aktiviteyi metanol organik çözücüsünde gösterdiği görülürken, total flavanoid içeriğinde diklorometan organik çözücüsünde gösterdiği ancak metanolla ekstraksiyonun da diklorometan çözücüsüne yakın olduğu görüldü. Literatürde yapılan bir çalışmada;Tunus zeytin çeşitlerinden Chetoui zeytin çeşidi yaprağı ekstratında çözücü tipinin fenolik ve antioksidan faaliyetlerine etkisi araştırılmıştır. Oda sıcaklığında 4 farklı çözücü (iyonu giderilmiş su (ddH₂O)), %80 metanol, %70 etanol ve %80 aseton ile hazırlanan ekstrelerde toplam fenol ve toplam flavonoid sırasıyla Folin-Ciocalteu ve alüminyum klorür kolorimetrik yöntemlerini kullanılarak ölçülmüştür. Antioksidan özellikleri, DPPH ve ABTS olmak üzere iki antioksidan aktivite yöntemi tarafından belirlenmiştir. Sonuç olarak metanol çözücülü ekstrelerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu dile getirmişlerdir [92]. Aynı zamanda literatürde %80 metanol, %70 etanol, %80 aseton organik çözücüleri kullanılarak yapılan, antioksidan özelliklerin belirlendiği ve yüksek antioksidan aktivitenin metanol organik çözücüsüyle yapılan ekstraksiyonda olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [93,94,95].

Çalışmamızda bir diğer antioksidan yöntemi olan ABTS'de Miller ve Rice-Evans'ın uyguladığı yönteme göre bir gece önceden hazırlanıp karanlıkta bekletilen ABTS çözeltisi hazırlanarak belirlenmiştir [87]. Yöntemin sonucunda en yüksek antioksidan aktivitenin bütil hidroksi asetat çözücüsünde olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada Portekiz'de yetiştirilen önemli zeytin çeşidinden zeytin, zeytin yaprağı ve zeytin çekirdeğinin fenol bileşenleri ve ABTS yöntemi kullanarak antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Zeytin yaprağını taze ve kurutulmuş olarak toplam fenol içeriği 17 ve 40 g/kg tannik asit olarak belirlenmiştir. Kurutulmuş zeytin yaprağı içindeki antioksidanın daha yüksek olduğu görülmüştür ayrıca zeytinlerin antioksidan aktivitesinin yapraklardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ve zeytin çekirdeklerinin de yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu

sonuçlar tez çalışmamızda kullandığımız zeytin yaprağı ekstresinin yanı sıra zeytin çekirdeklerinin de doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceğini göstermektedir [96].

Çalışmamızda hücrelere çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstraktında hücrelerin 2,5 $\mu\text{g/ml}$ 'den 500 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar canlılığına bakıldığında;10 $\mu\text{g/ml}$ 'de maksimum canlılık görülürken 10 $\mu\text{g/ml}$ 'den sonraki değerlerde canlılığın azalmaya başladığını gördük. Hücrelerde önce proliferatif etki görülüp sonra prooksidan etkinin başladığı ve bu sebeple hücre canlılığının azalmaya başladığı tespit ettik. Ekstre dozu 500 $\mu\text{g/ml}$ olduğunda ise hücrelerin %90'ının canlılığını yitirdiğini gördük. Literatürde yapılan bir çalışmada Hepg2 hücrelerine çeşitli dozlarda verilen oleanolik asitte hücre canlılığına bakıldığında 0-1 $\mu\text{mol/L}$ değerleri arasında sabitken 1-75 $\mu\text{mol/L}$ değerleri arasında dalgalanmalar görülmüştür. Konsantrasyon arttığa canlılığın azaldığı optimum konsantrasyonun 1×10^5 hücre olduğu tespit edilmiştir [97]. Beta hücrelerinde insülin sekresyonunda H_2O_2 'nin toksik etkisine karşı zeytin yaprağı polifenollerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; kontrol grup, oleuropein, etanolle ekstraksiyonu yapılan zeytin yaprağı ekstresi pankreatik beta hücrelerine verilip canlılık, katalaz, GSH-px aktivitesine bakılmıştır. Hücre canlılığı değerlendirildiğinde; H_2O_2 konsantrasyonu artırılıp pankreatik beta hücrelerine verildiğinde canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular tez alışmamızda ROS'la canlılık arasındaki güçlü negatif ilişkiyi onaylar niteliktedir. Zeytin yaprağı ekstresi hücrelere verilip konsantrasyonu azaldığında canlılığın da azaldığı; 0.1 mg/L 'de 80 iken 0.01 mg/L 'de 70, 0.001 mg/L 'de 60'a düşmüştür. Bu ekstrenin de optimum dozunun 0.1 mg/l olduğu belirlenmiştir. Oleuropein de ise 0.1 mmol/L 'de 80 iken 0.01 mmol/L 'de 60, 0,0001 mmol/L 'de 50'ye düşmüştür. Sonuçların istatistik analizle anlamlılığı gösterilmiştir. Hücreler optimum 0.035 mM H_2O_2 ile muamele edildiğinde canlılığı azalttığı belirlenmiştir [98].

Literatürde yaban mersini ve bğrtlenin fenolik bileşenlerinin Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada; Pankreas beta hücrelerine yaban mersini ve böğürtlen farklı konsantrasyonlarda verildiğinde hücre canlılığının azalmadığı gösterilmiştir. Hücresel canlılıkları sırasıyla %50 yaban mersini ve böğürtlen antasiyoninde 87.8/%3.6, %50 yaban mersini ve böğürtlen proantasiyoninde 100.4/ %8.8, %100 böğürtlen antasiyoninde 100.0/%14, %100 böğürtlen proantasiyoninde 100.4/%1.7 olmuştur. Sonuçlara istatistik analiz

yapıldığında anlamlılık görülmüştür. Ayrıca çalışmada fenolik bileşenlerin VEGF, IGF-II proteinlerinin regülasyonunun artırıp insülin reseptör sinyallerinin de artışına bağlı olarak insülin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda; Hepg2 hücrelerine verilen çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresinin hücre içine insülin girişinden sorumlu reseptörlerin ve transport proteinlerin miktarını artırdığı gösterilmiştir.

