



**OLEA EUROPAEA (ZEYTİN) AİLESİNDEN HATAY YÖRESİNE ÖZGÜ
“HALHALI” TÜRÜNÜN MEYVE, YAPRAK VE ÇEKİRDEK EKSTRELERİNİN
ANTİOKSİDAN VE ANTİTROMBOTİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.**

Kadir BATÇIOĞLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof.Dr. F. Zehra Küçükbay

Yüksek Lisans Tezi-2019

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLEA EUROPAEA (ZEYTİN) AİLESİNDEN HATAY YÖRESİNE ÖZGÜ
“HALHALI” TÜRÜNÜN MEYVE, YAPRAK VE ÇEKİRDEK
EKSTRELERİNİN ANTIOKSİDAN VE ANTİTROMBOTİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Kadir BATÇIOĞLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Tez Danışmanı
Prof.Dr. F. Zehra Küçükbay

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/143 Yüksek Lisans Proje numarası ile desteklenmiştir.

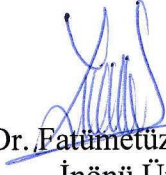
MALATYA

2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Kadir BATÇIOĞLU'nun " Olea Europaea (Zeytin) Ailesinden Hatay Yöresine Özgü " Halhalı " Türünün Meyve, Yaprak ve Çekirdek Ekstrelerinin Antioksidan ve Antitrombotik Özelliklerinin İncelenmesi "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/08/2019



Prof.Dr. Fatümetüzzehra KÜÇÜKBAY
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Hacı Ali DÖNDAŞ
Mersin Üniversitesi
Üye



Prof.Dr. Sema ERDEMOĞLU
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Zeytin.....	4
2.1.1.Zeytin Çeşitleri	4
2.1.2.Halhalı Zeytini	5
2.1.3. Tıbbi Bir Bitki Olarak Zeytin	7
2.2.Oksidan / Antioksidan Kavramları ve Biyolojik Önemi	7
2.2.1.Serbest Oksijen Radikalleri	7
2.2.2.Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	10
2.2.3.Enzimatik Antioksidan Sistemler	10
2.2.4.Nonenzimatik Antioksidanlar	11
2.2.4.1.Vitaminler	11
2.2.4.2.Bioflavanoidler	13

2.2.4.3.Karotenoidler	14
2.2.4.4.Hidroksinnamatlar	15
2.2.4.5.Sentetik antioksidanlar.....	16
2.2.5.Oleuropein	17
2.3.Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri.....	19
2.3.1.Spektrometrik Teknikler	19
2.3.1.1.DPPH Metodu.....	19
2.3.1.2.ABTS Metodu.....	20
2.3.1.3.FRAP Metodu	21
2.3.1.4.ORAC (Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi) metodu.....	21
2.3.1.5.Lipid peroksidasyonu inhibisyonu metodu.....	22
2.3.1.6.Metal şelatlayıcı aktivite metodu	23
2.4.Trombosit aktivasyonu	24
2.5.Trombosit aktivatörleri	25
2.5.1.Agonistler.....	25
2.5.1.1.ADP	25
2.5.1.2.Trombin	26
2.5.1.3.Kollajen.....	26
2.5.1.4.Araşidonik asit ve TxA2	27
2.5.1.5.Epinefrin	27
2.5.1.6.PAF (Platelet aktive edici faktör)	27
2.6.Trombosit fonksiyon bozuklukları.....	27

2.6.1. Trombus oluşumu	29
2.6.2. Trombosit fonksiyon testleri	31
2.6.2.1. Chrono-Log sistemi	31
2.6.2.2. Işık transmision agregometri.....	31
2.6.2.3. İmpedans agregometrisi	31
3. MATERYAL-METOT	32
3.1. Kullanılan Kimyasallar	32
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	32
3.3. Örneklerin Hazırlanması	33
3.3.1. Soxhlet ekstraksiyonu	33
3.4. Kantitatif Analizler	35
3.4.1. Toplam fenolik madde içeriği tayini.....	35
3.4.2. Toplam flavanoid madde içeriği tayini.....	36
3.4.3. İndirgeyici potansiyel tayini	37
3.4.4. Metal şelatlayıcı aktivite	38
3.4.5. H ₂ O ₂ süpürücü aktivite tayini.....	39
3.4.6. DPPH radikali söndürme aktivitesi tayini	39
3.4.7. Antimikrobiyal aktivite tayini.....	41
3.4.8. Antitrombotik aktivite tayini	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. Total Fenolik Madde İçeriği	43
4.2. Total Flavonoid Madde İçeriği	44

4.3. İndirgeyici Potansiyel Düzeyi.....	45
4.4. Metal Şelatlayıcı Aktivite	46
4.5.Hidrojen Peroksit Süpürücü Aktivite.....	48
4.6. DPPH Radikali Söndürme Aktivitesi	49
4.7. Antimikrobiyal Aktivite.....	50
4.8. Antitrombotik Aktivite	52
5.TARTIŞMA	55
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	66
EKLER.....	79
Ek.1. Özgeçmiş	79
Ek.2. Etik Kurul Onayı	80

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında yapmış olduğum tez çalışmalarım sırasında bana desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden istifade etmemi sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. F. Zehra Küçükbay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları sırasında bana gerekli mikroorganizma ve antibiyotikleri sağlayan, laboratuvar çalışmaları süresince destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Selami Günal'a çok teşekkür ederim. Tüm akademik hayatım boyunca bana destek olan ve sonsuz bir sabırla her zaman yanımda olan eşime ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine "2016/43 Yüksek Lisans" kodlu projemize verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Kadir Batçioğlu

ÖZET

***Olea Europaea* (Zeytin) Ailesinden Hatay Yöresine Özgü “Halhalı” Türünün Meyve, Yaprak Ve Çekirdek Ekstrelerinin Antioksidan Ve Antitrombotik Özelliklerinin İncelenmesi**

Amaç: Zeytin ülkemizin en önemli bitkilerinden bir tanesidir ve ciddi düzeyde bir ekonomik değer yaratmaktadır. Ancak ülkemizde zeytin sadece sofralık zeytin ve zeytinyağı olarak tüketilmektedir. Oysa zeytin yaprak ve çekirdekleri de zeytinin değerlendirilmesi gereken bileşenleridir. Biz bu çalışmada zeytin yaprak, meyve ve çekirdeklerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan, antimikrobiyal ve antitrombotik etkinliklerini araştırarak Halhalı türü zeytinin bazı bileşenlerinin tıbbi etkilere sahip değerlendirilebilir bileşenler olduğunu ortaya koymayı amaçladık.

Materyal-Metot: Bu çalışmada Hatay yöresinde yetişen Halhalı türü zeytin ağacından hasat döneminde toplanan zeytin meyve, yaprak ve çekirdekleri kullanıldı. Soxhlet cihazı kullanılarak yapılan ekstraksiyon ile nonpolar bileşenleri uzaklaştırılarak polar biyoaktif bileşenlerin bulunduğu ekstreler elde edildi. Bu ekstreler kullanılarak spektrofotometrik yöntemlerle total fenolik ve flavanoid madde bileşimi, DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil radikali) ve hidrojen peroksit söndürücü aktivite, metal şelatlayıcı ve redüktan potansiyel tayini yapıldı. İlaveten agar dilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite ve agregometri tekniğiyle antitrombotik aktivite düzeyleri belirlendi.

Bulgular: Zeytin çekirdeği ekstresinin 1,000 mg’ı 317,24 µg gallik asit eşdeğeri (GAE) fenolik madde içeriği ile en yüksek fenolik madde içeren ekstrelerdir. Flavanoid içeriği ise 4,43 µg ile en yüksek meyve ekstresinde saptanmıştır. Yaprak ekstresinin 1,000 mg’ı 257,6 µg BHT’ninkine eşdeğeri düzeyde indirgeyici potansiyele sahiptir. Metal şelatlayıcı aktivite için en yüksek potansiyel 13,33 mg/mL IC₅₀ değeri ile yaprak ekstrelerinde gözlemlendi. Yine yaprak ekstresi en güçlü hidrojen peroksit ve DPPH radikali söndürücü aktivite gösterdi. Antitrombotik ve antimikrobiyal aktivite bakımından da en güçlü etki yaprak ekstresinde gözlemlendi.

Sonuç: Çalışma bulgularımız göstermektedir ki; zeytin yaprak, meyve ve çekirdek ekstrelerinin her üçü de test ettiğimiz parametreler bakımından farklı düzeylerde olmakla beraber etkili bulunmuştur. Yaprak ekstrelerinin genel olarak daha etkili olduğu ve tamamlayıcı tıp alanında yaygın olarak kullanım alanı bulabileceği görülmektedir. Zeytin çekirdekleri mutlaka değerlendirilerek artı değer yaratılmalıdır. Ülkemizin bu değerli bitkisi besin ögesi olmasının ötesinde tıbbi bir bitki olarak da dikkate alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Zeytin (*Olea europaea*), antioksidan, antitrombotik, antimikrobiyal, fenolik bileşik, flavanoid.

ABSTRACT

Investigation of Antioxidant and Antithrombotic Properties of Fruit, Leaf and Seed Extracts of *Olea Europaea* Family's "Halhal" Species Specific to Hatay Region

Objective: Olive is one of the most important plants of our country and creates a serious economic value. But olives are consumed only as breakfast olives and olive oil in our country. However, olive leaves and kernels are the components of olive that should be evaluated. In this study, we aimed to investigate the antioxidant, antimicrobial and antithrombotic activity of the extracts obtained from olive leaves, fruits and kernels and to reveal that all components of olives can be evaluable components with medicinal effects.

Material and Method: In this study, olive fruits, leaves and kernels collected from the olive tree grown in the Hatay region during the harvest period were used. Non-polar components were removed by Soxhlet extraction to obtain extracts with polar bioactive components. Total phenolic and flavanoid composition, DPPH and hydrogen peroxide quenching activity, metal chelating and reductant potentials were determined by spectrophotometric methods using these extracts. In addition, antimicrobial activity was determined by agar dilution method and antithrombotic activity levels were determined by aggregometry technique.

Results: 1mg of olive extract is the highest phenolic content of 317.24 µg gallic acid equivalent flavonoid content was determined the highest fruit extract with 4.43 µg 1mg of leaf extract has a redding potential equivalent to that of 257.6 µg BHT. Highest potential for metal chelating activity was observed in leaf extracts with an IC₅₀ of 13.33 mg/mL. Also leaf extract showed the strongest hydrogen peroxide and DPPH radical extinguishing activity. With regard to antithrombotic and antimicrobial activity, the strongest effect was observed in the leaf extract.

Conclusion: Our study findings show that all three extracts of olive leaf, fruit and seed were found very effective at different levels in terms of the parameters we tested. Leaf extracts appear to be more effective in general and can be widely used in the field of complementary medicine. Olive seeds must be evaluated absolutely and should be created surplus value. This valuable plant of our country must be considered as a medical plant beyond its nutritional element.

Key Words: Olive (*Olea europaea*), antioxidant, antithrombotic, antimicrobial, phenolic compounds, flavonoids.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad Derece
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
¹O₂	: Singlet oksijen
CAT	: Katalaz
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
Sn	: Saniye
U	: Ünite
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
BHT	: Butillenmiş hidroksi tolüen
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikril hidrazil
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GR	: Glutasyon redüktaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit

NADPH	: Redükte Nikotinamid adenin dinükledotid
NO·	: Nitrik Oksit
O₂·⁻	: Süperoksit radikali
OH·	: Hidroksil radikali
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
GSH-Red	: Glutatyon Redüktaz
MDA	: Malondialdehit
NaCl	: Sodyum Klorür
KCl	: Potasyum Klorür
Na₂HPO₄	: Disodyumhidrojenfosfat
KH₂PO₄	: Potasyumdihidrojenfosfat
H₃PO₄	: Fosforik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
ROS	: Reactive oxygene specieses
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
Na₂EDTA	: Disodyum Etilendiamin tetraasetik asit
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
M	: Molar
FeCl₃	:Demir (III) klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.2.1. Serbest oksijen radikallerinin hücre içinde oluşumu	8
Şekil 2.2.3. Enzimatik antioksidanlar ve etkili oldukları reaksiyonlar	10
Şekil 2.2.4.1. (1) Vitamin E, (2) Vitamin C, (3) Vitamin A molekül yapıları	12
Şekil 2.2.4.1.2. Askorbik asit ve askorbat anyon radikaline dönüşümü	13
Şekil 2.2.4.2. (A):Flavanol, (B):Flavon, (C):Flavonolol, (D):Flovon-3-ol, (E):Flovanon, (F):Anthocyanidin	14
Şekil 2.2.4.4. LDL oksidasyonu ve aterom plak gelişimi	16
Şekil 2.2.5. Oleuropeinin molekül yapısı	17
Şekil 2.3.1.1. DPPH radikalinin hidrojen verebilen bir antioksidan ile reaksiyonu	20
Şekil 2.3.1.2. ABTS radikalinin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.3.1.3. Fe(II) ve Fe(III) ile oluşan Fe-TPTZ kompleks yapıları	21
Şekil 2.3.1.4. ORAC yönteminde peroksil oluşumu ve antioksidan molekülün girişimi	22
Şekil 2.3.1.5. Tiyobarbutirik asit ile lipit peroksidasyon ürünü MDA etkileşimi	23
Şekil 2.3.1.6. Ferrozin molekül yapısı	24
Şekil 2.4. Trombositlerin agregasyonu	25
Şekil 2.6.1.1. İnvasküler trombus ve emboli görünümü	29
Şekil 2.6.1.2. Trombus oluşum mekanizması	30
Şekil 3.3.1.1. Soxhlet ekstraksiyon sistemi	33
Şekil 3.3.1.2. Ekstraksiyon işlem aşamalarının şematize edilmesi	35
Şekil 3.4.1. Gallik asit molekül yapısı	36
Şekil 3.4.2. Quercetin molekül yapısı	37

Şekil 3.4.4.1. Ferrozin molekül yapısı	38
Şekil 3.4.4.2. EDTA molekül yapısı	39
Şekil 3.4.6. DPPH radikalinin antioksidan bir molekül ile etkileşimi	40
Şekil 3.4.8. Dört farklı agonistin optik agregometride oluşturdukları standart yanıtlar.....	42
Şekil 4.8. Optik Agregometri ölçüm diagramları. A:Kontrol; B:Yaprak ekstresi; C:Meyve ekstresi; D:Çekirdeks ekstresi	52
Şekil 5. Kanama-tromboz (hemostaz)dengesi	62



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4.1. Total fenolik madde içeriği	44
Tablo 4.2. Total flavanoid madde içeriği	45
Tablo 4.3. İndirgeyici potansiyel düzeyleri	46
Tablo 4.4. Metal şelatlayıcı aktivite düzeyleri	47
Tablo 4.5. Hidrojen peroksit süpürücü aktivite düzeyleri	48
Tablo 4.6. DPPH Süpürücü aktivite düzeyleri	50
Tablo 4.7. Antimikrobiyal aktivite sonuçları (µg/mL)	51
Tablo 4.8. Antitrombotik aktivite düzeyleri	53
Tablo 4.8.1. Antioksidan parametrelerin topluca gösterimi.....	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa No
Resim 2.1.2. Halhalı türü zeytin meyvesi	6
Resim 3. Zeytin ve yapraklarının toplandığı Halhalı Türü zeytin ağaçları	32



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik No	Sayfa No
Grafik 4.1. Gallik asit standart grafiği	43
Grafik 4.2. Quercetin standart grafiği	44
Grafik 4.3. BHT standart grafiği	45
Grafik 4.4. Metal şelatlayıcı aktivite standart grafiği	47
Grafik 4.5. Hidrojen peroksit süpürücü aktivite standart grafiği	48
Grafik 4.6. DPPH söndürme aktivitesi standart grafiği	49

1.GİRİŞ

Son yüz yıl içerisinde teknoloji çok hızlı gelişti ve bu gelişim her geçen gün daha da artan bir hızda devam ediyor. Teknoloji de yaşanan bu hızlı gelişim doğal olarak hayatımızı etkileyen birçok alana da aynı hızla girdi. Günlük yaşantımızın hemen her anında teknoloji ile iç içe bir yaşam sürüyoruz artık. Mutfağımızda, salonumuzda, ofisimizde, aracımızda hatta sokakta, parkta ya da doğa ile baş başa kaldığımızı sandığımız bir orman yürüyüşünde bile manyetik ve/veya elektriksel alana değişen şiddetlerde maruz kalmaktayız. Yaşam alanlarımıza dikilen baz istasyonları, ceplerimizde taşıdığımız mobil telefonlar, yüksek gerilim hatları, kablosuz internet ağları ve evlerimizde kullandığımız elektrikli ev aletleri çevremizde yoğun bir manyetik kirlilik yaratmaktadır. Manyetik kirlilik sonucu canlı sistemlerin elektriksel ve elektromanyetik alanlara maruziyeti başta nörolojik hastalıklar olmak üzere birçok patolojinin etyopatogenezinde rol oynamaktadır (1).

Gelişen endüstri ve teknoloji üretim sektöründe devasa ilerlemeler yaratmış, fabrikalar ve entegre tesislerde üretim kapasiteleri katlanarak artmış, ancak beraberinde üretime paralel bir şekilde atık madde miktarı da artmıştır. Gaz atıklar soluduğumuz havayı, sıvı atıklar içtiğimiz suyu ve katı atıklar ise yaşadığımız çevreyi kirletmişlerdir. Çoğunluğunu canlı sistemlere zararlı kimyasalların oluşturduğu bu atıklara akut ya da kronik maruziyetler sonrası başta kanser olmak üzere birçok hastalığın insidansı artmış morbidite ve mortalite oranları yükselmiştir (2).