Tip 2 diyabet genellikle insülin duyarlılığının az olması ve pankreatik beta hücrelerinin insülin salgılamasındaki yetersizliği ile ortaya çıkmaktadır [99,100]. Yapılan bir çalışmada rastgele seçilmiş orta yaşlı şişman erkeklerde zeytin yaprağı polifenollerinin insülin duyarlılığına etkilerine bakılmıştır. Çalışmada kontrol gruba plasebo verilip deney grubuna zeytin yaprağı ekstresi içeren kapsülleri 12 hafta boyunca verilmiştir. Pankreatik beta hücresinden insülin salgılanması ve insülin duyarlılığı önemli ölçüde artmıştır. Ve tip 2 diyabetin sebep olduğu metabolik bozukluklar beraberinde ortadan kalkmıştır. %15 oranında plasebo grubunda insülin duyarlılığı görülürken %28 oranında zeytin yaprağı ekstresi verilen hastalarda insülin duyarlılığı gelişmiştir [101]. Biz çalışmamızda hücre kültürü yaparak zeytin yaprağı ekstresinin sitotoksik etki göstermeden en etkili dozunu bulmayı hedefledik ve bulduğumuz bu doz gerek insülin reseptörlerinin gerekse transport proteinlerin ekspresyonunu maksimum düzeyde artırdığından sonraki çalışmalar hem deney hayvanlarıyla hem de insanlarla da ilaç olma potansiyeli göz önüne alınarak çalışılabilir.

Literatürde streptozotosin (STZ) ile diyabet modeli oluşturulan farelerin pankreas adacıklarına zeytin yaprağı ekstraktı verilerek kan glikoz düzeylerine ve histopatolojik değişimlerine bakılan bir çalışmada; toplam 60 erkek fare kullanılarak 20 fare içeren 3 gruba ayrılmıştır. 1. grup kontrol, 2. grup STZ ile diyabet modeli oluşturulan grup, 3. ise STZ ile diyabet modeli oluşturulup zeytin yaprağı ekstresi verilen gruptur. Kontrol gruba ph:7 olmak üzere normal salin çözeltisi verilmiştir. 2. gruba %10 glikoz ve 100 mg/kg STZ intraperitoneal enjekte edilerek hücrelerle 24 saat muamele edilmiştir. 3. grupta ise 100 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulmuş hayvanlara 4 hafta boyunca hergün 0.33 g/kg sulu zeytin yaprağı ekstraktı oral yolla verilmiştir. Hayvanların kan örnekleri toplandıktan sonra pankreas dokuları Boun Solüsyon ile fikse edilmiştir. İlk hafta kan örnekleri kontrol gruba göre

kıyaslandığında STZ ile diyabet oluşturulmuş hayvanların kan glukoz düzeylerinde önemli ölçüde artış görülmüştür. STZ ile diyabet oluşturulup zeytin yaprağı ekstresi verilen hayvanlarda kan glukoz düzeylerinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. STZ ile diyabet modeli oluşturulan hayvanların pankreas adacıklarında hipertrofi görülürken zeytin yaprağı ekstresi verilen hayvanların pankreas adacıklarında boyut değişikliği gözlenmemiş, normal yapılar ve iyi huylu degranülasyon gözlenmiştir. 3. haftada bazı adacıklarda nadir olarak lipid birikimi görülmüş olup birkaç hücrede kan damarlarında genişlemeler ve atrofi gözlenmiştir. 4. haftanın sonunda kan örnekleri kontrol gruba göre kıyaslandığında STZ ile diyabet olan hayvanlarda kan glukoz seviyesi 180 mg/dl iken 2. hafta 120 mg/dl, 3. ve 4. hafta 140 mg/dl gözlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstresi verilen hayvanların kan örneklerinde ise ilk haftada kontrol gruba kıyasla 110 mg/dl iken 2. haftadan 4. haftaya kadar 100 mg/dl olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Çalışma sonucunda hayvanların pankreas hücrelerine verilen 0.35 g/kg zeytin yaprağı ekstresinin kan glukoz seviyesini azalttığı ve beraberinde histopatolojik değişimin gözlenmediği gösterilmiştir [98]. Literatürde deney hayvanları kullanılarak ve özellikle hayvanlarda kan glukozunu ve biyokimyasal değişimlerin ölçüldüğü çalışmalar da referans alınarak çalışmamızda hücre kültürü ile zeytin yaprağı ekstresinin ilaç olma potansiyeli olup olmadığını görmeyi hedefledik. Elde edilen bulgularımız insülinle ilişkili reseptörlerin ve transport proteinlerin ekspresyonunu artırıcı yönde oldu. Bu çıkarımlar da gerek deney hayvanları gerekse hücre kültürü çalışmalarının paralel olarak aynı bulguları verebileceğini gösterdi.

Literatürde yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstresi toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak 1.60 mg gallik asit eş değerleri (GAE)/g kuru ağırlık olarak tahmin edilmiştir. HPLC-DAD ile birlikte nitel ve nicel kompozisyon analizi kullanılarak zeytin yaprağı ekstresi içinde 6 ana bileşik (oleuropein, verbascosin, luteolin-7-O-glucosin, apigenin-7-O glucosin, hidroksitirozol ve tirozol) belirlemiştirlerdir. Yüksek doğal antioksidan potansiyeli olan lutein, sesamol, ellajik asit ve zeytin yaprağı ekstresi serbest radikallerin implike edildiği hastalıklarda yararlı olabilecekleri sonucuna varmışlardır [102]. Buna karşın serbest radikalleri hangi dozlarda minimize ettiği tam olarak bilinmediği için yaptığımız çalışmada zeytin yaprağı ekstresinin, Hepg2 hücrelerine verilen çeşitli dozlarında reaktif oksijen türlerini azalttığı en etkili doz tespit edildi. Ve bu etkili dozun 10 µg/ml

olduğu gösterildi. Ayrıca literatürde sitotoksisite ile ilgili Hepg2 hücreleriyle yapılan çalışmalar mevcuttur [52-53]. Çalışmamızda;hepatoselüler karsinoma hücrelerine çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresi verildiğinde hücre içi reaktif oksijen düzeyleri ölçülmüştür ve elde edilen sonuçlarda;hücreye 2.5 µg/ml’den 500 µg/ml’ye kadar verilen çeşitli dozlarda zeytin yaprağı ekstresinde 2.5 µg/ml’den 10 µg/ml’ye gelene kadar reaktif oksijen düzeyinde azalma olduğu 10 µg/ml’den sonra reaktif oksijen düzeyinin artış gösterdiği ve hücrenin canlılığını yitirdiği görülmüştür. Böylelikle hücreye verilen en etkili dozun 10 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Bu sayısal değer oksidatif stresin de minimum olduğu değer olarak belirlenmiştir. Literatürde zeytin yaprağında bulunan hidroksitirosol ve olropeinin ratlar üzerindeki etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda kan şekerini ve kolesterolü düşürücü etkisi tespit edilmiştir. Yapılan bu deneylerde oksidatif stresi baskılayarak diyabetin yan etkilerini azalttığını da belirtmişlerdir. Zeytin yaprağı ile beslenen diyabetik ratlarda insülin salınımının arttığı, serum glikoz seviyesinin düştüğünü ve antiglisemik indeksin yüksek seyrettiğini belirlemişlerdir [103]. Literatürde yapılan bir çalışmada pankreatik beta hücrelerine kontrol grubu, H₂O₂, oleuropein ve oleuropein ekstresi verilerek GSH-Px aktivitesi değerlendirildiğinde 0.035 mmol/L H₂O₂ ile muameleden sonra H₂O₂ değerı %30 hücrelere verilen zeytin yaprağı ekstresi kontrol grubuna yakın yani %100 değerindeyken, oleuropein verildiğinde %30 olmuştur. H₂O₂’yi parçalayan katalaz enzim aktivitesine bakıldığında pankreatik beta hücrelerinin 0.035 mmol/L H₂O₂ ile muamelesinden sonra ekstre verilen hücrelerde %80 civarında iken oleuropeinde ise %50 olmuştur. ROS aktivitesi ölçüldüğünde; 0.035 mmol/L H₂O₂ ile muameleden sonra hücrelerin ROS aktivitesi %300 iken, hücrelere verilen 0.1 mmol/L oleuropein ve 0.1 mg/mL oleuropein ekstresinde kontrol grubuyla paralel olarak %170 civarındadır. Hem zeytin yaprağı ekstres, hem de oleuropein verildiğinde ROS’un azaldığı görülmüştür. Bu da zeytin yaprağının polifenollerinin, oksidatif strese karşı beta hücre fizyolojisinde düzenleyici rollerinin olduğunu göstermiştir [98]. Biz alışmamızda ROS’un minimum olduğu en etkili dozun 10 µg/ml olduğunu, Hepg2 hücrelerine verdiğimiz zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonunu arttırdığımızda ROS’un arttığını gördük ve ekstrenin sitototoksik etki göstermediği dozu da tespit ettik bu da literatürdeki çalışmalarla, zeytin yaprağı ekstresinin canlılık maksimum seviyedeyken ROS’la arasında güçlü bir negatif ilişki olduğunu onaylar niteliktedir [104].

Geçmişten günümüze yapılan tüm çalışmalar, diyabet ile kanserin ortak patogenetik mekanizmaları olduğunu ve diyabetli bireylerde sağlıklı bireylere oranla bazı kanser tiplerinin daha sık görüldüğünü desteklemektedir. Bunun yanında diyabet tedavisinde kullanılan bazı ajanların da kanser riskini arttırdığına dair bulgular mevcuttur. Her iki hastalık arasındaki ilişkiye dair ilk bulgu 1934'te diyabetli hastalarda pankreas kanseri sıklığının diyabet olmayan bireylere kıyasla daha yüksek olduğunun fark edilmesi ile elde edilmiştir [55]. Yakın zamanda yayınlanan ve sülfonilürelerin kullanıldığı 18 çalışmayı içeren bir analizde sulfonilüre kullanımının kanser riskini arttırdığı belirtilmiştir [64]. Risk artışının pankreas, karaciğer ve endometrium kanserinde en yüksek olduğu belirlenmiştir. Birçok epidemiyolojik çalışmada, tip 2 diyabetin hepatoselüler karsinoma gelişme riskini 2-3 kat arttırdığı gösterilmiştir [56,57]. Tez çalışmamızda karaciğer kanser hücrelerinde insülin transport proteinleri olan GLUT tiplerinin çoğunun çalışılabilmesi ve daha çok hücre soyu üretilmesi gibi özellikleri nedeni ile Hepg2 hücreleri kullanılmıştır. Hepg2 hücrelerinin diğer hücre hatlarına göre kültüre edilmesi daha kolay olduğu için oldukça avantajlı yönleri olması çalışmamızda Hepg2 hücrelerini tercih etmemizi sağlamıştır. Literatürde gösterilen antidiyabetik ajanların da kanserleşmeye sebep olduğu gerekçeleri dikkate alınarak tez çalışmamızda Hepg2 hücrelerine verdiğimiz yüksek dozda zeytin yaprağı ekstresinin de antikanser özelliğinden faydalanabileceğimizi gördük. Çalışmamızda zeytin yaprağı metanolla ekstraksiyon sonucunda Hepg2 hücrelerine verilip apoptotik, canlı ve nekrotik hücrelere bakıldığında; Hücrelere 2.5 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile başlanıp 5-10-20-40-60-80-100-120-140-160 µg/ml ekstre verilip sonuçlar incelenmiştir. Kontrol grubu ile başlanarak hücre canlılığına bakıldığında zeytin yaprağı ekstresi miktarı artırıldıkça canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Bu değer 40 µg/ml'ye kadar sabit kalıp sonrasında miktar artırıldıkça canlılığın azaldığı görülmüştür. Hücrelerin apoptoz testine bakıldığında zeytin yaprağı ekstresi miktarı arttıkça apoptoza uğrayan hücrelerin kademeli olarak arttığı görülmüştür. Hücrelerde 40 µg/ml dozdan sonra artış olduğu tespit edilmiştir. Nekroza uğrayan hücrelere bakıldığında;40 µg/ml'den sonra hücrelerin canlılığını yitirdiği ve dolayısıyla hücrelerin ölümünün gerçekleştiği görülmüştür. Yani çalışmamızda zeytin yaprağının apoptotik etkisine bakarken genotoksik ve apoptotik etkiyi maksimum hangi doza kadar gösterdiğini görmeyi hedefledik. 10 µg/ml'ye kadar genotoksik ve apoptotik etki göstermediği ancak 40 µg/ml'ye kadar da ekspresyon yaptığı görüldü. 40 µg/ml'den sonra sitotoksik etki görülmeye başlandı.