Hızla artan dünya nüfusu insanlığı gıda yetersizliği ve beslenme bozuklukları riski ile karşı karşıya bırakmıştır. Tarımsal üretimi artırmak amacıyla gerek bitkisel gerekse hayvansal üretimde yoğun bir şekilde pestisid, insektisid ve antibiyotik kullanımı hatta verimi artırmak amacıyla hormon benzeri etkileri olan ajanların kullanımı beraberinde bu ürünleri tüketen insanların da bu kimyasallara maruz kalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu tür ilaçların teratojenik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra endokrin sistemi bozduğu, sirkadiyen ritmi değiştirdiği, puberta zamanını erkene aldığı bilinmektedir (3).

Önemli risk gruplarından biri de ağır metallerdir. Karaciğer, beyin ve adipoz doku gibi birçok dokuda birikme eğilimi gösteren ağır metaller parankim hücre hasarı,

enzim inhibisyonu, nöral ileti bozuklukları, fertilizasyon defektleri gibi birçok yapısal ve fonksiyonel işlev yetmezliklerine neden olmaktadır (4).

Teknolojik gelişim insan gücünün yerini makinaların almasına, böylece fiziksel aktiviteye dayalı üretim proseslerinin yerine makina ve entegre otomasyon sistemlerinin geçmesine neden olmuştur. Toplumun genelinde günlük fiziksel aktivite oranı düşmüş sedanter yaşam tarzı büyük oranda yaygın hale gelmiştir. Obezite, hiperlipidemi, hipertansiyon ve ateroskleroz görülme sıklığı artmış olup bu bulguların bir kaçının birlikte bulunduğu bir sendrom olarak tanımlanan metabolik sendrom yaygın biçimde görülmeye başlanmıştır. Günümüzde ölüm nedenleri arasında ilk sırada bulunan kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerden bir tanesi metabolik sendromdur (5).

Değişen beslenme tarzı, maruz kalınan toksik ajanların sayısında ve maruziyet şekli ile süresindeki artış, manyetik kirlilik, sedanter yaşam biçimi ve yoğun emosyonel stres canlı sistemleri birçok patolojiye karşı yatkın ve savunma gücü azalmış hale getirmektedir. Zayıflayan immün sistem, bozulan homeostaz ve artan oksidatif stres kanser başta olmak üzere görülme sıklığı artan hastalıkların gelişip ilerlemesine zemin hazırlamaktadır. Öyle ki bundan yaklaşık 30-40 yıl öncesine kadar genç insanlarda nadir görülen daha çok ileri yaş hastalığı olarak bilinen kanser bugün en sık tanı konulan hastalıklar arasında yer almaktadır. Özellikle kadınlarda meme ve rahim kanserleri erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserleri insidansı en fazla artan hastalıklardan olmuştur. Bu sürecin gelişiminde başlıca rolü olan faktörler; bozulan beslenme alışkanlıkları, fast food tarzı beslenme, düzenli egzersizden ve gün içi fiziksel aktiviteden uzak sedanter yaşam, gıda, hava ve sudaki kirlilik, manyetik kirlilik, emosyonel ve oksidatif stres, genetik etmenler şeklinde sıralanabilir (6).

Modern tıbbın hastalıklara iki temel yaklaşım biçimi bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi radikal yaklaşım olup cerrahi uygulamaları içermektedir. Bir diğeri ise medikal tedavi olup hastalıkların ilaçlarla tedavi edilme yöntemidir (7). Ancak bu yaklaşımların her ikisi de hastalıkların gelişip tanı konmasından sonraki süreçlerde uygulanmaktadır. Oysa koruyucu hekimlik ve geleneksel tıp uygulamaları hastalıkların tedavi edilmesi uygulamalarıyla birlikte hastalıklardan koruyucu yaklaşımları da içermektedir. Koruyucu ve tedavi edici geleneksel tıbbi uygulamaların en önemli silahını tıbbi bitkiler ve bu bitkilerden hazırlanan farklı preparatlar oluşturmaktadır. Bu

amaçlarla kullanılan yüzlerce farklı bitki türünden söz edebiliriz. Hatta bu bitkilerden bazıları da ülkemiz topraklarına özgü endemik türlerdir. Uygulamalarda biyoaktif bileşen yoğunluğu ve biyoyararlanımı dikkate alınarak bitkilerin yaprak, kök, çiçek ya da meyve gibi bileşenleri tek başına ya da birlikte kullanılabilir (8).

Geleneksel tıbbın yaygın biçimde kullandığı tıbbi bitkilerden bir tanesi de zeytindir. Zeytinin meyvesi, yaprağı ve çekirdeği ile hazırlanan değişik preparatlar ve zeytinyağı yüzyıllardır insanoğlunun farklı hastalıkların tedavisinde kullandığı halk ilaçları arasında yer almaktadır (9). Bu çalışmada ülkemizde yetişen önemli zeytin türlerinden biri olan Halhalı türü zeytinin meyve, yaprak ve çekirdeklerinden hazırlanan ekstraların antioksidan ve antitrombotik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda çoğunlukla yaprak ve meyve üzerinde yoğunlaşmış ve zeytin çekirdeğinin muhtemel tıbbi etkileri göz ardı edilmiştir. Bizim bu çalışmadaki temel amaçlarımızdan biri de zeytinin yaprak ve meyvesi ile birlikte çekirdek ekstralarını de araştırarak bu organın da değerlendirilmesi gereken bir bileşen olduğunu ortaya koymaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Zeytin

Zeytin bitkisi (*Olea europaea*) Oleaceae familyasındandır ve ismini Yunanca “elaia” ve latince “olea”dan almaktadır. Türkçe isminin kökeni ise Semitik orijinali olan zayit kelimesinden gelmektedir. Boyu 2 ila 20 m arasında değişebilmekle beraber ortalama 8-10 m civarındadır. Zeytin ağacının meyveleri başlangıçta yeşil renktedir ancak olgunlaştıkça renk koyulaşır ve mor bir renk alır. Olgunlaşma dönemi Ekim ayının ortalarından Kasım ayının sonuna kadar olan bir dönemi kapsamaktadır. Üç yüz elli yıl civarında bir ortalama ömre sahip olan zeytin ağaçlarının iki bin ve daha üzeri yaşında olanlarına da rastlanabilmektedir. Son derece dayanıklı ve kolay çoğalan bir bitkidir (10).

Zeytin ağacının ana vatanının Güney Ön Asya olduğu ileri sürülmekte olup bu bölge bugün ülkemiz sınırları içinde bulunan Maraş, Antep ve Hatay dolaylarıdır. İlk ıslah çalışmalarının Samiler tarafından M.Ö. 4000 yıllarında gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (10,11)

Zeytin meyvesinin bileşimi (%); Su 50 – 60; Yağ 18 – 25; Protein 1,5 – 2; Şeker 18; Selüloz 5; Mineral Madde (kül) 1,5; Hidrokarbonlar 08 – 1; Polifenoller 0,5 - 0,8; Tokoferoller 0,3 - 0,8 şeklindedir (12).

Zeytin ağacının yaprakları da tıbbi kullanım alanına sahip bitkisel materyaller arasındadır. İçerdiği fenolik bileşenlerin güçlü antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antiaging etkili olduğu rapor edilmiştir (13).

Halk tıbbi pratiklerinde zeytinin çekirdeğinin de tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir; yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla zeytinin çekirdeği ile birlikte ezilip lezyon üzerine sürülmesi ya da gastrit ve mide ülserlerinde zeytin çekirdeğinin bütün olarak yutulması bu uygulamalardan birkaçı olarak verilebilir (14).

2.1.1.Zeytin Çeşitleri

Dünyada değişik ülke ve coğrafyalarda yetişen zeytin türlerinin büyük bir kısmı ülkemizde de yetiştirilmektedir. Ülkemizde yetişen başlıca zeytin türlerini sıralayacak olursak;

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| -Ayvalık çeşidi | -Büyük topak ulak çeşidi |
| -Çakır çeşidi | -Çekişte çeşidi |
| -Çelebi çeşidi | -Domat çeşidi |
| -Edincik su çeşidi | -Eğriburun çeşidi |
| -Erkence çeşidi | -Gemli çeşidi |
| -Halhalı çeşidi | -İzmir sofralık çeşidi |
| -Kalembezi çeşidi | -Kan çelebi çeşidi |
| -Karamürsel su çeşidi | -Kilis yağlık çeşidi |
| -Kiraz çeşidi | -Memecik çeşidi |
| -Memeli çeşidi | -Nizip yağlık çeşidi |
| -Samanlı çeşidi | -Sarı haşebi çeşidi |
| -Sarı ulak çeşidi | -Saurani çeşidi |
| -Tavşan yüreği çeşidi | -Uslu çeşidi |
| -Yağ çelebi çeşidi | |

şeklindedir. Çalışmamızda kullanılan ve Hatay ile civar yöreye özgü bir tür olan Halhalı türü zeytin çeşidine biraz daha yakından bakacak olursak; (15)

2.1.2.Halhalı Zeytini

Mardin, Hatay, Gaziantep, Kahramanmaraş civarında yetişir. (Resim2.1)



Resim 2.1.2. Halhalı türü zeytin meyvesi

Coğrafi dağılım alanı içinde 2 milyon civarında ağaç bulunmaktadır. Orta kuvvette gelişir, meyveleri orta iriliktir. Çekirdekleri iri olup meyveleri % 21.9 oranında yağ içerir.

Orijini: Mardin ili Derik ilçesi

Ağaç Kuvveti: orta

Meyve Büyüklüğü: orta

Meyve Şekli: yuvarlağa yakın oval

Meyve Eti % : 82,79

Çekirdek % : 17,21

Periyodisite Durumu: kuvvetli

Döllenme Durumu: bilinmemekte

Ürünün Değerlendirilmesi: siyah, yeşil sofralık yağlık

Çiçeklenme: 16 Mayıs – 3 Haziran

Meyve Bağlama: 21 Mayıs – 10 Haziran

Yeşil Olum: Ekim ayının ikinci yarısı

Siyah Olum: Kasım ayının son haftası (16).

2.1.3. Tıbbi Bir Bitki Olarak Zeytin

Bugüne kadar yapılmış olan araştırmalarda zeytin ve zeytin yağının insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri defalarca ortaya konmuştur ancak bu etkilerin zeytin bünyesindeki polifenollerden mi yoksa doymamış yağ asitlerinden mi ya da bu ikisinin sinerjik etkileşiminden mi kaynaklandığı net bir biçimde açıklığa kavuşturulamamıştır. Akdeniz diyetinin temelini oluşturan zeytin ve zeytin yağlı yiyeceklerin glukoz metabolizmasını dñzenlediđi, HDL-kolesterol dñzeylerini artırarak LDL-kolestrolü dñřñrdñđü gñnñmñzde artık bir sır değildir. İlaveten LDL oksidasyonunu önleyici etkisi kardiyovaskñler sistem açısından son derece önemlidir. Metabolik sendrom oluşumunda zincir kırıcı etkisi konusunda řñphe bulunmamaktadır. Tsartsou ve arkadaşları (2019), (17) insanlar üzerinde yapılmış otuz adet çalışmayı irdeledikleri meta analizinde zeytin ve zeytin yağının insan sağlığı üzerindeki tñm olumlu etkilerini ortaya koymuş bunların bir kısmından antioksidan etkili polifenollerini sorumlu tutarken antiaterojenik etkilerinden ise içerdiği mono ve poli ansature yağ asitlerini sorumlu tutmuşlardır. Etkili polifenoller arasında öne çıkanlar; oleuropein, tirozol, hidroksitirozol, verbascoside, ligstroside, luteolin ile kafeik, kumarik ve ferulik asittir. Öte yandan zeytin çekirdeği ise nuezhenide adlı polifenolle dikkat çekmektedir. Bu bileşiğin çekirdeğe özgñ olması zeytin çekirdeğini öne çıkarmaktadır (17).

2.2.Oksidan / Antioksidan Kavramları ve Biyolojik Önemi

Temel kimya çerçevesinden bakıldığında oksidasyon (yükseltgenme) bir atom ya da molekülün elektron kaybetmesi, redñksiyon (indirgenme) ise bñnyesine elektron katması anlamına gelmektedir. Ancak her iki kavramı da biraz daha spesifik bir bakış açısıyla, biyokimyasal ya da canlı sistemler kimyası içinde değerlendirdiğimizde, bir çok radikalik yapının merkezinde aerob canlılar için vazgeçilmez bir element olan oksijenin bulunduğu görñlmektedir(18). Bu nedenle pek çok kaynakta serbest radikal yerine “serbest oksijen radikalleri” kısaca SOR kullanılırken, yabancı kaynaklarda ise “reaktif oksijen tñrlerine” karşılık gelmekte olan ROS kısaltması kullanılmaktadır.

2.2.1.Serbest Oksijen Radikalleri

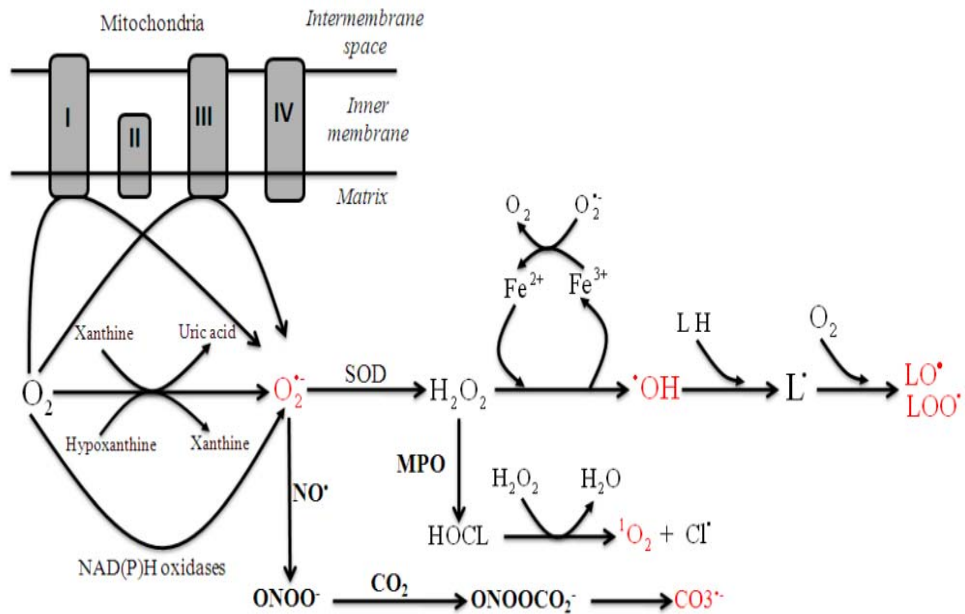
Serbest radikal tanımını en basit haliyle atomik orbitalinde bir adet çiftleşmemiş elektron içeren yapılar şeklinde ifade edebiliriz. iftleşmemiş halde bulunan bu elektron serbest radikal molekülünü son derece reaktif hale getirmektedir. Bu molekül kimyasal

davranış bakımından iki farklı yol izleyebilir; bünyesinde barındırdığı fazla elektronu bir başka moleküle aktararak elektron donörü olarak davranabilir ya da kendisi bir elektron alarak elektron akseptörü gibi davranabilir. Sonuç olarak bir serbest radikal duruma göre indirgen ya da yükseltgen gibi davranabilir (18).

Canlı sistemlerde yer alan ve bünyesinde oksijen barındırdığı için reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan moleküller; singlet oksijen, hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hipoklorit, nitrik oksit ve peroksinitrit molekülleridir. Bu moleküllerin ya kendileri ya da metabolitleri şiddetli reaktif özellikte olup yüksek konsantrasyonlarda tüm biyomoleküllere saldırarak oksidatif hasar oluştururlar. Hedeflerindeki biyomoleküller karbonhidratlar, lipidler, enzimler ve diğer hücrel proteinler, nükleik asitler, vitaminler ve koenzimlerdir (19).

Hücrelerde radikal oluşumu temelde 3 farklı yolla gerçekleşmektedir,

- i) Normal aerobik metabolizma sırasında elektron transport zincirindeki elektron kaçakları.
- ii) Fagositlerin hedefteki enfekte hücreyi ya da enfektan etkeni ortadan kaldırmak üzere kullandıkları solunumsal patlama.
- iii) Ksenobiyotiklerin metabolizması (20).



Şekil 2.2.1. Serbest oksijen radikallerinin hücre içinde oluşumu (21)

Normal fizyolojik süreçlerde oluşan fizyolojik konsantrasyonlardaki serbest radikaller organizma için gereklidir. Örneğin gen ekspresyonunun regülasyonunda rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlarlar. Hücre gelişiminde ve enfeksiyon etkenleri ile mücadelede kullanılırlar. Etkili oldukları sinyal iletim yollarından biri de MAPKs yolağıdır. Öte yandan prenatal ve embriyonik gelişim süreçlerinin kontrol ve düzenlenmesinde ROS nin rol oynadığı rapor edilmiştir. H₂O₂ tiroksin sentezinin düzenlenmesinde, tiroid hücrelerinin uyarımını gerçekleştirmektedir. Yine apoptozisin uyarımının ROS tarafından yapıldığı bilinmektedir. Tümör hücreleri ve virüsle enfekte hücreler üzerine TNF- α aracılı sitotoksiste de radikaller tarafından düzenlenmektedir. Sonuç olarak hücrede birçok farklı süreçte üretilen serbest oksijen radikalleri fizyolojik sınırlar içinde organizma için yararlı etkilere sahiptir (22,23).