Bu bulgular bize zeytin yaprağı ekstresini yüksek dozda kullandığımızda antikanser özelliğinden de yararlanabileceğimizi gösterdi. Literatürde yapılan bir çalışmada; pankreatik beta hücrelerine oleuropein, zeytin yaprağı ekstresi ve H₂O₂ verilip nekrotik, apaptotik olan hücrelere bakıldığında; hücreler 0.035 mmol/L H₂O₂ ile muamele edilip 0.1 mg/ml zeytin yaprağı ekstresi, 0,1 mmol/L oleuropein ekstresi verildiğinde ekstredeki nekrotik hücre sayısının azaldığı görülmüştür. Pankreatik beta hücreleri H₂O₂ ile muamele edilince nekrotik hücreler %40 iken oleuropeinde %30, ekstrede %15'e düşmüştür. Hücrelerde canlılık değerleri ise 0.1 mg/L ekstre verildiğinde %60, 0.1 mmol/L oleuropeinde %45, 0.035 mmol/L H₂O₂'de ise %30'a düşmüştür. Çalışmada apoptotik hücrelere bakıldığında; kontrol grupla kıyasla 0.1 mg/L ekstre verildiğinde %25, 0.1 mmol/L oleuropeinde %20, 0.035 mmol/L H₂O₂'de ise %25 olmuştur [98]. Bu da pankreatik beta hücreleriyle çalışıldığında ve zeytin yaprağı ekstresi kullanıldığında en etkili dozun 0.1 mg/L olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda Hepg2 hücrelerine çeşitli dozlarda verilen zeytin yaprağı ekstresinde canlılığa baktığımızda ekstre miktarı arttıkça canlılığın azaldığı buna karşın en etkili dozun 10 µg/ml olduğunu gördük. Aynı zamanda bu çalışma canlılık ile ROS aktivitesi arasında güçlü bir negatif etki olduğunu onaylar niteliktedir.

Çalışmamızda yapılan Western Blot protein ekspresyon analizinden elde edilen bulgularda zeytin yaprağı ekstresinin verilen çeşitli dozlarında IRS-1, Tirozin kinaz reseptörleri, GLUT-4 ve GLUT-2 transport protein ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sonuçlar analiz edildiğinde; 10 µg/ml'de görülen bant yoğunluğunun maksimum seviyede olduğu, bu dozun altında ve üstünde bu yoğunluğun azaldığı görülmektedir. Analiz sonunda zeytin yaprağı ekstresi, Irs-1, Tirozin Kinaz reseptörlerinin, GLUT-4 ve GLUT-2 transport proteinlerinin sayısını artırmış olup bunun optimum düzeyinin 10 µg/ml olduğu görülmüştür. Literatürde bu sonuçlara benzer çalışmalar bulunmaktadır. Ancak hem GLUT-2, GLUT-4 transport proteinlerin hem de IRS-1, tirozin kinaz reseptörlerinin birlikte çalışıldığı bir araştırma mevcut değildir. Yapılan bir çalışmada Hepg2 hücrelerine oleanolik asit verilerek IRS-1 reseptörünün, GLUT-4 transport proteininin ekspresyonlarına ve insülin direnci azalmasına bakılmıştır. Ekspresyon analizleri Western Blot tekniğiyle incelenmiştir. Hücrelere çeşitli dozlarda oleanolik asit verildiğinde ve doz miktarı artırıldığında hücre kültürü medyumundaki glukoz miktarının azaldığı görülmüştür

[105,106]. Diğer yandan insülin direnci oluşmasının nedeni, insülinin reseptörü olan IRS-1 ve taşıyıcı protein olan GLUT-4'ün üzerinde etki göstermemiş olmasıdır [45]. Literatürde yapılan benzer çalışma olan Teodoro ve arkadaşlarının bulduğu [105] in vitro hücre kültüründe pankreatik beta hücrelerinde oleanolik asit miktarı artırıldığında insülin sekresyonu ve glukoz kullanımının arttığı yönündedir. Literatürde yapılan bir çalışmada kontrol grup, H₂O₂, oleuropein ve zeytin yaprağı ekstresi INS-1 hücrelerine verilip insülin sekresyonuna bakıldığında kontrol grupla kıyasla optimum 0.035 mmol/L H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde %40 iken, bu muameleden sonra hücrelere oleuropein verildiğinde %90, oleuropein ekstraktında ise %60 civarında olmuştur. İnsülin sekresyonunda oleuropein etkisinin ekstreden daha fazla olduğu görülmüştür. Zeytin yaprağı ekstraktı oleuropeinden daha iyi antisitotoksik etki uyguladasa oleuropeinin insülin salgılamada daha iyi olduğu tespit edilmiştir [98]. Ayrıca beta hücreleri oksidatif strese maruz kaldığında insülin gen ekspresyonu c-Jun N-terminal kinase (JNK) yolakların aktivasyonu ile azaldığı gösterilmiştir [107]. Bu bulgular da bizim çalışmamızdaki reseptör ve transport protein sayısının artması ve hücrelere verilen zeytin yaprağı ekstraktının optimum dozu üstündeki dozlarda canlılığını azaltarak sitotoksik etkiyi artırmasıyla paralellik göstermektedir. Ancak insülin sekresyonunda oleuropeinin, ekstreden daha etkili olduğu da göz önüne alındığında sonraki çalışmalarda ekstre ile birlikte oleuropein de kullanılarak ölçümler yapılması gerektiğini göstermektedir.

Literatürde tez çalışmamızda transport proteinlerin sayısının artmasıyla paralellik gösteren bir çalışmada; insan Hepg2 hücrelerinde, soy glisin hidrolizi ile oluşan Ile-Ala-Val-Pro-Gly-Glu-Val-Ala (IAVPGEVA), Ile-Ala-Val-Pro-Thr-Gly-Val-Ala (IAVPTGVA) ve Leu-Pro-Tyr-Pro (LPYP) üçlü peptitler kullanılmış ve AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) aktivasyonunun etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda glukoz metabolizması da çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda; Bu üçlü peptitlerin Hepg2 hücrelerinde glukozu alım kapasitesini, GLUT-1 VE GLUT-4 aktivasyonunu artırdığını göstermiştir [108]. Tüm bu verilerle yapılan çalışmalara göre Hepg2 hücreleri, glukoz metabolizması çalışmaları model olarak gösterilmektedir.

Literatürde yaban mersini ve böğürtlende fenolik bileşenlerin in vitro hücre kültürü ortamında pankreatik beta hücrelerine verilmesiyle protein ekspresyon seviyesinin ölçüldüğü bir çalışmada; %50 yaban mersini-böğürtlen antasiyonini pankreatik beta

hücrelerine verildiğinde IRS-2 reseptörlerinin regülasyonunu artırdığı görülmüştür. Literatürde yapılan bu çalışmalar zeytin yaprağı, zeytin yaprağı ekstresi, yaban mersini, böğürtlen ve üzümün içerdiği fenollerin, polifenollerin, flavanoidlerin güçlü antioksidan özellik göstermesi nedeniyle Tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılması yönünde referanslar oluşturmaktadır.

Zeytin yaprakları geleneksel olduğu kadar, artık günümüzde de diyabetik hiperglisemi, hipertansiyon ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve özellikle Avrupa'da diyabet ve hipertansiyon için geleneksel bir ilaç olarak kabul edilmektedir. Diyabette oleuropeinin hipoglisemik etkisini açıklamak için, glukozla uyarılan insulin salınımı etkileme potansiyeli ve periferik glukoz alımını artırıcı etkisinin olduğu şeklinde iki mekanizmanın yanı sıra, diyabet ve komplikasyonlarına karşı antioksidan aktivite gösterdiği de ileri sürülmektedir [109].

Olea europaea L. antioksidan, antihipertansif, antiaterojenik, anti-inflamatuar, hipoglisemik ve hipokolesterolemik özelliklere sahip olabilen pek çok potansiyel biyoaktif bileşik içerirler. Zeytin yaprağı vücudu sürekli aktif serbest radikallerden korumaya yardım eden antioksidan özellikleri barındırır. Zeytin yaprağı ekstresi; konsantre sıvı, toz, kapsül ve kuru yaprak çayı olarak değişik diyet içeriklerinde bulunmaktadır [109]. Zeytin yapraklarının insan sağlığı üzerine potansiyel yararlı etkilerini destekleyen kanıtlar bulunmaktadır [110].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tip II Diyabet, gelişmiş toplumlarda sıklıkla görülen kronik metabolik bir hastalıktır. Bu hastalık için genel olarak medikal müdahale uygulanmaktadır, bunun yanı sıra geleneksel tıpta diyabetin tedavisinde zeytin yaprağı da yaygın olarak kullanılmaktadır. Zeytin yaprağının önemli bir etken maddesi olan 'oleuropeinin' diyabetli bireylerde sıkça görülen kalp yetmezliği, damar tıkanıklığı gibi komplikasyonları önlediği; ayrıca zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin damar içi plak oluşumunu engellediği ve bireylerde kan glukoz seviyesinde anlamlı düşüş sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte etki mekanizmalarına ait yeterince bilgi mevcut değildir.

Çalışmamızda in vitro hücre kültürü ortamında zeytin yaprağı ekstresi Hepg2 hücrelerine verilerek Irs-1, Tirozin Kinaz reseptörleri, GLUT-4 ve GLUT-2 transport protein ifadeleri üzerine etkileri araştırıldı. Böylece hem reseptör hem de transport proteinlerin ekspresyonlarının maksimum düzeyde arttığı en etkili doz belirlendi. Bu kapsamda yapılan protein ekspresyon analizinden elde edilen sonuçlarda; 10 µg/ml'de görülen bant yoğunluğunun maksimum seviyede olduğu, bu dozun altında ve üstünde ekspresyonun azaldığı görüldü. Analiz sonunda zeytin yaprağı ekstresi, Irs-1, Tirozin Kinaz reseptörlerinin, GLUT-4 ve GLUT-2 transport proteinlerinin ekspresyonunu artırmış olup bunun optimum düzeyinin 10 µg/ml olduğu belirlendi.

Geçmişten günümüze yapılan tüm çalışmalar, diyabet ile kanserin ortak patogenetik mekanizmaları olduğunu ve diyabetli bireylerde sağlıklı bireylere oranla bazı kanser tiplerinin daha sık görüldüğünü desteklemektedir. Bunun yanında diyabet tedavisinde kullanılan bazı ajanların da kanser riskini arttırdığına dair bulgular mevcuttur [55]. Literatür çalışmalarının da referansıya tez çalışmamızda zeytin yaprağı ekstresinin hangi dozunda apoptoza ve nekroza uğrayan hücrelere baktığımızda 10 µg/ml'ye kadar genotoksik ve apoptotik etkinin görülmediği, 40 µg/ml'ye kadar ekspresyonun devam ettiği fakat 40 µg/ml'den sonra verilen dozlarda sitotoksik etkinin başladığını gördük. Böylece zeytin yaprağı ekstresini yüksek dozda kullandığımızda aslında antikanser özelliğinden de yararlanabileceğimizi gördük. Bu çalışma hücre kültürü

ortamında yapılarak zeytin yaprağı ekstresinin ilaç olma potansiyeli olup olmayacağı araştırılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda 10 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi referans olarak kullanılabilir. Aynı zamanda glukozun hücre içine girişini sağlayan reseptörlerin ve transport proteinlerin etki mekanizmalarını anlamaya yönelik gerek deney hayvanlarıyla gerekse hücre kültüründeki çalışmaların sayısı da artırılabilir.