Farklı endojen ya da eksojen etkenler ile radikal üretimi tetiklendiğinde, aşırı miktarda oluşan ROS'lar kimyasal yapıları gereği çok farklı türdeki biyomoleküller ile reaksiyona girer ve onları ya oksidasyon ürünlerine dönüştürür ya da daha az reaktif olan sekonder radikallerin oluşumuna yol açar. Özellikle hücre ve hücre altı organellerin membranları içermiş oldukları yüksek doymamış yağ içerikleri nedeniyle radikalik hasara yüksek düzeyde duyarlıdırlar. Burada başlayan oksidasyon bir radikalik zincir reaksiyon şeklinde sürer ve ortamda Vitamin E benzeri lipofilik bir zincir kırıcı antioksidan yok ise membran stabilitesi tamamen bozulana kadar devam eder (24). Proteinlerde oluşan oksidatif hasar çoğunlukla proteinin üç boyutlu yapısının bozulmasıyla ilişkili fonksiyon kayıplarına neden olur. İlaveten protein-protein çapraz bağlarının oluşumu, protein fragmentasyonu ve hasarlı proteinlerin proteolitik degradasyona maruz kalması da söz konusu olmaktadır. Proteinler bünyesindeki aminoasitlerden özellikle triptofan, sistein ve metiyonin yan guruplarının (R) yapıları nedeniyle oksidasyona en açık olanlardır. Ölçülebilen oksidasyon ürünleri çoğunlukla aldehit veya keton yapılı protein karbonilleridir (25).

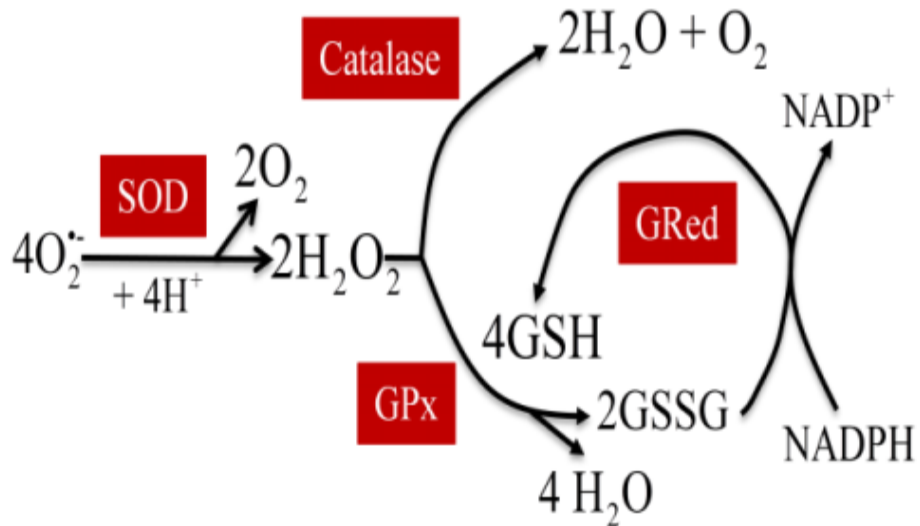
Diğer hücrel biyomoleküllerle kıyaslandığında daha iyi korunan ve daha stabil bir yapıdaki DNA molekülü de serbest radikaller tarafından oksidasyona uğratılmaktadır. Baz modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, pürin ya da pirimidin baz kayıpları ve deoksiriboz oksidasyonu DNA üzerinde oluşabilecek hasarlardır. Bu hasarların önemli bir kısmından OH \cdot radikali sorumludur. OH \cdot radikali ile etkileşim sonrası pürin ve pirimidin bazlarında oksidasyon veya redüksiyona bağlı

modifikasyonlar akabinde de bazın kaybı gerçekleşmektedir. Önemli modifikasyon ürünleri arasında 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), 4- , 5- ya da 8-hidroksiadenin, timin peroksid ve 5-hidroksimetil urasil sayılabilir. Nükleotidlerin şeker bileşenine gerçekleşen serbest radikal saldırıları sonucunda ise şeker peroksid radikalleri oluşur ve zincir kırıkları meydana gelir. DNA'nın genetik materyal olması itibariyle bahse konu hasarların oluşumu hücre ölümü, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (26).

2.2.2. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Antioksidan moleküller organizmada bu etkilerini, serbest radikallerin oluşumunu engellemek, oluşan radikalleri temizlemek ya da onları daha düşük aktiviteli radikal yapılara dönüştürmek, hücresel hasarı engellemek ve/veya oluşan hasarı onarmak şeklinde gösterirler (27). Antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak iki grupta incelenebildiği gibi kaynağına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olarak da kategorize edilmektedirler. Nonenzimatik antioksidanlar yapısal özelliklerine göre yağda çözünen ve suda çözünenler olarak iki gruptur ve yağda çözünenler hücre membranlarına nüfuz edebilme yeteneğine sahip olduğu için hem membran hasarına karşı hem de hücre içi radikalik saldırılara karşı koruyucu etkiye sahiptirler (28).

2.2.3. Enzimatik Antioksidan Sistemler



Şekil 2.2.3. Enzimatik antioksidanlar ve etkili oldukları reaksiyonlar (29).

Süperoksid dismutaz (SOD) enzimi sitozol ve mitokondride lokalize olan ve süperoksit anyon radikalinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksida dismutasyonunu katalizleyen antioksidan bir enzimdir. Bünyesinde barındırdığı kofaktör metal iyonlarına göre Mn-SOD ve Cu, Zn-SOD şeklinde iki türü bulunmaktadır. Üçüncü bir türü olan ve demir içeren Fe-SOD ise bakterilerde bulunur (30).

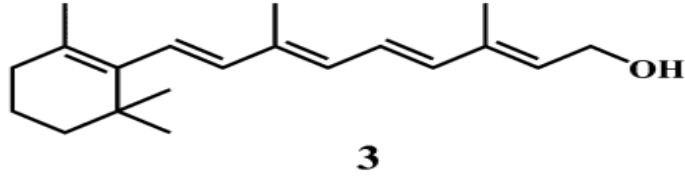
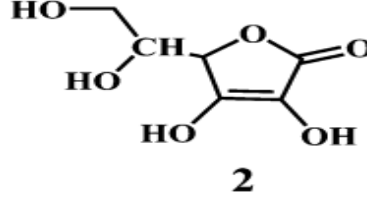
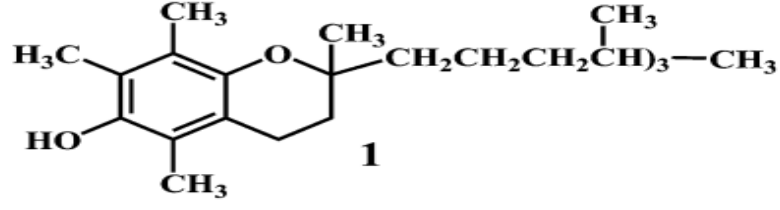
Hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri sorumludur. Katalaz peroksizomda lokalize olmuştur ve hidrojen peroksidi oksijen ve suya dönüştürür. GPx ise sitozol ve ekstrasellüler ortamda bulunur ve hidrojen peroksidi tümüyle suya dönüştürür. GPx enzimi antioksidan etkisini hidrojen peroksid ile birlikte organik peroksitlere karşı da gösterebilme yeteneğine sahiptir. Hidrojen peroksidin tüm hücrelerde gerek fizyolojik süreçler sonucunda gerekse endojen ve eksojen tetikleyici faktörlerin etkisiyle sürekli olarak değişen oranlarda üretimi söz konusudur. Daha az olmakla beraber organik hidroperoksitler de özellikle serbest radikal üretiminin arttığı zamanlarda artmaktadır (31). Şekil 2.2.1'de de görüldüğü üzere glutatyon peroksidazın aktivite gösterebilmesi için redükte glutatyon (GSH) ihtiyacı vardır. Her bir detoksifikasyon için iki adet redükte glutatyon kullanılır ve reaksiyon tamamlandığında bu glutatyonlar okside glutatyon (GSSG) dönüşmüş olurlar. Detoksifikasyonun devamlılığı için ortamda belirli konsantrasyonda redükte glutatyon bulunmalıdır, ancak hücre içi redükte glutatyon miktarı sınırlıdır ve okside olan formun tekrar redükte forma dönüştürülmesi gerekir, bu işleme glutatyonun rejenerasyonu adı verilir. Rejenerasyon işleminden glutatyon redüktaz (GRed) enzimi sorumludur dolayısıyla GRed enzimi doğrudan radikal temizleyici etki göstermese de antioksidan enzim sistemlerinin çok önemli bir bileşenidir (32).

2.2.4. Nonenzimatik Antioksidanlar

Non enzimatik antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki grupta toplanabilirler. Doğal antioksidanlara daha yakından bakacak olursak,

2.2.4.1. Vitaminler

Antioksidan etkiler bakımından vitaminler içerisinde vitamin E, C ve A öne çıkmaktadırlar.



Şekil 2.2.4.1. (1) Vitamin E, (2) Vitamin C, (3) Vitamin A molekül yapıları

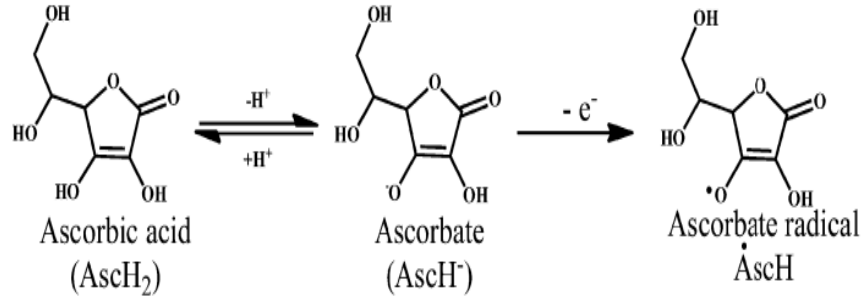
Vitamin E lipofilik karakteri ile lipid peroksidasyonuna karşı zincir kırıcı etkisiyle vitaminler arasında antioksidan etkinlik açısından en fazla öne çıkmıştır. Hücrenin membran yapısını ve bütünlüğünü bozarak hücrenin lizisine ve ölümüne neden olan membran lipidlerinin peroksidasyonu serbest radikallerin neden olduğu en ciddi oksidan hasarlardan biridir.



Reaksiyonu uyarınca oluşan α -Tokoferil radikali nispeten daha stabil, kararlı, yarı ömrü uzun ve reaktivitesi düşüktür. Membrana diffüze olarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu lipid hidroperoksid ($\text{LOO}\cdot$) radikali ile etkileşime girerek sonlandıran böylece zincir kırıcı etkisiyle hücre bütünlüğünü koruyan Vitamin E hidroksil ($\text{OH}\cdot$) ve alkoksil ($\text{OR}\cdot$) radikallerine karşı ise etkili bir antioksidan değildir (34).

Vitamin C (askorbik asit) polar karakterde suda çözünebilen bir radikal süpürücü antioksidandır. Bir diğer önemi ise membran lipidlerini oksidasyondan koruyan vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlamaktadır. Serbest radikallerle etkileşimi sonrasında tıpkı

Vitamin E'ye benzer şekilde Vitamin C de daha stabil ve reaktivitesi düşük olan askorbat radikaline dönüşmektedir (35).

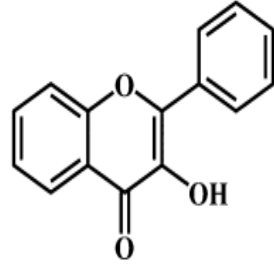


Şekil 2.2.4.1.2. Askorbik asit ve askorbat anyon radikaline dönüşümü (36)

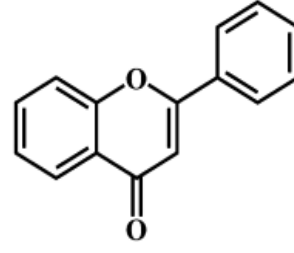
2.2.4.2. Bioflavanoidler

Bioflavanoidler kimyasal yapıları bakımından bir grup benzo- γ -piran türevi moleküldür ve çok güçlü antioksidan etkileriyle bilinmektedirler. Birçok meyve ve sebze yaygın olarak bulunur ve major antioksidan etkilerini radikal süpürücü potansiyelleri ile gösterirler. Buna ilaveten önemli metal şelatlayıcı aktiviteleri sayesinde bakır ve demir gibi +2 değerlikli metal iyonlarını bağlayarak Fenton reaksiyonu üzerinden hidroksil radikali üretimini engellerler (37).

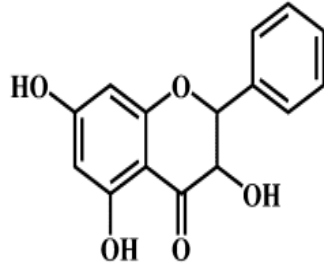
Bitkisel kaynaklarda çoğunlukla flavanol (quercetin, myricetin), flavon (apigenin, luteolin), flavonolol (taxifolin), flavan-3-ol (catechin, epigallocatechin), flavanone (hesperetin, naringenin), antosiyanidin (cyanidin, delphinidin), isoflavon (genistein, daidzein) molekül yapılarında bulunurlar (37,38).



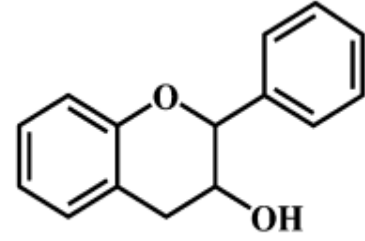
(A)



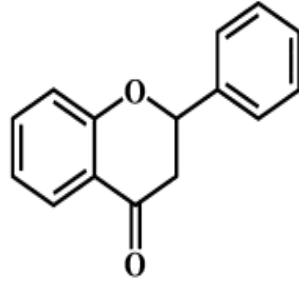
(B)



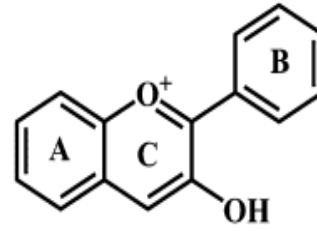
(C)



(D)



(E)



(F)

Şekil 2.2.4.2. (A):Flavanol, (B):Flavon, (C):Flavonolol, (D):Flavan-3-ol, (E):Flavanon, (F):Anthocyanidin (38)

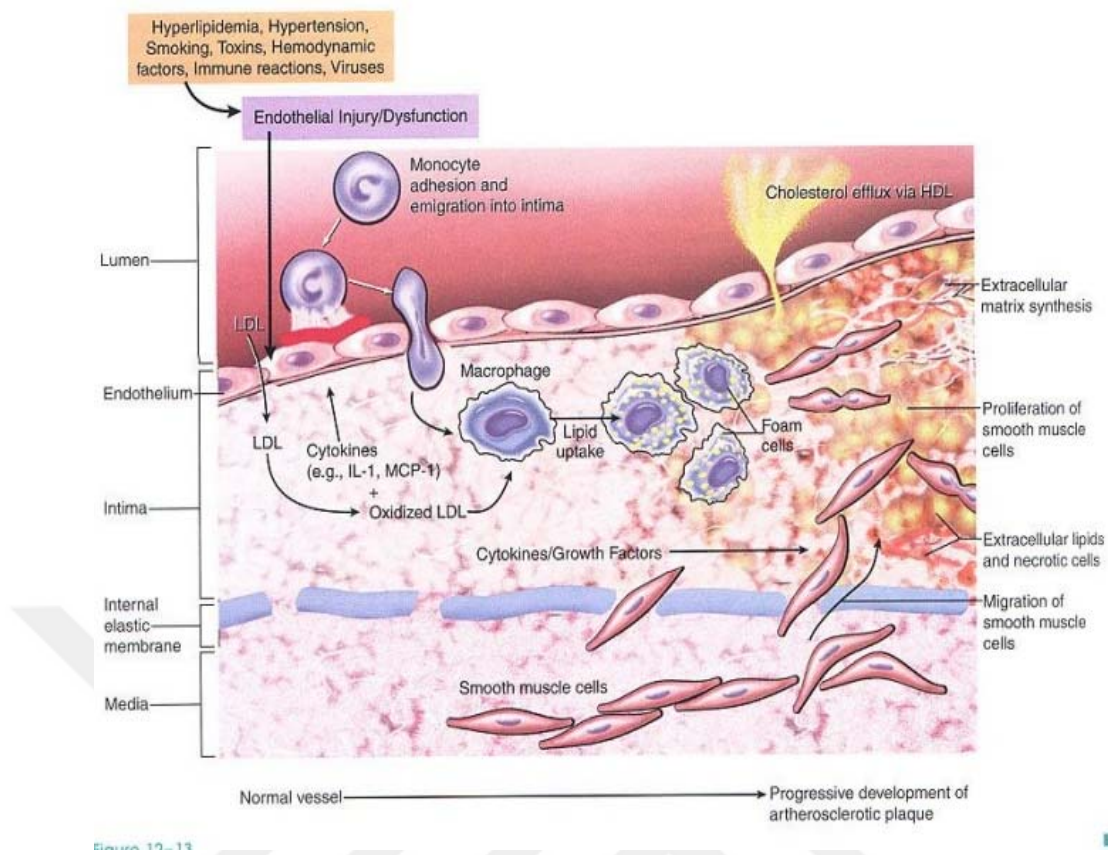
2.2.4.3.Karotenoidler

Karotenler (lycopene, β -carotene) ve ksantofiller (zeaxhantine, lutein) olmak üzere iki grup bileşiktir. Bitkisel kökenli, yaygın olarak bulunan ve doymamış bağ içeren uzun alkil zinciri nedeniyle lipofilik karakterli antioksidan moleküllerdir. 600 den fazla farklı türevi bulunmakta olup en önemlileri likopen ve β -karotendir (39). Lipofilik antioksidan moleküller membran fosfolipidlerinin oksidasyonuna karşı koruyucu rol oynarlar. Likopen domates, kayısı ve karpuz gibi kırmızı renkli meyvelerde β -karoten

ise yine kayısı ve havuç gibi turuncu renkli meyvelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. β -karoten hayvansal organizmalara alındıktan sonra β -karoten-15,15'-dioksijenaz enzim sistemi tarafından iki molekül Vitamin A'ya dönüştürülür. A vitamini, göz hastalıklarını ve körlüğü önler. İmmün sistemi güçlendirir, cilt sağlığını korur. Ayrıca gastrointestinal sistemde gelişen ülseratif lezyonları iyileştirir, üst solunum yolu enfeksiyonları ile böbreklerde, mesanede, akciğerlerde ve mukus zarlarında oluşan yangısal hastalıklara karşı koruyucu etki gösterir. Likopenin kimyasal yapısında onüç adet çift bağ bulunur ve bunlardan onbir tanesi konjuge, iki tanesi nonkonjusedir. Molekül yapısında β -iyonon siklik yapı bulunmadığından vitamin A fonksiyonlarına sahip değildir. Çizgisel bir molekül geometrisine sahip olan bu karotenoid yağlı bölgelerde daha fazla lokalize olur. Organizmada en fazla kanda LDL ve VLDL lipoprotein yapılarında ve karaciğer, böbrek üstü bezleri, prostat ve testislerde bulunur (40).