Geleneksel tedavide kullanılan zeytin yaprağının çok az yan etki ile tedavi edici etkinlik göstermesi modern tedavide de kullanılmaya aday yapmaktadır. Ülkemizin potansiyeli de dikkate alındığında, oleuropein eldesi ve oleuropein ile yapılacak bilimsel çalışmalarda Türkiye oldukça önemli bir yere sahiptir. Yapılmış çalışmalar göz önüne alındığında, oleuropeinin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve günümüzde yeni ilaçların geliştirilmesine ışık tutacağı ayrıca eczacılık teknolojisiyle buluşturulup daha etkili formülasyonların geliştirilip standart farmasötik formlarda sunulmasının bilim dünyası ve ülke ekonomisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Al-Azzawie HF, Alhamdani MS.** (2006). *Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits.* Life Sci.; 78: 1371-1377.
- [2] **Wahrburg U, Kratz M, Cullen P.** Mediterranean diet, olive oil and health. Eur J Lipid Sci Technol. 2002; 104: 698-705.
- [3] **Başkal N.** (2003). *Diabetes Mellitus Tanım, Klasifikasyon, Tanı, Klinik, Laboratuvar ve Patogenez.* Ankara: Antıp A.Ş.
- [4] **Akçay G, Akarsu E.** (2000). *Endokrin ve Metabolizma Hastalıkları.* Erzurum: Aktif Yayıncılık.
- [5] **Şahin DY, Elbasan Z, Gür M, et al.** Relationship between oxidative stress markers and cardiac syndrome X. J Clin Exp Invest 2012;3:174-180.
- [6] **Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al.** Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:4405-4409.
- [7] **Gutteridge JM.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995;41:1819-1828.
- [8] **Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Alcaraz M.** (2002). *Radioprotective effects in vivo of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves against X-ray-induced chromosomal damage: comparative study versus several flavonoids and sulfurcontaining compounds.* J Med Food; 5(3):125-35. Epub 2002/12/24.
- [9] **Dobson, R.** (1776). *A Case of a Very Obstinate Ophthalmia, Successfully Treated by an Emetic and the Consequent Use of the Peruvian Bark.* Medical and Philosophical Commentaries, 411-8.
- [10] **Hatemi, H., Turan, N., Arık, N., & Yumuk, V.** (2002). *Türkiye obezite ve hipertansiyon taraması sonuçları (TOHTA).* Endokrinolojide Yönelişler Dergisi, 11(1), 1-16.
- [11] **Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... & Matthews, D. R.** (2012). *Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD).* Diabetologia, 55(6), 1577-1596.
- [12] **Avcı A.** (2001). *Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi ve Vitaminin Etkileri.* Ankara Üni. Tıp Fak. ,Ankara.
- [13] **Sacks D.** (2005). *Karbonhidratlar.* In: Burtis CA, Ashwood ER, Sacks D, editors. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. p. 427-62.
- [14] **Fagot-Campagna A, Narayan KM, Imperatore G.** *Type 2 diabetes in children.* BMJ 2001; 322(7283):377-8. Epub 2001/02/17.)

- [15] **Champel PC, Harvey RA.** (1997). *Biyokimya*: Lippincott Company.
- [16] **Yılmaz B.** (1999). *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*. Ankara: Feryal Matbaacılık.
- [17] **Gallagher, A.M.,P.R.Flatt.** (2003). *The effect of traditional antidiabetic plants on invitro glukose diffusion*. Nutrition Research 23, 413-424.
- [18] **Colowick, S.P., and Kaplan, N.O.** (1965). Methods in enzymology, Acad. Press Inc. Publishers, New York, I, pp. 835.)
- [19] **Davis, P.H.,** (1984). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Edinburg*, 7, 947.
- [20] **Groner PK.** (1996). *Hormones of the Pancreas & Gastrointestinal tract Harper's Biochemistry*. p. 581-98.
- [21] **Larner J.** (1985). *İnsulin and oral hiperglycemic drugs, glucagon*. In: Brunton LL, editor. Goodman and Gilman's the pharmacological basis therapeutics. 7 ed. New York. p.1490-516.
- [22] **A.S.** (2000). *Türkiyede Halk Arasında Diabetes Mellitus Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Mersin Uçucu Yağı (Myrtu oleum) Üzerine Biyokimyasal Çalışmalar*. Gazi Üniversitesi.
- [23] **Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J.,** 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. Angew Chem Int Ed Engl 44, 7342-7372.
- [24] **Guo, S.,** Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. J Endocrinol, 2014. 220(2): p. T1-T23.
- [25] **Ng, S.Y., Chaban, B., Jarrell, K.F.,** 2006. Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: a comparison of genes and posttranslational modifications. J Mol Microbiol Biotechnol 11, 167-191
- [26] **Pusztai, A., Ewen, S.W., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., Coates, M.E., Bardocz, S.,** 1995. Lectins and also bacteria modify the glycosylation of gut surface receptors in the rat. Glycoconj J 12, 22-35.
- [27] **Pedersen O, Bak JF, AndersenPH.** Evidence against altered expression of GLUT 1 or GLUT 4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. Diabetes 1990;39:865-70.
- [28] **Lippincott's Illustrated Review:Biochemistry**, second Edition, by Pamela C. Champe and Richard A, Harvey, J.B. Lippincott company, PA,1994, 269-277.
- [29] TDÖKP-EP 2011.
- [30] **Satman I, Yılmaz MT, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S et al.** (2002). *Population based study of diabetes and risk characteristics in Turkey. Results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP)*. Diabet Care 25, 1551–1556.
- [31] Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması II (TURDEP II) sonuçlarının özeti, 2011.

http://www.istanbul.edu.tr/itf/attachments/021_turdep.2.sonuclarinin.aciklamasi.pdf. adresinden 21 Aralık 2017 tarihinde erişilmiştir.