2.2.4.4.Hidroksinnamatlar

Bu gurup içerisinde kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit ve kumarik asit sayılabilir. Etkinliklerini likopeninkine benzer biçimde LDL oksidasyonunu önleyerek gösterirler. Bu guruptaki antioksidan moleküller de antiaterojenik etkiye sahiptirler. Aterom plak oluşumunda en önemli basamak LDL'in oksidasyonudur (Şekil 2.2.4.4). Okside LDL damar endotel hücrelerinin artan geçirgenliğinden yararlanarak intima tabakasına geçer ve okside LDL'i fagosite etmeye çalışan makrofajlar gerekli enzim sistemine sahip olmadıklarından köpük hücrelere dönüşürler ve plak oluşumunun ilk ve en kritik aşamasını başlatmış olurlar. Bu nedenle LDL oksidasyonunun önlenmesi aterosklerozun engellenmesi açısından çok önemli bir koruyucu mekanizmadır. Köpük hücre oluşumunu gerçekleşmesinden önce sürecin daha erken aşamada engellenmesi ancak LDL koruyucu antioksidan moleküllerin aktiviteleriyle mümkün olabilmektedir (41).



Şekil 2.2.4.4 LDL oksidasyonu ve aterom plak gelişimi (42)

2.2.4.5. Sentetik antioksidanlar

Günümüzde birçok sentetik ve doğal antioksidana gıda sanayi ve tıp alanında farklı amaçlarla yer verilmektedir. Çok sayıdaki sentetik polifenolik antioksidan molekül gıda ve kozmetik endüstrisinin yanı sıra terapötik amaçlı da kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların zamanla ortaya konulan ve aralarında karsinojenik etkinin de sayıldığı zararlı etkileri nedeniyle söz konusu alanlarda daha çok tıbbi ve besinsel bitkilerden sağlanan doğal antioksidanlara yönelinmiştir (43).

Sentetik antioksidan moleküllerden sıklıkla kullanılanlar arasında;

- Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
- Propil Gallat
- Etoksikuin
- Tersiyer butil hidrokinon (TBHQ)

-Nordihidroguayenet asit (NDGA)

-Şelatlayıcı ajan olarak EDTA

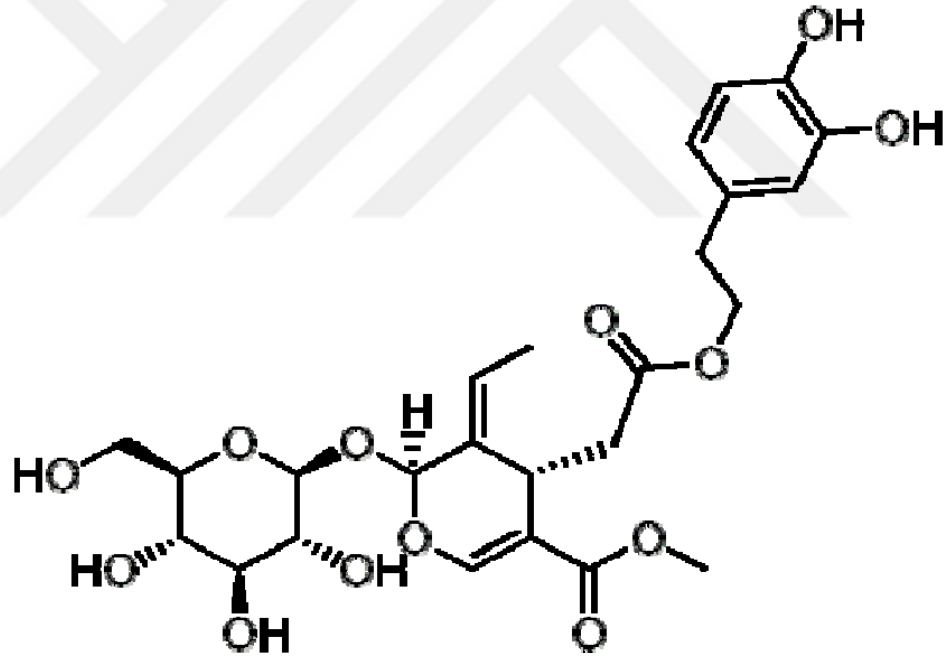
-Laboratuvarında sentezlenen askorbik asit ve tokoferoller sayılabilir (44).

2.2.5.Oleuropein

Oleuropein, bitkisel bir sekoiridoittir. Sekoiridoitler, siklopentanopiran halkasına sahip acı tadında monoterpen lakton olan iridoitlerin siklopentan halkasının parçalanması sonucu oluşmaktadır (45). En fazla zeytin ağacında (*Olea europea*) bulunmaktadır.

Molekülün bileşiminde Şekil 2.2.5’de görüldüğü gibi üç alt birim yer alır;

- 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol
- Elenoik asit
- Glikoz (46)



Şekil 2.2.5. Oleuropeinin molekül yapısı

Oleuropein molekülü glikozit yapısında bir bileşik olup antiaterojenik, antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar, antikanserojenik ve antimikrobiyal etkilere

sahiptir (47). LDL oksidasyonunu önleyerek damarları koruduğu ve antihipertansif etki gösterdiği rapor edilmiştir (48).

Zeytin meyvesine kendine özgü acımsı tadı veren bileşik olan oleuropein meyvenin olgunlaşmamış halinde daha yüksek oranda bulunur ve meyve olgunlaştıkça miktarı azalır (49). Oleuropein sadece zeytinin meyvesinde değil tüm organlarında bulunur. En zengin kısmı yaprağı olup bu kısımdaki içeriği ortalama 60-90 mg/kg kuru ağırlık olarak hesap edilmiştir (48). Zeytin ağacının çok uzun yıllar hayatta kalarak meyve verebilmesi ağacın hemen tüm kısımlarında bulunan oleuropeinin koruyuculuğu ile açıklanmaktadır. Oleuropein bünyesindeki elenolik asit ve bir metaboliti olan kalsiyum elenolat ağacın kabuk ve yapraklarının önemli bileşenidir ve çok çeşitli zararlı mikroorganizma türünü uzaklaştırıcı etkiye sahiptir (50).

Glikozit yapılı bu molekülün acımsı tadı nedeniyle hasat edilen zeytinler hemen tüketime sunulamazlar. Birtakım yöntemler kullanılarak bu molekülün zeytinden uzaklaştırılması sağlanır ve acı tadı kaybolan zeytin tüketilebilir hale gelir. Kullanılan yöntemler arasında geleneksel salamura, seyreltik bazik çözeltilerde bekletme, enzimatik yöntemler ve mikroorganizmaları kullanma sayılabilir (51). Enzimatik uzaklaştırma yönteminde oleuropein- β -glikozidaz enzimi yardımıyla hidroliz edilen oleuropein glikoz ve aglikan ünitelerine parçalanmaktadır (52).

Oleuropeinin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin yanı sıra metaboliti olan elenolik asit ise güçlü antiviral etkili bir moleküldür. Sudjana ve arkadaşları (2009), (53) yaptıkları çalışmada elenolik asitin antiviral etkinliğini, Lee ve arkadaşları (2010), (54) ise oleuropeinin birçok bakteriye karşı bakterisidal etkinliğini ortaya koymuşlardır. Winkelhousen ve arkadaşları (2005) (55) da oleuropeinin antifungal etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Amerika'da yapılmış olan bir çalışmada Fredrickson ve arkadaşları (2000), (56) oleuropeinin herpesvirüs, rotavirüs, hepatit ve canine parvo virüslerine karşı antiviral etkinliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Oleuropeinin tek başına kullanıldığı çalışmalarda önemli düzeyde antimikrobiyal etkinliğinin gözlemlendiği çok defa rapor edilmiş olmasının yanı sıra zeytin ya da zeytin yaprağı ekstrelerinin kullanıldığı çalışmalarda daha güçlü etkiler gözlenmiştir. Bu bağlamda, zeytin yaprağı bileşiminde bulunan çok çeşitli türdeki polifenolik yapıların oleuropein ile gösterdiği sinerjik etki ile hali hazırdaki antimikrobiyal etkinliğin şiddetinin potansiyelize edildiği söylenebilir.

2.3. Antioksidan Aktivite Ölçüm Yöntemleri

Bir molekülün gösterdiği antioksidan potansiyeli kantite etmek üzere o molekülün;

-Bir elektron ya da hidrojen donörü olarak gösterdiği reaktivite

-Kısa yarı ömre sahip yüksek reaktiviteli bir radikal ile etkileşerek onu daha stabil, yarı ömrü uzun ve daha düşük reaktiviteli başka bir radikale dönüştürebilme yeteneği;

-Ortamda bulunabilen farklı antioksidan moleküllerle gösterdiği sinerji

-Metal iyonlarını şelatlayabilme potansiyeline bakılır (57).

İdeal olan *in vivo* koşullarda üretilen radikallere karşı antioksidan etkili olduğu düşünülen molekülün gerçek etkinliğini yine aynı koşullarda ölçmektir. Gerek radikallerin çok kısa yarı ömre sahip olması gerekse *in vivo* ortama uygun bir ölçüm tekniğinin adaptasyonunun güçlüğü nedeniyle antioksidan kapasite ölçümünde *in vitro* ve dolaylı ölçüm teknikleri kullanılmaktadır. Serbest radikalleri direk ölçen yöntem elektron spin rezonans spektrometresidir. Ancak ileri düzeyde teknik donanıma gereksinim duyulması nedeniyle çok yaygın kullanım alanına sahip değildir. Bu nedenle indirekt yollarla geliştirilen ve oksidasyon ya da redüksiyon ürünlerini ölçen teknikler daha yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (58).

Bu yöntemler kullanılan ölçüm tekniğine göre birbirinden ayrılmaktadırlar;

2.3.1. Spektrometrik Teknikler

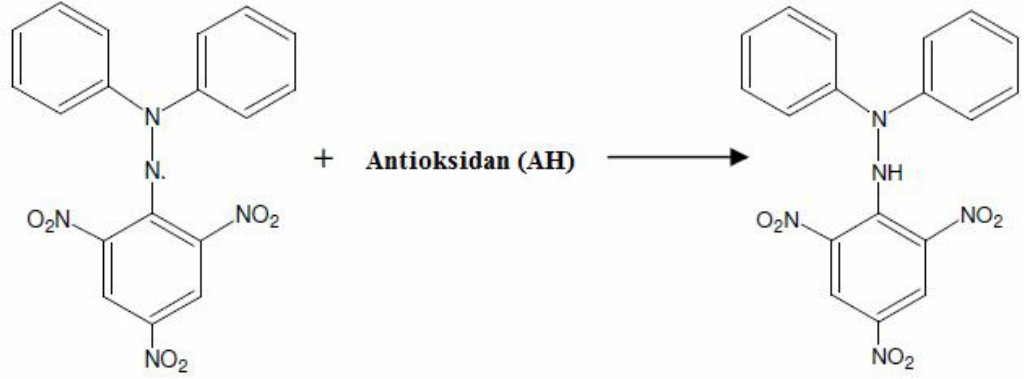
Spektrometrik ölçümlerin esas alındığı bu yöntemlerde serbest radikalın ya da bir radikal kationun bir antioksidan molekülle reaksiyona girmesi ve bir hidrojen transferi temeline dayanmaktadır.

2.3.1.1. DPPH Metodu

Yöntem Blois (59) tarafından 1958 yılında geliştirilmiştir. 1995 yılında Brand ve arkadaşları (60) tarafından modifiye edilerek antioksidan kapasite ölçümlerinde kullanılmıştır. DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) stabil bir serbest radikal moleküldür ve hidrojen donörü moleküller ile reaksiyon verebilmektedir. 517 nm de absorbans veren DPPH· radikali hidrojen verebilen bir antioksidan molekülle reaksiyona

girdiğinde kendine özgü mor rengin şiddeti azalır ve bu azalma spektrofotometre ile 517 nm de izlenebilir.

Bu metotta başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren antioksidan miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden IC_{50} değeri olarak hesap edilir.

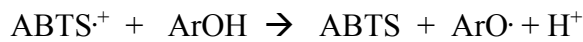


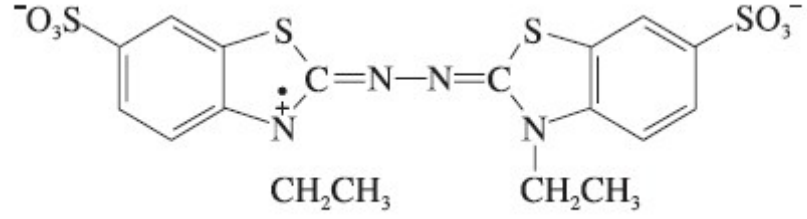
Şekil 2.3.1.1. DPPH radikalinin hidrojen verebilen bir antioksidan ile reaksiyonu (60)

2.3.1.2.ABTS Metodu

Bu yöntem ilk olarak 1993'te Miller ve arkadaşları (61) tarafından geliştirilmiş olup daha sonra van den Berg ve arkadaşları(1999), (62) sonrasında ise Re ve arkadaşları (1999), (63) tarafından modifiye edilerek antioksidan kapasite ölçümlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Yöntem bir diğer adıyla TEAC (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite ölçümü) olarak da bilinmektedir. Araştırmacılar tarafından kullanılan son şekliyle yöntem ABTS ile manganezi dioksit MnO_2 ya da potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)'ın reaksiyonu sonucu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis (3-etil benzotiyazolin-6-sülfonik asit) katyon radikali oluşur. Oluşan radikal yeşil/mavi renkli bir komplekstir ve 734 nm'de spesifik absorpsiyon verir. Ortamda antioksidanların bulunması (standart olarak Vitamin E'nin suda çözünen bir analogu olan Trolox kullanılır) absorpsiyonun azalmasına neden olur.

Radikal ile antioksidan molekül arasında cereyan eden reaksiyon aşağıdaki gibidir;

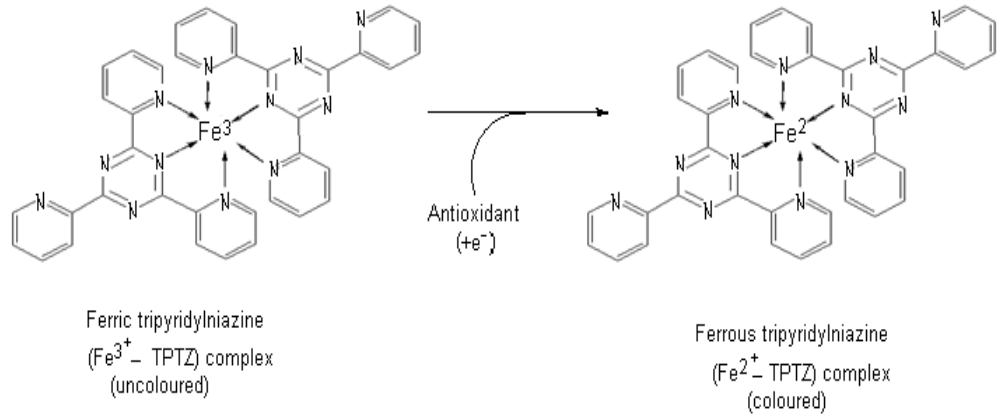




Şekil 2.3.1.2. ABTS radikalinin kimyasal yapısı (61)

2.3.1.3.FRAP Metodu

FRAP (Ferric reducing antioxidant power: Ferrik iyon indirgeyici antioksidan potansiyel) yöntemi Fe^{+3} –TPTZ (2,4,6-tri (2pyridyl)-1,3,5-triazine) kompleksindeki ferrik demirin antioksidan moleküller tarafından Fe^{+2} (ferröz) forma dönüştürülmesi ve kompleksin Fe^{+2} –TPTZ şekline dönüşürken absorbans değişiminin izlenmesi temeline dayanmaktadır (64). Oluşan kompleks mavi-lacivert bir renge sahiptir (Şekil 2.3.1.3). Bu yöntemde trolox veya askorbik asitten bir tanesi referans antioksidan molekül olarak kullanılabilir.

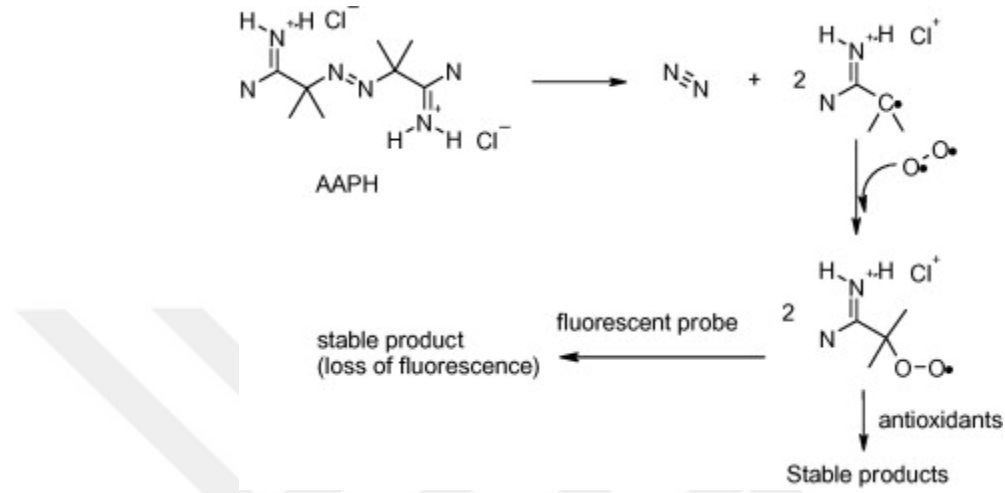


Şekil 2.3.1.3. Fe(II) ve Fe(III) ile oluşan Fe-TPTZ kompleks yapıları (64)

2.3.1.4.ORAC (Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi) metodu

Bu yöntemde peroksil radikale karşı süpürücü aktivite ölçülmektedir. Yöntem Coa ve Prior (1999), (65) tarafından geliştirilmiştir. Peroksil radikalının oluşumu 2,2-

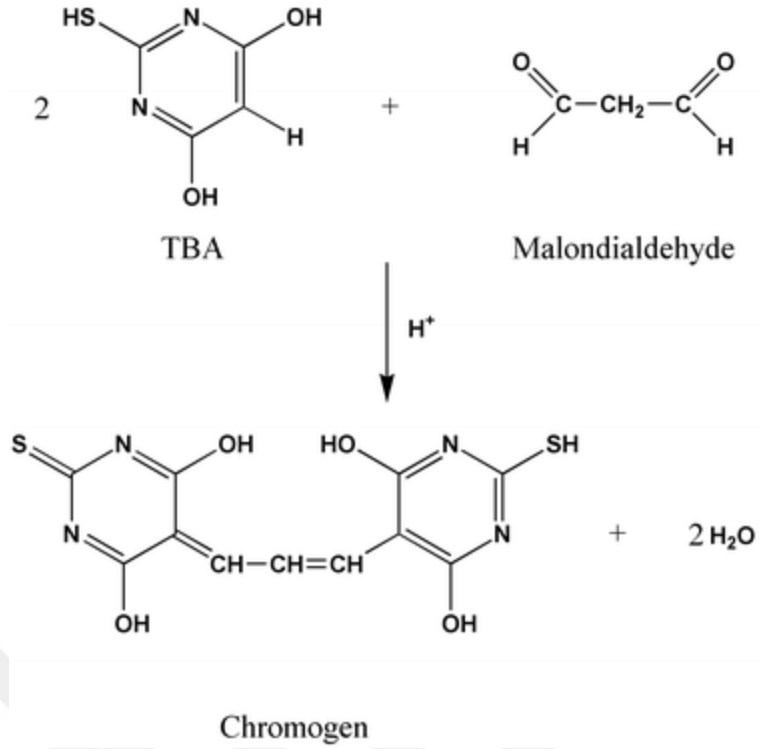
azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) gibi azo bileşiklerin ısı bozulması ile sağlanmaktadır. Floresein, floresan prob olarak kullanılır ve peroksil radikali ile etkileşime girdiği oranda floresan bozunmaya uğrar. Referans molekül olarak Trolox kullanılır.



Şekil 2.3.1.4. ORAC yönteminde peroksil oluşumu ve antioksidan molekülün girişimi(65)

2.3.1.5.Lipid peroksidasyonu inhibisyonu metodu

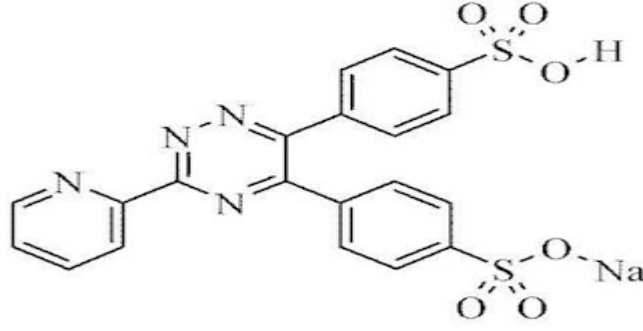
Bu yöntemde Fenton reaksiyonu, (2005), (66) uyarınca Co(II) ve H₂O₂ etkileşiminden oluşan serbest radikaller ile ortamdaki lipid moleküllerinin oksidasyonuna karşı antioksidan moleküllerin koruyucu etkinliği belirlenir. Standart yöntemde substrat lipid molekülü olarak α -linolenik asit tercih edilir. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak TBARS (tiyobarbutirik asit reaktif madde) ölçümü yapılır.



Şekil 2.3.1.5. Tiyobarbutirik asit ile lipid peroksidasyon ürünü MDA etkileşimi (66)

2.3.1.6. Metal şelatlayıcı aktivite metodu

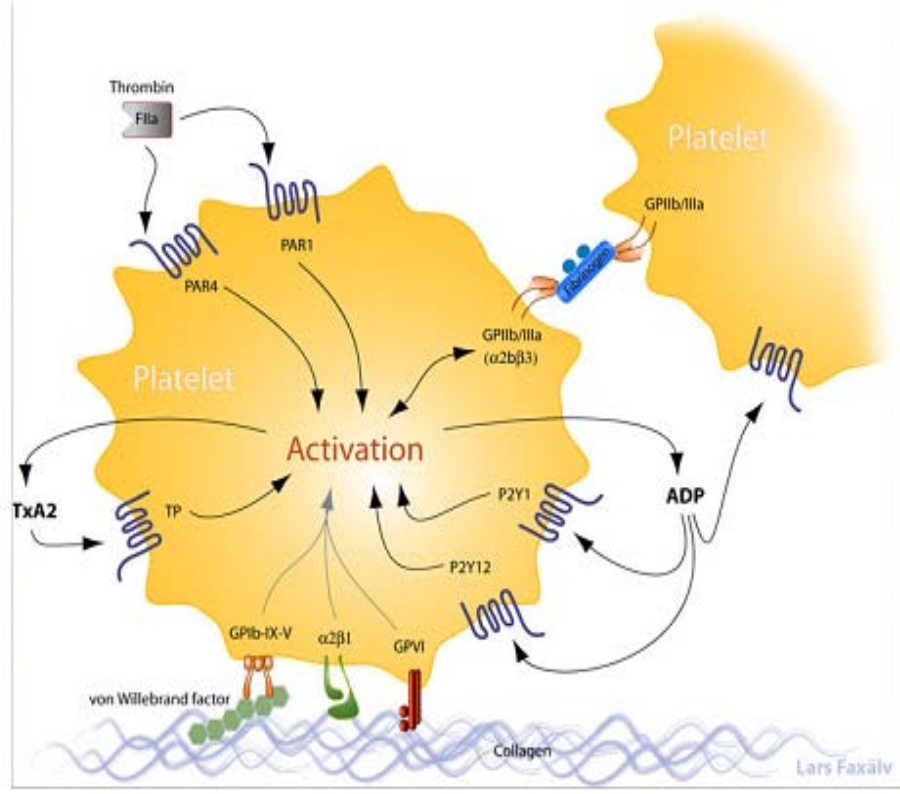
Fenton reaksiyonu ortamda 2+ yüklü metal iyonlarının varlığında hidrojen peroksidi hidroksil radikaline dönüştürerek oksidatif stresin şiddetini artırır. Hidroksil radikali en küçük ve en reaktif serbest oksijen radikalidir, yarı ömrü çok kısadır ve başta DNA olmak üzere biyomoleküllerde ciddi oksidatif hasarlar oluşturur. Bu nedenle ortamda bulunan metal iyonlarının uzaklaştırılarak Fenton reaksiyonuna katılmalarının engellenmesi bir çeşit antioksidan savunma mekanizması olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde Fe⁺² iyonlarının Ferrozin ile kompleks oluşturmasının, demirin şelatlanarak ortamdaki uzaklaştırılması ile Ferrozinle reaksiyona giren demir miktarının azalması sonucu inhibe olması yani, Fe(II)-Ferozin kompleksi oluşumunun azalması nedeniyle daha az olması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyon spektrofotometrik olarak 562 nm’de takip edilir (67).



Şekil 2.3.1.6. Ferrozin molekül yapısı (67)

2.4. Trombosit aktivasyonu

Kan pulcuklarının, bir diğer adıyla trombositlerin temel işlevi hemostazisin sağlanmasıdır. Damar yapısının zedelenmesi ile hasarlanan bölgede primer tıkaç oluştururlar (68). Damar bütünlüğünün bozulmasını takip eden milisaniyeler içinde trombositler, endotel tabakasının zedelenmesi ile açığa çıkan subendotelial kollajenle köprüler oluşturarak etkileşime girerler. Hücrenin kollajene adezyonu von Willebrand faktör (vWF) vasıtasıyla gerçekleşir. vWF, kollajen ve trombosit hücre zarında bulunan özgün reseptörlerine bağlanarak ikisi arasında köprü oluşturur. Bu esnada hücre aktive olur ve bir seri reaksiyon tetiklenir. Birçok endojen uyarıcı; fibronektin, kollajen ve laminin, gibi matriks bileşenleri, adrenalin, ADH gibi hormonlar, trombin benzeri damar bütünlüğü bozulduğunda serbestleşen yapılar, aktive olan trombositlerin salıverdiği TxA₂, ADP söz konusu reaksiyonlar dizisini başlatırlar. Aktif trombositler disk benzeri yapıdan sferik yapıya dönüşürler ve hücre dış yüzeylerinde iplikçi yalancı ayaklar (filopodlar) oluşur. Hücre dış yüzeyinde fibrinojen algaçları fibrinojenin bağlanmasına uygun bir konformasyon kazanır. Fibrinojen köprüleri trombositleri birbirlerine bağlanarak agregasyonu sağlarlar (Şekil 2.4), (68, 69,70).



Şekil 2.4. Trombositlerin agregasyonu (71)

2.5. Trombosit aktivatörleri

Trombosit agonistleri trombosit aktivasyonunu başlatan yapılardır ve zayıf ve güçlü agonistler şeklinde iki guruba ayrılırlar. Güçlü agonistler (kollajen, trombin vb.) ortamda antitrombotiklerin mevcudiyetinde bile trombositlerde granüler sekresyonu ve agregasyonunu sağlayabilirler. Zayıf agonistler (ADP, epinefrin vb.) ise ancak bir başka agonist ile birlikte tam bir agregasyona neden olabilirler, aksi halde sadece az sayıda trombositde zayıf agregasyon oluşumuna neden olurlar (72).

2.5.1. Agonistler

2.5.1.1. ADP

Trombosit agonistleri arasında fonksiyonu ilk belirlenen agonist ADP dir. Normal olarak hücre içi bir moleküldür ve plasma konsantrasyonu son derece düşüktür. Ancak herhangi bir nedenle kan hücreleri ya da damar çeperini oluşturan endotel hücrelerde bir hasar oluşursa hücre dışına çıkar ve bu sayede plasma konsantrasyonu yükselir. Diğer yandan trombosit granüllerindeki konsantrasyonu da oldukça yüksektir

ve trombositlerde granüler sekresyon oluştuğunda buradan ortama önemli miktarda ADP salınımı gerçekleşir. Açığa çıkan ADP molekülleri iki farklı reseptör aracılığı ile trombositlere bağlanmaktadır. Bunlardan bir tanesinin ADP molekülüne olan affinitesi daha yüksektir. Zayıf bir agonist olan ADP tek başına güçlü bir uyarıma neden olamaz, ancak ortamda epinefrin de bulunduğu ADP-reseptör etkileşim oranı yükselmektedir yani affinite artmaktadır. Benzer şekilde kalsiyum iyonları da affiniteyi artırmaktadır. Laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda ADP varlığında trombositlerin morfolojik değişiklikler gösterdiği, fibrinojen reseptör sayısının arttığı ve primer agregasyonun uyarıldığı gözlenmiştir (72,73).

2.5.1.2.Trombin

Sağlam damar duvarında inaktif olan trombin, damar duvarı hasarlandığında doku tromboplastini katalizörlüğünde protrombin trombine dönüşür. Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürmesinin yanısıra trombosit aktive edici özelliğe sahiptir. Trombin, trombositler üzerinde GPIb üzerindeki reseptörüne bağlanır. Bu reseptör trombosit membranı yedi kez kateden bir transmembran proteindir. Trombinin trombositler üzerindeki sinyal ileti mekanizması, C proteini üzerinden fosfolipaz C nin aktivasyonu şeklindedir. Aktive olan PLC hücre membran fosfolipidlerinden fosfatidil inositol bünyesindeki inositol difosfatı (IP2) inositol trifosfat (IP3) şeklinde serbestleştirir. Beraberinde ortama diaçilgliserol (DAG) de salınmaktadır. IP3 endoplasmik retikulum membranında lokalize olan ligand bağımlı kalsiyum kanallarını açarak hücre içi Ca düzeylerini artırır. Ca aracılı kinaz aktivasyonu gözlenir ve trombositler aktive olurlar (72,74).

2.5.1.3.Kollajen

Endotel yapısı sağlam ise trombositlerin subendotelial ekstrasellüler matriks ile karşı karşıya gelmesi söz konusu değildir. Ancak damar endotelinde hasar oluşması durumunda kollajen serbestleşir ve trombositlerle temas eder. Bu aşamada trombositlerde bir “lag fazı” oluşur. Lag fazını takiben şekilsel değişiklikler, aktivasyon, agregasyon ve sekresyon gerçekleşir. Trombositin kollajene bağlanması trombosit hücre membranı yüzeyinde yer alan farklı bağlanma bölgeleri ile kollajen fibrili üzerindeki bağlanma bölgelerinin multifokal kenetlenmesi sonucu oluşur. Bu bağlanma sonrasında PLC aktive olur. Bunu fosfolipaz A2 (PLA2) aktivasyonu izler. PLA2 aktivasyonu ile araşidonik asitin metabolizasyonu sonucu oluşan endoperoksitler ve tromboksanlar

sürecin dışında kalan trombositlerin de aktivasyonunu sağlayarak oluşan yanıtı şiddetlendirirler (72,75).

2.5.1.4.Araşidonik asit ve TxA2

Gerek PLA2'nin aktivasyonu sonucu ortama endojen olarak salınan araşidonik asit (ARA) gerekse eksojen olarak ortama dışarıdan ilave edilen araşidonik asit, siklooksijenaz katalizörlüğünde hızla siklik yapılı prostoglandin endoperoksitlere (PGG2 ve PGH2) dönüşür. Bu ürünler trombosit aktivatörleridirler. Ancak kısa yarı ömürlüdürler ve tromboksan sentetaz aktivitesi ile TxA2'ye dönüşürler. Hem endoperoksitler hem de TxA2 trombositler üzerinde özgün bağlanma bölgelerine bağlanarak trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyona ve skresyona neden olurlar (72,76).

2.5.1.5.Epinefrin

Katekolaminler de trombosit agonisti moleküller olmalarına rağmen epinefrinin fizyolojik konsantrasyonları trombositler üzerinde aktive edici etki gösterebilmesi için gerekli olan konsantrasyonun 10^6 'da biridir. Epinefrinin trombosit agregasyonu üzerine olan etkisi diğer agonistlerle birlikte oluşan etkiyi potansiyelize edici özelliktedir (72,77).

2.5.1.6.PAF (Platelet aktive edici faktör)

Trombosit aktive edici faktör olarak tanımlanır. Yangısal süreçlerde rol oynayan hücrelerin membran lipidlerinden sentezlenip salgılanan ve fosfolipit karakterde bir proinflamatuvar sitokindir. Trombositler üzerinde spesifik reseptörleri vardır ve güçlü bir aktivatördür. Aktive olan trombositlerde şekil değişikliği, granül sekresyonu ve agregasyonu indükler (72,78).

2.6.Trombosit fonksiyon bozuklukları

Hemostaz damar bütünlüğünün bozulması ve kanamaya karşı vücudun verdiği bir tepkidir. Trombositler bu süreçte dört basamaktan oluşan bir işlev görürler; damar iç yüzeyinde (endotel tabakada) bir hasar oluştuğunda trombosit yüzeyinde bulunan GP algaçlarıyla subendotelyal katmandaki kollajen, trombospondin, vWF, fibrinojen ve fibronektin bağlanmaya girerler. Bu suretle damar bütünlüğünün bozulduğu alanda trombositlerin yapışması sağlanmış olur. Bu basamak aynı zamanda trombosit hücrelerinde aktivasyonu da başlatmış olur. Aktive olan trombositlerde artan sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun tetiklediği süreçler de aktif haldedir. Hücre yüzey

reseptörlerinden alınan uyarım sonucu alfa granül sekresyonu gerçekleşir. Sekrete edilen agonistlerden biri olan ADP, yüzey reseptörlerinden GIIb/IIIa bünyesinde konformasyonel değişiklikler oluşturur. Yeni bir konformasyona kavuşan bu reseptörler ile bağlanan fibrinojen aracılığı ile belli sayıda trombositin katıldığı trombosit agregasyon süreci başlar. Buna yeni trombositler eklenir ve primer tıkaç oluşumu gerçekleşmiş olur (79,80).

Aktive olan trombositlerin yüzeylerindeki yüzeylerindeki fosfolipitler birtakım değişiklikler gösterirler. Bu suretle bazı koagülasyon faktörlerinin aktivasyonları tetiklenir. Böylece trombositlerin prokoagülasyon aktivitesi gözlenmiş olur. Trombosit fonksiyonlarında herhangi bir bozukluk sonucu primer tıkaç oluşamaz ve hemorajik yatkınlık gelişir (81). Bu tür kusurlar genetik ya da edinsel (akkiz) nedenlidirler (83).

Kalıtsal trombosit fonksiyon bozuklukları;

1-Trombosit adezyon bozuklukları (von Willebrand hastalığı, Bernard-Soulier sendromu)

2- Trombosit agregasyon bozuklukları (Glanzmann trombastenisi)

3- Trombosit sekresyon bozuklukları

4-Depo havuzu eksikliği

5-Alfa-granül eksikliği (Gri trombosit sendromu)

6-Delta-granül eksikliği (Delta depo havuzu eksikliği)

7-Granül sekresyon anomalisi(Enzimatik yolak kusurları)

8- Tromboksan sentez kusurları

9-Trombosit prokoagülan aktivite bozuklukları

10-Trombosit sayı ve fonksiyon anormalliklerinin birlikteliği (84).

Kalıtsal trombosit fonksiyon bozukluklarının görülme sıklığı oldukça nadir iken, akkiz trombosit fonksiyon bozukluklarına daha sık karşılaşılr,

Akkiz trombosit fonksiyon bozuklukları etiyolojileri;

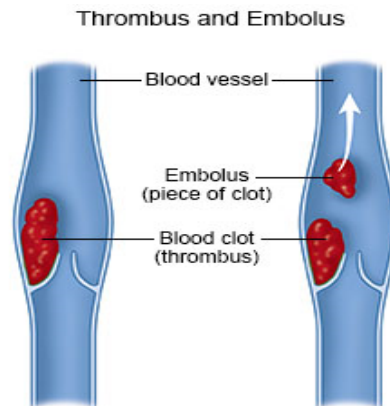
1-Sistemik hastalıklar

2-Böbrek yetmezliği

- 3-Karaciğerer hastalıkları
- 4-Kardiopulmoner by-pass cerrahisi
- 5-Trombosit otoantikorları varlığı
- 6-Hematolojik Hastalıklar
- 7-Paraproteinemiler
- 8-Myeloproliferatif hastalıklar
- 9-Myelodisplastik sendrom
- 10-Lenfoproliferatif hastalıklar
- 11- Lösemiler
- 12- Akkiz depo havuzu eksiklikleri
- 13-İlaçlar, gıdalar ve gıda katkı maddeleri (85).

2.6.1.Trombus oluşumu

Trombositlerin yetersiz fonksiyonları nedeniyle agregasyon kabiliyetlerinin azalması ve primer tıkaç oluşumunun aksaması organizma için ciddi kanama riski oluşturmakla beraber trombosit agregasyonunun ihtiyaç bulunmadığı hallerde fizyolojik olmayan etkenler ve koşulların etkisiyle oluşması trombus oluşumuna neden olur. Trombus arter ya da ven damarları içinde gerçekleşebilen ve kopma eğilimi (emboli) yüksek olan kümelenmiş trombosit agregatlarıdır(trombus) (Şekil 2.6.1.1.). Yüksek oranda tıkanıklık riski oluştururlar (86).



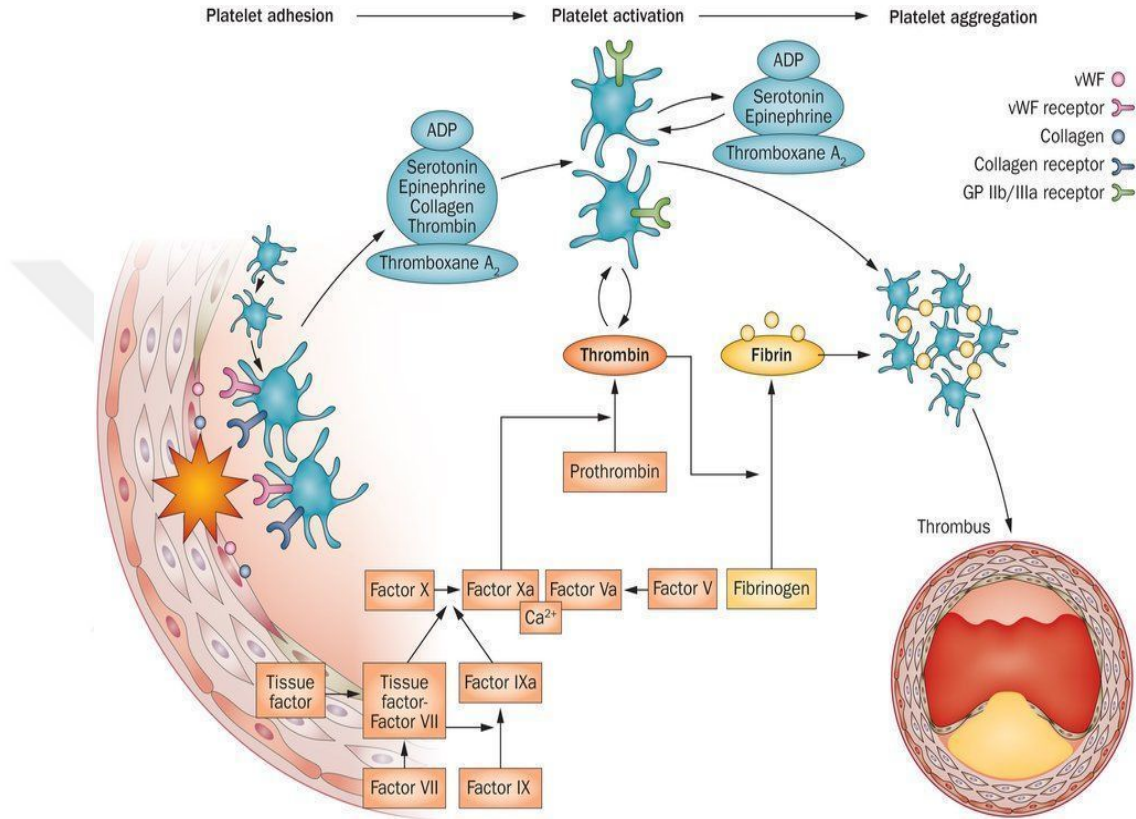
Şekil 2.6.1.1. İnvasküler trombus ve emboli görünümü (87).

Trombus oluşumunda rol oynayan patojenik faktörler arasında ilk üç sırayı;

i)Damar hasarı

ii)Kan akımında yavaşlama (staz)

iii)Koagülasyon faktörlerinin aşırı mevcudiyeti, oluşturmaktadır (87).



Şekil 2.6.1.2. Trombus oluşum mekanizması (88)

Trombosit aktivasyonunun kontrolü son derece hassas, bıçak sırtı bir denge halindedir. Koagülasyon mekanizmalarının aksaması hayati sonuçlar doğurabilecek kanamalara neden olurken, trombositlerin aşırı aktivasyonu ve agregasyonu trombus ve emboli riski oluşturmaktadır. Emboli damar çeperine yapışık haldeki agregattan koparak dolaşıma geçen ve organizmada beynin ve akciğerin de içinde bulunduğu hayati organlarda damar tıkanıklıklarına neden olabilen pıhtı parçacıklarıdır. Tıkanıklığın olduğu noktadan sonraki doku kısımlarının kan akımı kesilmiş olduğundan bu bölgelerde iskemik hasar ve doku nekrozları gelişmektedir. Trombo-

embolik hasarın en sık görüldüğü ve ciddi sonuçlar doğurduğu iki tipi pulmoner emboli ve serebrovasküler tıkanıklıklardır. Pulmoner emboliye bağlı ani ölümler ve serebrovasküler tıkanıklıklar nedeniyle oluşan inme ve sonrasında kalan sekeller hastalığın ciddi sağlık problemleri arasında yer almasına neden olmaktadır (89).

2.6.2.Trombosit fonksiyon testleri

Trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan temel üç farklı sistem bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi altın standart olarak bilinen “Chrono-Log” (CL) sistemi, diğeri ise “PFA-200” sistemidir. CL sistemi rutin laboratuvarlarda ilk kurulan sistem olup hala en yaygın biçimde kullanılan sistemdir. PFA-200 sistemi ise daha kısa bir geçmişe sahiptir. Verify Now sistemi ise diğeri iki sisteme göre daha az kullanılan ancak hasta başında kullanılabilme özelliğine sahip pratik bir sistemdir (90). Burada en yaygın biçimde kullanım alanına sahip olan Chrono-Log sisteminin iki ölçüm tekniğine yer verilecektir.

2.6.2.1.Chrono-Log sistemi

2.6.2.2.Işık transmisyon agregometri

Aynı hastaya ait trombositçe fakir plasma (PPP) örneğinin kör olarak, trombositçe zengin plasmanın (PRP) ise numune olarak kullanıldığı bir tekniktir. PRP içerisine agonist eklendiğinde aktive olan trombositler agregre olarak türbiditede azalmaya ve ışık geçirgenliğinde artışa neden olurlar. Işık geçirgenliğindeki artış ile agregre olan trombosit miktarı arasında kantitatif bir ilişki kurulmaktadır (90,91).

2.6.2.3.İmpedans agregometrisi

Bu teknikte test kuvvetleri içerisine yerleştirilmiş olan elektrotlardaki elektriksel direnç aktive olan trombositlerin elektrot yüzeyine tutunmalarına bağlı olarak artış göstermektedir. İmpedans artışı ile agregasyon yüzdesi arasındaki pozitif korelasyondan yararlanılarak trombosit aktivasyonu için kantitatif bir değer hesaplanmaktadır (90,92).

3. MATERYAL-METOT

Deneyleerde Hatay'ın Arsuz İlçesi sınırları içerisinde yetiştirilen Halhalı türü zeytin ağaçlarından (Resim 3.) hasat döneminde toplanan zeytin meyve ve yaprakları materyal olarak kullanıldı.



Resim 3. Zeytin ve yapraklarının toplandığı Halhalı Türü zeytin ağaçları

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan Gallik asit, petrol eteri, butillenmiş hidroksi tolüen (BHT), 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), amonyum molibdat, Folin-Ciocalteu reaktifi, $\text{Na}_2(\text{CO})_3$, quercetin, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, TCA, BSA, etanol, metanol, askorbik asit, kollajen, epinefrin, ADP, ferrozin, FeCl_3 , KI, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, FeCl_2 , metanol, n-hekzan, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, H_2O_2 , H_2SO_4 , EDTA, CH_3COOK , TCA, NaOH, HNO_3 kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma Aldrich & Merck'ten temin edildi.

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

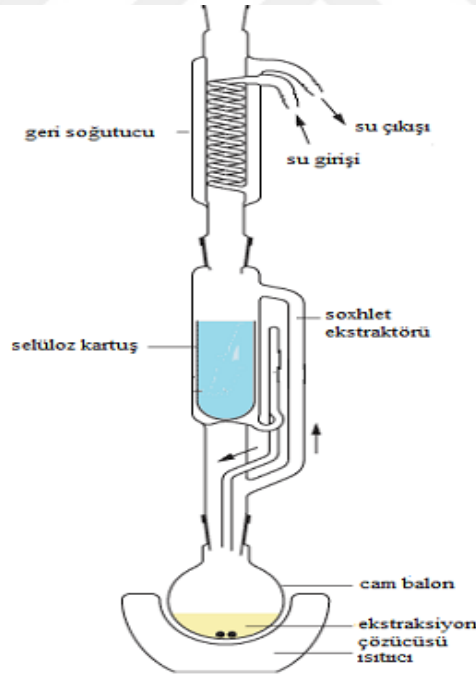
Deneyleerde, Soxhlet düzeneği, Brand marka otomatik pipet takımı, mermer havan, Orion pH-metre, Shimadzu 1201 spektrofotometre, Eppendorf santrifüj, Chrono-

Log agregometre, Beko buzdolabı, Sunny derin dondurucu, vorteks, RadWag terazi, çeker ocak, Nüve çalkalayıcı ve vakumlu evaporatör cihazları kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.3. Örneklerin Hazırlanması

Zeytin yaprakları kurutma kâğıtları üzerine serilerek oda sıcaklığında ve gölgede kurutmaya bırakıldı. Yapraklar kırılğan hale geldiğinde toplanarak havanda dövüldü ve toz haline getirildi. Meyveler çekirdeklerinden ayrıldı ve distile su ile yıkanarak kurutma kâğıtları üzerine serildi ve bir gece kurutuldu. Kurutulan çekirdekler havanda dövülerek iyice ezildi ve çok küçük partiküllü bulamaç haline getirildi. Bu işlem esnasında parçalanmış zeytin çekirdekleri içerisindeki çok az miktardaki jelimsi kısım ezilen odunsu kısım ile birlikte bulamaç benzeri bir yapı oluşmasına neden olmaktadır. Meyveler ise çekirdeklerinden sıyrıldıktan sonra önce havanda dövülüp ardından bıçaklı homojenizatörle 3 nolu uç kullanılarak bulamaç haline getirildi ve böylece zeytinin her üç bileşeni de Soxhlet ekstraksiyonunda kullanılmak üzere hazır hale getirilmiş oldu.

3.3.1. Soxhlet ekstraksiyonu

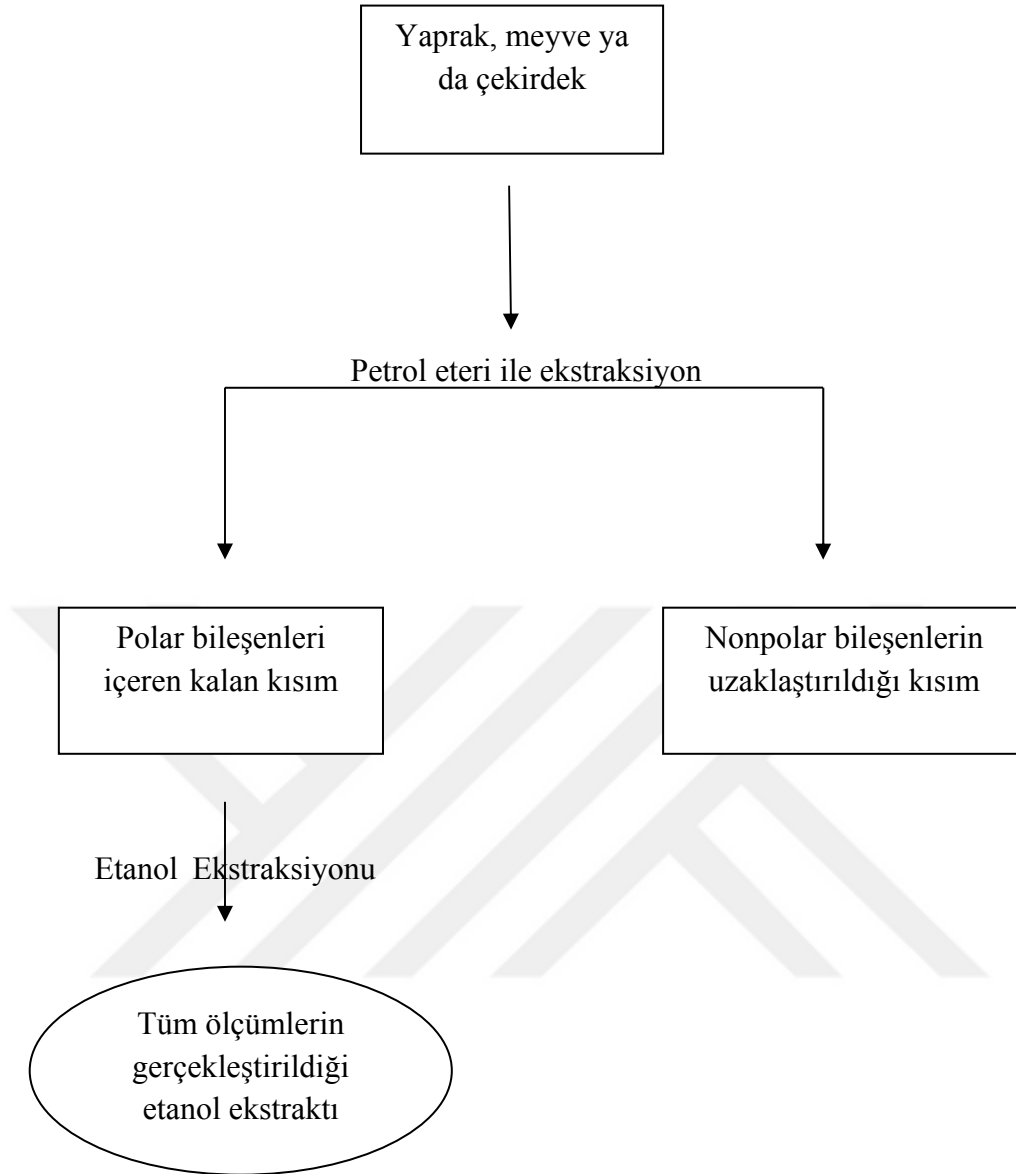


Şekil 3.3.1.1. Soxhlet ekstraksiyon sistemi

Şekil 3.3.1.1.'de Soxhlet ekstraksiyon düzeneği görülmektedir. Bu düzeneğin çalışma prensibinin temeli şöyledir; balonda kaynatılan çözücünün buharı yan borudan geçer ve soğutucuda tekrar yoğunlaşır kartuş içerisindeki örneğin üzerine damlar. Üst

kısımda toplanan çözücü yan kısımdaki kılcal boru seviyesini geçince ekstrakte edilen madde ile birlikte sifon yapar yani yeniden balona akar. Pek çok kez tekrarlanan bu olay sonucunda ekstrakte edilen bileşik balon içerisinde birikir. Son olarak çözücü uzaklaştırılarak ekstrakt saf olarak elde edilir.

Hazırlanan örneklerin dağılmasını önlemek için Soxhlet düzeneğinde kartuş içerisine örnekler (30g zeytin meyvesi, 16,000 g zeytin yaprağı ve ve 40,000 g zeytin çekirdeği ekstraksiyonla özüt elde etmek üzere kullanıldı) sıra ile yerleştirildi. Her bir örnek ilk olarak 400 mL petrol eteri kullanılarak 3 saat süresince 55 °C'de ekstrakte edildi ve önce lipofilik karakterli nonpolar bileşenler uzaklaştırıldı. Daha sonra 400 mL etanol ile ekstraksiyon işlemine devam edildi. Çözücü olarak kullanılan etanol uçurularak balon içerisinde kalan yüksek yoğunluktaki etanol ekstraktı tartıldı. Zeytin yaprağından 2,600 g, meyvesinden 1,700 g ve çekirdeğinden 0,900 g özüt elde edildi. Daha sonra elimizdeki bu ekstraktlar distile su içerisinde çözülerek tüm ölçümlerin gerçekleştirileceği stok çözeltilerimiz elde edildi ve her biri plastik kapaklı tüplerle 10 eşit hacme bölünerek etiketlendi ve ölçüm anına kadar -40 °C de derin dondurucuda muhafaza edildi.

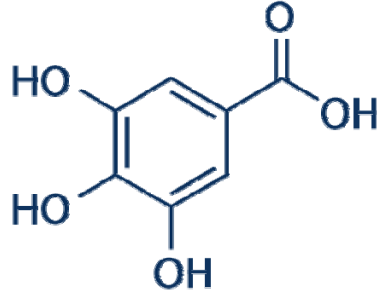


Şekil 3.3.1.2. Ekstraksiyon işlem aşamalarının şematize edilmesi

3.4. Kantitatif Analizler

3.4.1. Toplam fenolik madde içeriği tayini

Hazırlamış olduğumuz her üç ekstrenin içerdiği total fenolik madde miktarı Folin-Ciocaltaeu reaktifi kullanılarak Slinkard ve Singleton (1977), (93) yöntemi uyarınca belirlendi. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Bu yöntemin temeli; değişen konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltilerine karşı okunan absorban değerlerinden elde edilen grafiğin standart eğrisini kullanarak örneğimiz içindeki total fenolik madde içeriğini gallik asit eşdeğeri şeklinde hesap etmektir.

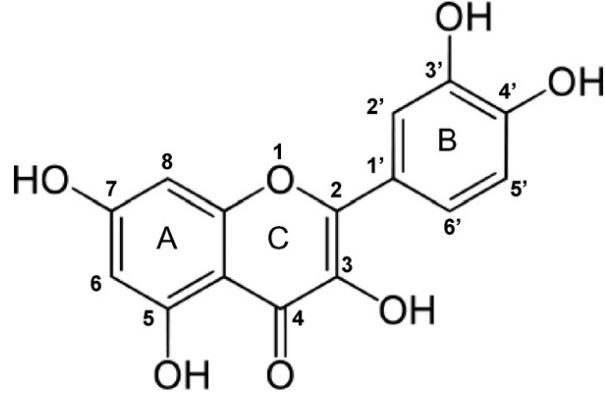


Şekil 3.4.1. Gallik asit molekül yapısı

Gallik asitin etanol içerisindeki 0,5 mg/mL'lik stok çözeltisinden 25-50-100-150-200-250-500 µg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Ekstraktların stok çözeltilerinden de 0,5 mg/mL konsantrasyonda seyreltilmiş çözeltileri hazırlandı. Deney tüplerine değişen konsantrasyonlardaki standart gallik asit çözeltilerinden ve numune çözeltisinden 40 µL konularak üzeri saf su ile 1200 µL'ye tamamlandı. Üzerine 200 µL 2N Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilerek vorteksle iyice karışması sağlandı. Daha sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dak bekletildi. Ardından 600 µL %20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi ve yine vorteksle iyice karışması sağlandı. Tüpler 25 °C sıcaklığındaki çalkalamalı su banyosunda 2 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV-VIS spektrofotometrede 765 nm'deki absorpsiyonları ölçüldü. Çizilen standart grafiği yardımıyla örnek içerisindeki total fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri olarak hesap edildi. Örnek ölçümleri çift çalışıldı ve iki ölçüm değerinin aritmetik ortalaması kullanıldı.

3.4.2. Toplam flavanoid madde içeriği tayini

Örneklerdeki toplam flavanoid madde içeriği tayini Moreno ve arkadaşları (2000), (94) tarafından geliştirilen ve temeli flavanoid yapıları metal iyonlarıyla kompleks oluşturmasına dayanan yöntem uyarınca gerçekleştirildi. Bu çalışmada kompleks oluşumunda kullanılan metal iyonu alüminyumdur. Standart molekül olarak quercetin kullanıldı. Al(III) ile quercetin yapısındaki halka sistemlerinden A'daki 5-OH ve C'deki 3-OH ve 4-CO grupları Al(III) ile renkli kompleks oluşturmaktadırlar.



Şekil 3.4.2 Quercetin molekül yapısı

Metanol içerisinde quercetin'in son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde stok standart çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden seyreltme yoluyla 15, 30, 45, 60 ve 75 µg/mL konsantrasyonlara sahip seyreltik çözeltiler hazırlandı ve standart olarak kullanıldı. Örnek olarak yine 0,5 mg/mL konsantrasyondaki etanollü ekstraktlar kullanıldı. Deney tüplerine ilk olarak 100 µL %10'luk $Al(NO_3)_3$ konuldu, üzerine 100 µL 1M CH_3COOK ve 3,8 mL metanol eklendi, ardından standart ölçümleri için 1ml standart çözeltisinden örnek ölçümleri için ise 1 mL ekstrakt çözeltisinden eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı ve 25 °C sıcaklığındaki çalkalamalı su banyosunda 45 dak inkübasyona bırakıldı. Oluşan sarı renkli kompleksin spektrofotometrede 415 nm de absorbansı ölçüldü. Numune ölçümleri çift ölçüm şeklinde çalışılarak iki ölçüm değerinin aritmetik ortalaması alındı. Çizilen standart grafiği yardımıyla örnekler içerisindeki total flavanoid madde içeriği quercetin eşdeğeri olarak hesap edildi.

3.4.3.İndirgeyici potansiyel tayini

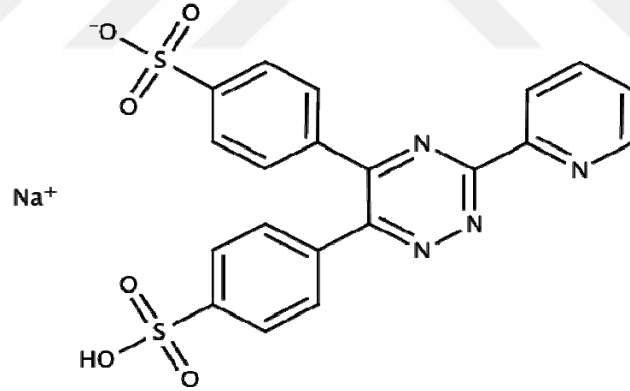
Ekstrelerin toplam indirgeyici potansiyelinin belirlenmesi Oyaizu (1986), (95) metodu uyarınca gerçekleştirildi. Bu yöntemde Fe^{+3}/Fe^{+2} dönüşümü ile deney ortamında oluşan sarı rengin yeşile dönmesinin 700 nm'de absorbansın izlenmesi ve yüksek absorbansın yüksek indirgeme potansiyeline karşılık gelmesi temel alınmaktadır.

Standart çözeltisi olarak kullanılacak olan BHT'nin 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki seyreltik çözeltileri hazırlandı. Örnek ölçümleri için 0,5 mg/mL'lik ekstre çözeltileri kullanıldı. Deney tüplerine 1ml standart çözeltilerinden ve 1ml örnek çözeltisi eklendi, üzerine 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M ve pH:6,6) eklendi,

ardından 2,5 mL $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi (w/v: %1) eklenerek vortekslendi. Bu karışım oda sıcaklığında 20 dak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışıma 2,5 mL TCA (w/v:%10) ilave edilip tekrar vortekslendikten sonra 3000 rpm'de 15 dak santrijüj edildi. Üstte oluşan süpernatant kısımdan 2,5 mL alınıp üzerine 2,5 mL distile su ve 0,5 mL demir (III) klorür- $FeCl_3$ çözeltisi (w/v: %0,1) eklendikten sonra vorteksle iyice karışması sağlandı. Oda sıcaklığında 10 dak inkübasyona bırakıldı ve başlangıçta oluşan sarı renk yeşile döndü. Spektrofotometrede 700 nm'de ölçülen BHT standartlarının absorbansları kullanılarak standart grafiği çizildi ve örneklerin indirgeyici potansiyeli saptandı.

3.4.4. Metal şelatlayıcı aktivite

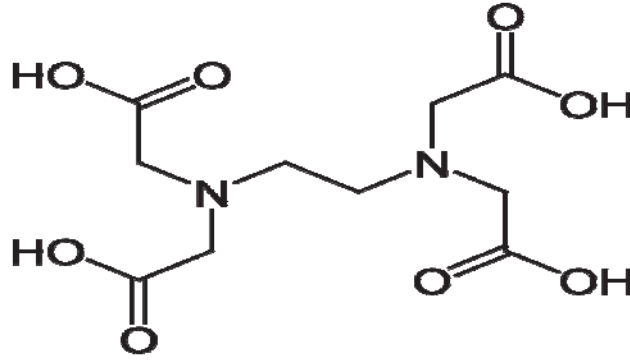
Metal şelatlayıcı aktivite tayini ortamdaki serbest Fe^{+2} iyonlarının ferrozinin ile birleşerek Fe-ferrozinin kompleksi oluşturması ve şelatlayıcı moleküllerin ortamdaki serbest demiri şelatlayarak bu kompleksin oluşumunu azaltması temeline dayanmaktadır (96). Oluşan kompleks spektrofotometrik olarak 562 nm dalga boyunda izlenebilmektedir. Ortamdaki şelatlayıcı özellikteki bileşenlerin miktarı ile ölçülen absorbans değeri arasında negatif bir korelasyon söz konusudur. Bilinen en güçlü şelatlayıcı moleküllerden biri olan EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 3.4.4.1. Ferrozinin molekül yapısı

Standart olarak kullanılacak olan EDTA çözeltisi 0,1-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25 mg/mL konsantrasyonlarda seyreltik standart çözeltiler şeklinde hazırlandı. Deney tüpüne 1 mL standart EDTA çözeltisi ve örnek tüpüne aynı miktarda ekstre çözeltisi konuldu, üzerine 50 μ L 2 mM $FeCl_2$ eklenerek vortekslendi, ardından 200 μ L 5 mM ferrozinin çözeltisi eklendi ve tekrar vortekslendi ve karanlıkta 10 dak inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda spektrofotometre ile 562 nm'deki absorbans ölçüldü. Artan

konsantrasyonla absorbans arasında negatif korelasyon gözlemlendi. Standart grafiği yardımıyla ekstraların metal şelatlayıcı etkinliği hesaplandı.



Şekil 3.4.4.2. EDTA molekül yapısı

3.4.5. H₂O₂ süpürücü aktivite tayini

Hidrojen peroksit süpürücü aktivite tayini Zhang ve arkadaşlarının (2000), (97) geliştirdiği titrasyon yöntemi uyarınca gerçekleştirildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanıldı. Titrasyon reaksiyonunun gerçekleştirileceği 50 ml'lik erlene 1 mL örnek veya pozitif kontrol (50-1000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda) ve 1 mL H₂O₂ (0,1 mM) eklendi, üzerine sırasıyla 100 µL amonyum molibdat (%3'lük), 10 mL H₂SO₄ (2M), ve 7 mL KI (1,8M) ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen sarı renkli karışım sarı renk kaybolana kadar 5mM Na₂S₂O₃ ile titre edildi. Aşağıdaki formüle göre, % H₂O₂ giderme etkisi değerleri hesaplandı. Burada,

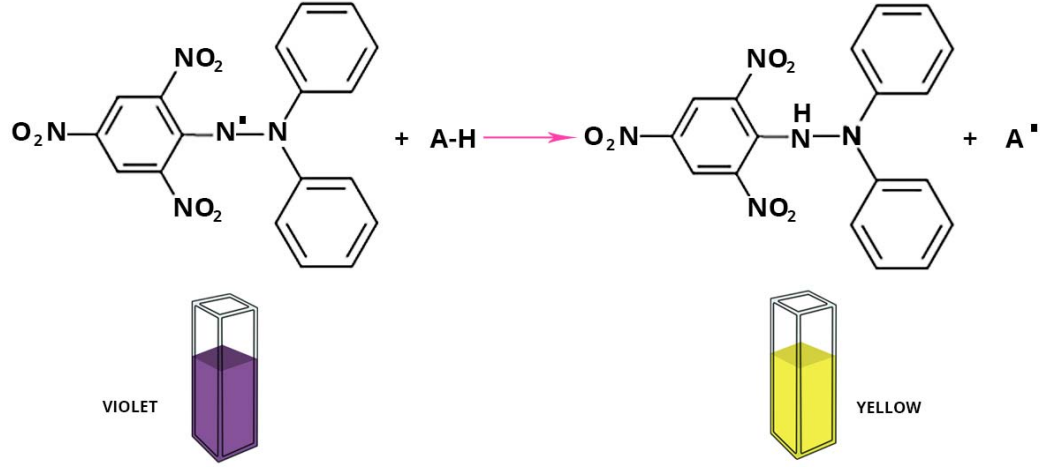
$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ Süpürücü Akt} = ((V_0 - V_1) / V_0) \times 100$$

V₀: Kontrol titrant hacmi

V₁: Numune ve standart titrant hacmi göstermektedir.

3.4.6. DPPH radikali söndürme aktivitesi tayini

DPPH radikali söndürme aktivitesi tayini Blois (1958), (98) yöntemi uyarınca gerçekleştirildi. Çok uzun zamandır antioksidan aktivite tayini amacıyla kullanılan bir yöntemdir.



Şekil 3.4.6. DPPH radikalinin antioksidan bir molekül ile etkileşimi

Bu yöntemde stabil bir serbest radikal olan DPPH'in reaksiyon ortamında bulunan hidrojen donörü özelliğindeki fenolik karakterli moleküller ile reaksiyon verme potansiyeli değerlendirilmektedir. Gerçekleşen reaksiyon nedeniyle azalan DPPH konsantrasyonu 517 nm'de spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı.

Standartların 5-10-25-50-100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarındaki seyreltik çözeltileri hazırlandı. DPPH'in 0,1mM'lık çözeltisi %70'lik metanol içerisinde hazırlandı. Standartlardan ve örnek çözeltisinden 3 mL alınarak deney tüplerine konuldu, üzerine 1 mL DPPH çözeltisi eklendi ve karışım vorteksle iyice karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 517 nm'de absorbans ölçüldü. Kontrol ölçümü için 3 mL metanol ile 1 mL DPPH çözeltisi karıştırılarak inkübe edildi ve inkübasyon sonrası absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerinden aşağıdaki formül uyarınca DPPH radikalini söndürme aktivitesi hesaplandı.

$$\% \text{ DPPH Radikali Söndürme Akt.} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A₀: Kontrol absorbansı

A₁: Örneklerin absorbansı

3.4.7. Antimikrobiyal aktivite tayini

Zeytin yaprak, meyve ve çekirdek ekstralarının antimikrobiyal aktivite tayinleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından tavsiye edilen agar dilüsyon yöntemi kullanılarak test edildi. Her bir ekstre için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) standart bakteri ve mantar suşlarına karşı test edildi. Bakteri suşları; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, Mantar suşları; *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida albicans* ATCC 14053 American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD tarafından elde edildi.

Bakteri suşları Muller Hinton Broth (Merck) besiyerinde, mantar suşları ise RPMI 1640 Broth (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Germany) besiyerinde üretildi. Standart inokulum elde etmek için bakteri ve mantarların bulanıklığı Mcfarland no. 0.5 eşeline göre hazırlandı. Sulandırılmaların hepsi distile su ile yapıldı. Ekstrelerin son derişimleri 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 µg/mL olacak biçimde seyreltildi.

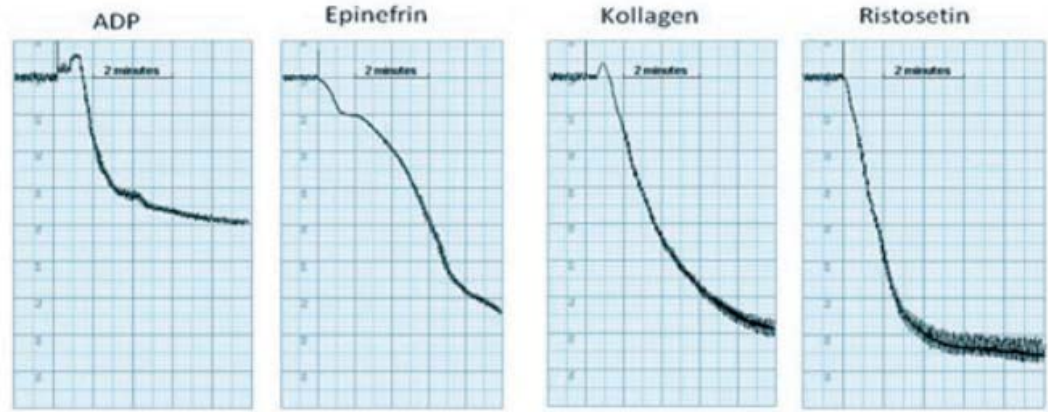
Flukonazole mantarlar için Ampicillin, Ciprofloxacın, Amikacin, Ampicillin, Tigecycline ve Vankomisin bakteriler için standart ilaç olarak kullanıldı. Bakteri ve mantarların (10^6 CFUs/mL) standard inokulumları steril plastik halka uçlu öze ile (0.01 mL) agar plaklarına ekim yapıldı. Ekim yapılan tüm plaklar 35°C'de etüvde bakteriler için 16-20 saat, mantarlar için 48 saat bekletildikten sonra değerlendirildi. Bakteri ve mantarların çoğalmasını önleyen en düşük derişimleri minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlendi (99,100).

3.4.8. Antitrombotik aktivite tayini

Ekstrelerin antitrombotik aktivitelerini belirlemek için Chrono-Log Agregometre cihazı ve optik agregometri tekniği kullanıldı. Optik agregometri yönteminin temeli şudur; agonistler (ADP, kollajen, epinefrin, ristosetin vb.) bir manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılan sitratla antikoagüle edilmiş PRP örneğine eklenince trombositlerde agregasyon indüklenir. Neticede, bulanık bir süspansiyon olan PRP, agregatlar oluştuğunda bulanıklığını yitirir ve ışık geçirgenliği artar (101). 47 yaşında sağlıklı erkek bireyden 8 saat açlık sonrası alınan EDTA'lı kan tüplere alınarak 1000

devir/dak da 10 dakika santrifüj edilerek PPP (plateletçe fakir plasma) ve 3500 devir/dak da 10 dakika santrifüj edilerek PRP (plateletçe zengin plasma)'ler elde edildi ve tüm ölçümlerde bu plazmalardan 750 µL ölçüm kuvvetlerine eklendi. Ekstreler ise kuvvet içerisinde değişen konsantrasyonlarda 50µL eklenerek agonist eklenmeden hemen önce 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve örnekler ölçüm almaya hazır hale getirildi.

Agregometre, kuvvet içerisinde ışık geçişindeki değişimi kaydeder. Sistem otokalibrasyon işlemi ile PPP ile PRP arasındaki transmisyon farkını 100 birim algılayacak şekilde kendini kalibre eder. Çalışmamızda, kontrol olarak herhangi bir antitrombotik etkili bileşenin ilave edilmediği tüpte kuvvetli bir agonist olan kollagen ile agregasyon indüklendi ve totalde 5 dak agregasyon başladıktan sonra ise 3 dak izlenerek transmisyon üzerinden nümerik bir kontrol agregasyon düzeyi belirlendi. Daha sonra aynı işlem ekstrelerin ilave edildiği tüplerle tekrarlanarak agregasyon inhibisyon düzeyleri kontrole kıyasla bağlı olarak hesap edildi. Her bir ekstre için ölçümler iki kez tekrarlanarak aritmetik ortalamaları alındı.



Şekil 3.4.8. Dört farklı agonistin optik agregometride oluşturdukları standart yanıtlar(102).

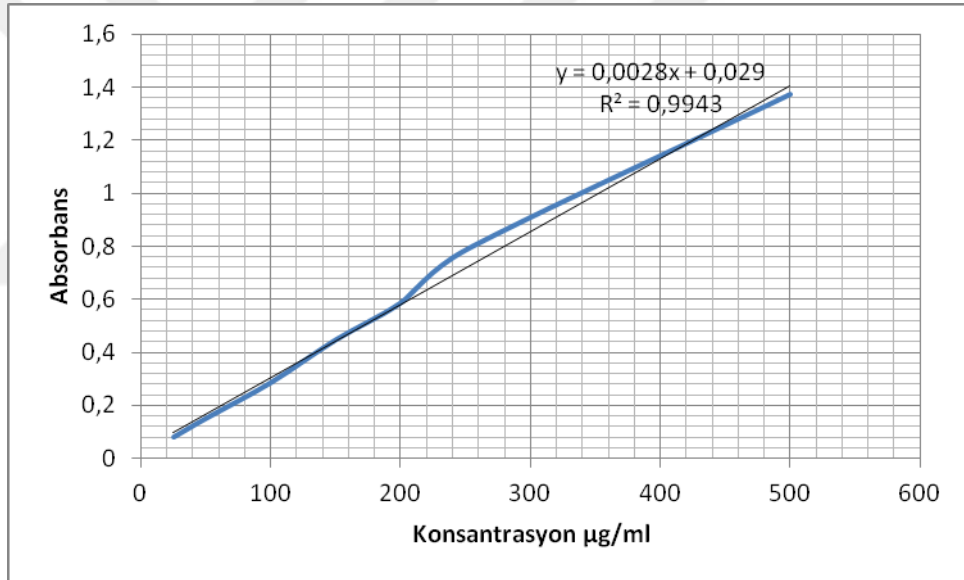
4.BULGULAR

4.1. Total Fenolik Madde İçeriği

Folin reaktifi bünyesindeki fosfomolibdik asit/fosfotungstik asit kompleksleri bazik pH değerlerinde elektron transferi yoluyla indirgenmektedir ve 765 nm de absorbands veren kromojenler oluşturur. Kantitatif tayinler ve hesaplamalar oluşan bu kromojenlerin spektrofotometrik tayini üzerinden gerçekleştirilir.



Gallik asit standart çözeltileri ($\mu\text{g/mL}$): 25;50;100;150;200;250;500 olarak hazırlanmıştır.



Grafik 4.1. Gallik asit standart grafiği

Gallik asitin artan konsantrasyonuna karşı okunan absorbands değerleri kullanılarak gallik asit standart grafiği çizildi. $R^2 = 0,9943$ olarak elde edildi.

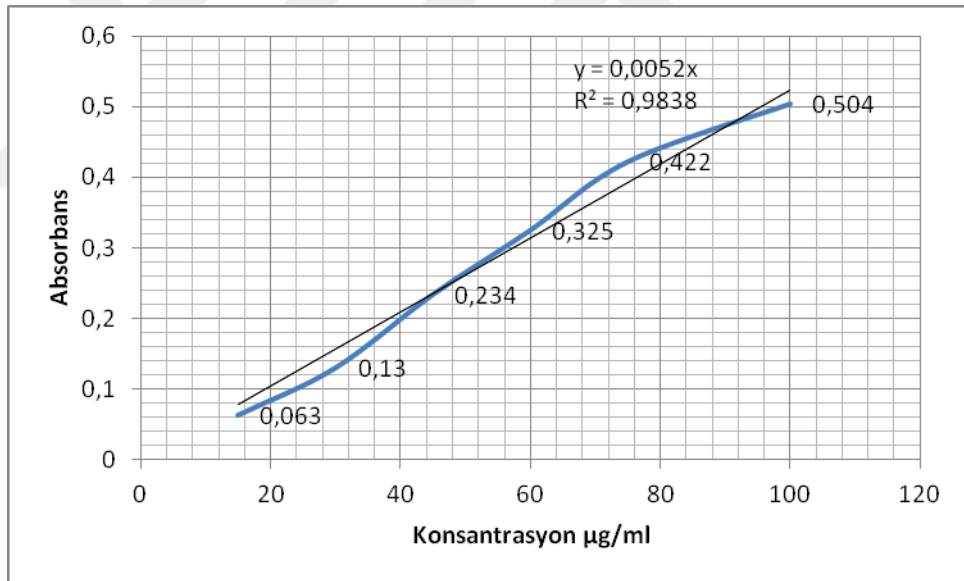
$\text{Abs} = 0,0028 \times C + 0,029$ denklemi kullanılarak ekstrelerin gallik asit eşdeğeri cinsinden total fenolik madde içeriği hesaplandı (μg gallik asit / mg ekstre).

Tablo 4.1. Total fenolik madde içeriği

	Yaprak Ekstresi(mg)	Meyve Ekstresi(mg)	Çekirdek Ekstresi(mg)
Total Fenolik Madde (μg)	280.19	270.99	317.24

4.2. Total Flavonoid Madde İçeriği

Ekstrelerin total flavonoid madde bileşimi quercetin eşdeğeri flavanoid miktarı olarak hesap edildi. Quercetin'in 100 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok çözeltisi kullanılarak 15-30-45-60-75-100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlara sahip seyreltik çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler kullanılarak standart grafiği çizildi.



Grafik 4.2. Quercetin standart grafiği

Quercetin'in artan konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak quercetin standart grafiği çizildi. $R^2 = 0,9838$ olarak elde edildi.

Abs = 0,0052 x C denklemi kullanılarak ekstrelerin quercetin eşdeğeri cinsinden total fenolik madde içeriği hesaplandı (μg quercetin / mg ekstre).

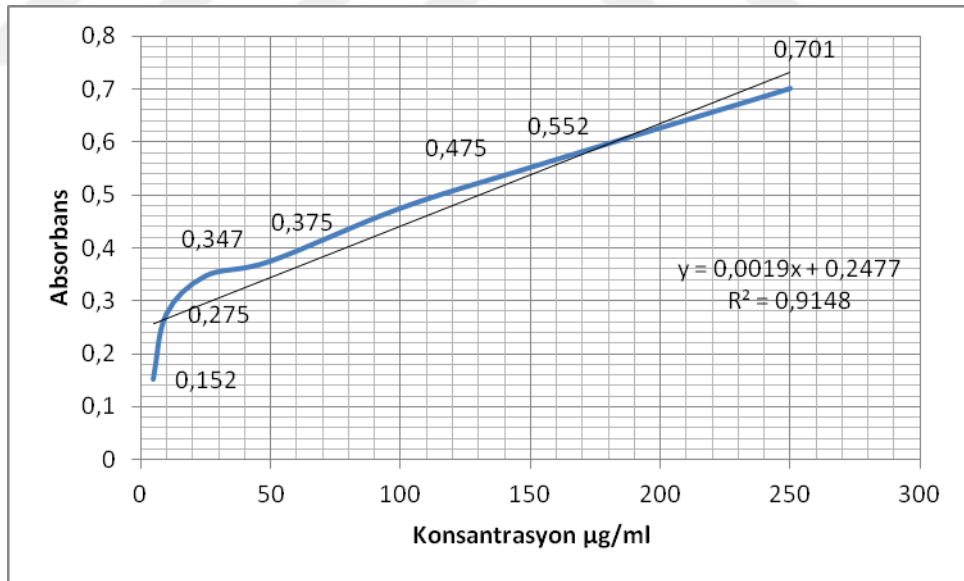
Tablo 4.2. Total flavanoid madde içeriği

	Yaprak Ekstresi(mg)	Meyve Ekstresi(mg)	Çekirdek Ekstresi(mg)
Total Flavanoid Madde (μg)	4.24	4.43	0.86

4.3. İndirgeyici Potansiyel Düzeyi

Zeytin yaprak, meyve ve çekirdek ekstralarının Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme potansiyeli Oyaizu (1986) yöntemi uyarınca belirlendi. Standart olarak kullanılan BHT'in farklı konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik standart çözeltileri ve örneklerin indirgeyici potansiyeli deney sonunda 700 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlendi. Bu deneyde indirgeyici potansiyel ile ölçülen absorbans değerleri arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır.

BHT Standart konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 5-10-25-50-100-150



Grafik 4.3. BHT standart grafiği

BHT'nin artan konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak BHT standart grafiği çizildi. $R^2 = 0,9148$ olarak elde edildi.

Abs = 0,0019 x C + 0,2477 denklemi kullanılarak ekstrelerin indirgeyici potansiyelleri BHT eşdeğeri cinsinden hesaplandı (μg BHT / mg ekstre).

Tablo 4.3. İndirgeyici potansiyel düzeyleri

	Yaprak Ekstresi(mg)	Meyve Ekstresi(mg)	Çekirdek Ekstresi(mg)
BHT Eşdeğeri (μg)	257.6	77.25	21.24

4.4. Metal Şelatlayıcı Aktivite

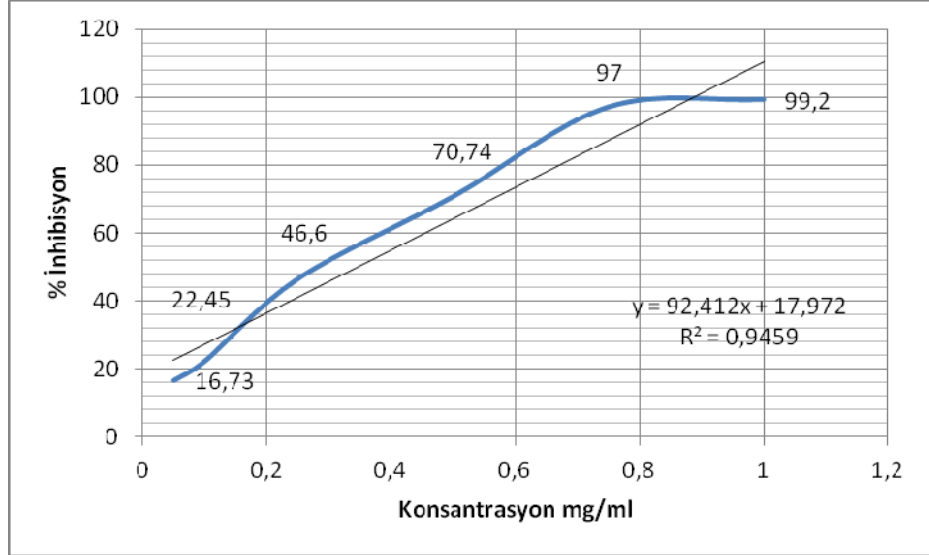
Dinis ve arkadaşları (1994), (96) yöntemi uyarınca gerçekleştirilen metal şelatlayıcı aktivite tayininde standart olarak değişen konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik EDTA çözeltileri kullanıldı. Standart ve örnek çözeltilerinin kullanıldığı deney sonunda Fe^{+2} -ferrozin kompleksi oluşumu spektrofotometrik olarak 562 nm'de absorban ölçümü ile belirlendi. Standart grafiği yardımıyla örneklerin kompleks oluşumunu ne ölçüde inhibe edebildiği hesaplandı. % inhibisyon değeri aynı zamanda metal şelatlayıcı aktiviteye eşdeğer kabul edildi.

$$\text{Metal Şelatlayıcı Akt.} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

A_0 : Kör absorbanı

A_1 : Numunenin absorbanı

EDTA Standart konsantrasyonları (mg/mL): 0,1-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25



Grafik 4.4. Metal şelatlayıcı aktivite standart grafiği

Standart grafiği çizildiğinde elde edilen standart eğrisinin R^2 değeri 0,9459 olarak eğim çizgisinin denklemini ise $y = 92,412x + 17,972$ olarak belirlendi. Denklem yardımıyla %50 inhibisyon yapan IC_{50} değerleri her bir ekstre için EDTA ekivalan değeri olarak hesap edildi.

Tablo 4.4. Metal şelatlayıcı aktivite düzeyleri

	EDTA (mg/mL)	Yaprak Ekstresi (mg/mL)	Meyve Ekstresi (mg/mL)	Çekirdek Ekstresi (mg/mL)
IC_{50} Değeri	0,346	13.33	24.76	17.37

4.5.Hidrojen Peroksit Süpürücü Aktivite