- [32] TDÖKP-EP 2011, WHO 2011.
- [33] Durusoy Ç, (2007). *Ulusal BG. Dermatolojide Bitkisel tedaviler.*, Fitoterapi. Türk Dermatoloji Dergisi;1:47-50.
- [34] Kurt E, Bavbek S, Pasaoglu G ve ark. *Use of alternative medicines by allergic patients in Turkey*. Allergol Immunopathol 2004;32:289-94.
- [35] Toroğlu, S., & Çenet, M. (2006). *Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar*. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2), 12-19.
- [36] Özçelik H. (2009), <http://nccam.nih.gov/2011>.
- [37] Amiot MJ, Tacchini M, Fleuriet A, Macheix JJ. (1990). *The technological debittering process of olives: characterization of fruits before and during alkaline treatment*. Sci Aliments;10:619-32.
- [38] Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic (1998). *Compounds in Different Olive Varieties*. J Agric Food Chem; 46(1): 32-5. Epub 2001/02/07.
- [39]. Ryan D, Robards K, Lavee S. (1999). *Changes in phenolic content of olive during maturation*. Int J Food Sci Technol; 34(265-274).
- [40]. Sanchez JC, Alsina MA, Herrlein MK, Mestres C. (2007). *Interaction between the antibacterial compound, oleuropein and model membranes*. Colloid Polym Sci; 285:1351-60.
- [41] Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D, Di Fonzo V. (2006). *Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.)*. J Agric Food Chem; 54(2):434-40. Epub 2006/01/19.
- [42] Benavente-Garcia J, Castillo J, Lorente A, Ortuno A, Del Rio JA. (2000). *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves*. Food Chem; 68(4): 457-62.
- [43] Driss et al., 1996; Ficarra et al., 1991; Le Tutor et al., 1992; Visioli et al., 1998.
- [44] Garcia, N., Munoz, M., & Zhao, Y. W. (1999). *Magnetoresistance in excess of 200% in ballistic Ni nanocontacts at room temperature and 100 Oe*. Physical Review Letters, 82(14), 2923.
- [45] Panizzi, L., Scarpati, M. L., & Orient, G. (1960). *The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action*. Gazz. Chim. Ital, 90, 1449-85.
- [46] Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes. (2002). *Oxidative stress and physical exercise*. Journal of Sports Science and Medicine; 1:1-14.
- [47] Davidson VL, Sittman DB. (2000). *Biyokimya*. İstanbul: Nobel.
- [48] Çiğremiş Y, Köse M, Özüurlu F, Türköz Y, Eğri M. (2003). *Tip I Diabetes Mellitus'lu Hastaların Eritrosit İçi Cu,Zn-SOD, CAT ve GSH-Px Antioksidan Enzim Düzeylerinin Araştırılması*. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 16:239-44.

- [49] **Pereira JA, Pereira AP, Ferreira IC, Valentao P, Andrade PB**, (2006). *Seabra R, et al. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. J Agric Food Chem; 54(22):8425-31. Epub 2006/10/26.*
- [50] **Komaki E, Yamaguchi S, Maru I, Kinoshita M, Kakehi K, Ohta Y, et al.** (2003). *Identification of anti-alpha-amylase components from olive leaf extracts. Food Sci Technol Res;9(1):35-9.*
- [51] **Dehn, P., White, C., Connors, D., Shipkey, G., Cumbo, T.** (2004). TOXICOLOGY/CHEMICAL CARCINOGENESIS-Characterization of the Human Hepatocellular Carcinoma (HEPG2) Cell Line as an In Vitro Model for Cadmium Toxicity Studies. In *Vitro-Cellular and Developmental Biology Animal Section*, 40 (5-6), 172.
- [52] **Lee, M., Cheng, B., Che, C., Hsieh, D.** (2000). Cytotoxicity assessment of Ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation. *Toxicological Sciences*, 56 (2), 424-430.
- [53] **Park, K.J., Yang, S., Eun, Y.A., Kim, S.Y., Lee, H.H., Kang, H.** (2002). Cytotoxic effects of Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmaceutical biology*, 40 (3), 189-195.
- [54] **Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Osame K, Noda M.** Latest insights into the risk of cancer in diabetes. *J Diabetes Investig* 2013;4:225-232.
- [55] **Marble A.** Diabetes and cancer. *N Engl J Med* 1934;211:339-349.
- [56] **Wang P, Kang D, Cao W, Wang Y, Liu Z.** Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev* 2012;28:109-122.
- [57] **Wang C, Wang X, Gong G, et al.** Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2012;130:1639-1648. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26165>.
- [58] **Balbi M, Donadon V, Ghersetti M, et al:** Alcohol and HCV chronic infection are risk cofactors of type 2 diabetes mellitus for hepatocellular carcinoma in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:1366-1378. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7041366>.
- [59] **Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH.** Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012;56:1384-1391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.027>.
- [60] **Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, et al:** Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1103-1123. <http://dx.doi.org/10.1677/ERC-09-0087>.
- [61] **Wiencke JK.** Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4: 79-84. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1257>
- [62] **Ryu TY, Park J, Scherer PE.** Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J* 2014;38(5):33-6. <http://dx.doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.330>

- [63] **Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G.** Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol Chem* 2009;390:965-976.<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2009.111>.
- [64] **Thakkar B, Aronis KN, Vamvini MT, Shields K, Mantzoros CS.** Metformin and sulfonylureas in relation to cancer risk in type II diabetes patients: a meta-analysis using primary data of published studies. *Metabolism* 2013;62:922-934.<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.014>.
- [65] **Soranna D, Scotti L, Zambon A, et al.** Cancer risk associated with use of metformin and sulfonylurea in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Oncologist* 2012; 17:813-822.<http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0462>.
- [66] **Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, et al.** Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 2010;33:322-326.<http://dx.doi.org/10.2337/dc09-1380>
- [67] **Stevens RJ, Ali R, Bankhead CR, et al.** Cancer outcomes and all-cause mortality in adults allocated to metformin: systematic review and collaborative meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetologia* 2012;55:2593-2603.<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2653-7>.
- [68] **Doğan AL, Güç D.** (2004). *Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser*. Hacettepe Tıp Dergisi; 35(1):34-42.
- [69] **Bhise SB, Nalawade AD, Wadhawa H.** (2004). *Role of protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapeutics*. Indian J Biochem Biophys; 41(6):273-80.
- [70] **Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A.,** (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26(4).
- [71] **Özyürek M., Güçlü K., ve Apak R.,** (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. Trends in Analy. Chem., vol:30, 4.
- [72] **Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik E.S., Bektaşoğlu B., Berker I.K. ve Özyurt D.** (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12.
- [73] **Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A., Bora U.,** (2008). Indian Medicinal herbs as sources of antioxidants. *Science Direct, Food Research*, 41.
- [74] **Huang D., Ou B., Prior R.L.,** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 53.
- [75] **Mot C.A., Dumitrescu S.R., Sarbu C.,** (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-VIS spectroscopic data, *Journal of Food Composite and Analysis*, 24.

- [76] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E.** (2004). *Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method.* Journal of agricultural and food chemistry, 52(26), 7970-7981.
- [77] **Miller N.J., Rice E.C., Davies M.J., Gopinathan V., and Milner A.,** (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84.
- [78] **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., ve Rice E.C.,** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biology and Medicine*. 26.
- [79] **Prior R.L., Wu X., Karen S.,** (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 53.
- [80] **Temizkan G.** (1999). ‘Genetik II. Moleküler Genetik’. İstanbul Üniversitesi Yayınları. Sayı:4067. Fen Fakültesi No:245.
- [81] **Burnette WN.** “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
- [82] **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- [83] **Espinosa, A., & Santacruz, S.** (2017). Phenolic compounds from the peel of *Musa cavendish*, *Musa acuminata* and *Musa cavandanaish*. *Revista Politécnica–Enero*, 38(2).
- [84] **Fernández, J. E., & Moreno, F.** (2000). Water use by the olive tree. *Journal of crop production*, 2(2), 101-162.
- [85] **Şahin, S., & Bilgin, M.** (2017). Selective adsorption of oleuropein from olive (*Olea europaea*) leaf extract using macroporous resin. *Chemical Engineering Communications*, 204(12), 1391-1400.
- [86] **Blois, M. S.** (1958). *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.* nature, 181(4617), 1199-1200.
- [87] **Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- [88] www.istatistikmerkezi.com.
- [89] **Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S.** (2012). *An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine; 320-330.
- [90] **El SN, Karakaya S.** (2009). *Olive tree leaves: potential beneficial effects on human health.* Nutr Rev.; 67(11): 632-8.
- [91] **Visioli F, Poli A, Gall C.** (2002). *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil.* Med Res Rev.; 22(1): 65-75. 7.

- [92] **Abaza, L., Youssef, N. B., Manai, H., Haddada, F., M., Methenni, K., Zarrouk M.,** (2011)—Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities, *Grasas Y Aceites*, 62 (1), 96-104.
- [93] **Shahidi, F.** (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Molecular Nutrition & Food Research*, 44(3), 158-163.
- [94] **Rumin, M., Smajdor, J., Paczosa-Bator, B., & Piech, R.** (2016). Voltammetry and Flow Injection Analysis with Amperometric Detection for Sensitive Sodium Metamizole Determination on Glassy Carbon Electrode Modified with SWCNTs/Nafion. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 5(8), M3005-M3011.
- [95] **Arvanitoyannis, I. S., Kassaveti, A., & Stefanatos, S.** (2007). Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(3), 187-229.
- [96] **Silva, J., Chambers, I., Pollard, S., & Smith, A.** (2006). *Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion.* *Nature*, 441(7096), 997-1001.
- [97] **Li, Ming, et al.** "Oleanolic acid attenuates insulin resistance via NF- κ B to regulate the IRS1-GLUT4 pathway in HepG2 cells." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015 (2015).
- [98] **Cumaoglu, A., Rackova, L., Stefek, M., Kartal, M., Maechler, P., & Karasu, Ç.** (2011). Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β cells. *Acta Biochim. Pol*, 58, 45-50.
- [99] **Ferrannini E** (1998) Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulindependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477–490.
- [100] **Gerich JE** (1998) The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulinsecretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19: 491–503.
- [101] **Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C. G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., ... & Crozier, A.** (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of toxicology*, 88(10), 1803-1853.
- [102] **Hayes, J. E., Allen P., Brunton N., O'Grady M. N., Kerry J. P.,** (2011). —Phenolic Composition and $\dot{G}n$ -Vitro Antioxidant Capacity of Four Commercial Phytochemical Products: Olive Leaf Extract (*Olea europaea* L.), Lutein, Sesamol and Ellagic Acid, *Food Chemistry*, 126, 948–955.
- [103] **Eidi, A., Eidi, M., & Darzi, R.** (2009). *Antidiabetic effect of Olea europaea L. in normal and diabetic rats.* *Phytotherapy Research*, 23(3), 347-350.
- [104] **Badi Sherahi, M. H., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Hashemi, S. M. B.** (2018). Effect of *Lactobacillus plantarum* on olive and olive oil quality during fermentation process. *LWT*, 89, 572-580.

- [105] **T. Teodoro, L. Zhang, T. Alexander, J. Yue, M. Vranic, and A. Volchuk,** (2008), “Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic - β cells,” *FEBS Letters*, vol. 582, no. 9, pp. 1375–1380.
- [106] **P. Han, Y.-Y. Zhang, Y. Lu, B. He, W. Zhang, and F. Xia,** (2008), “Effects of different free fatty acids on insulin resistance in rats,” *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, vol. 7, no. 1, pp. 91–96.
- [107] **Pral, O.W., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., ... & Stennard, F. A.** (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell*, 128(5), 947-959.
- [108] Three Peptides from Soy Glycinin Modulate Glucose Metabolism in Human.
- [109] **Armutcu, F., Akyol, S., Hasgöl, R., & Yiğitoğlu, M. R.** (2011). *Zeytin Yaprağının Biyolojik Etkileri ve Tıpta Kullanımı*. Spatula DD, 1(3), 159-65.
- [110] **Saenz** 1998, **Visioli** 1998, **Miles** 2005, **Visioli** 2002, **Al-Azzawie** 2006, **Andreadou** 2006, **Fki** 2005, **Jemai** 2008, **Khayyal** 2002, **Lasserre** 1983, **Eidi** 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Burçin KASAP
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.10.1993, Fatih
E-posta : burcinnkasap@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Lisans** : 2015-halen, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi, Konaklama İşletmeciliği
- **Yüksek lisans** : 2018, Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji

MESLEKİ DENEYİMLER:

- 05.08.2013-21.08.2013 : İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarı
- 30.06.2014 – 18.07.2014 : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Enstitüsü
- 08.08.2014 -18.08.2014 : Özel Fulya Bahçeci Tüp Bebek Merkezi

SERTİFİKALAR

- Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 09-23 Şubat, 2013
- İÜGEN İstanbul Üniversitesi 7-8-9 Mart, 2014
- İÜGEN İstanbul Üniversitesi 8-9-10 Mart, 2013
- Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu 8, Boğaziçi Üniversitesi, 23-24 Mart, 2013
- Küçükçekmece Anadolu Lisesi Spor Klübü Basketbol Hazırlık Kampı, 15.06.2010-15.07.2010

PROJELER

- *Schizosaccharomyces pombe*'de Hücre Döngüsü üzerine Mg Kısıtlamasının Etkisi
- Tübitak 2209/A Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı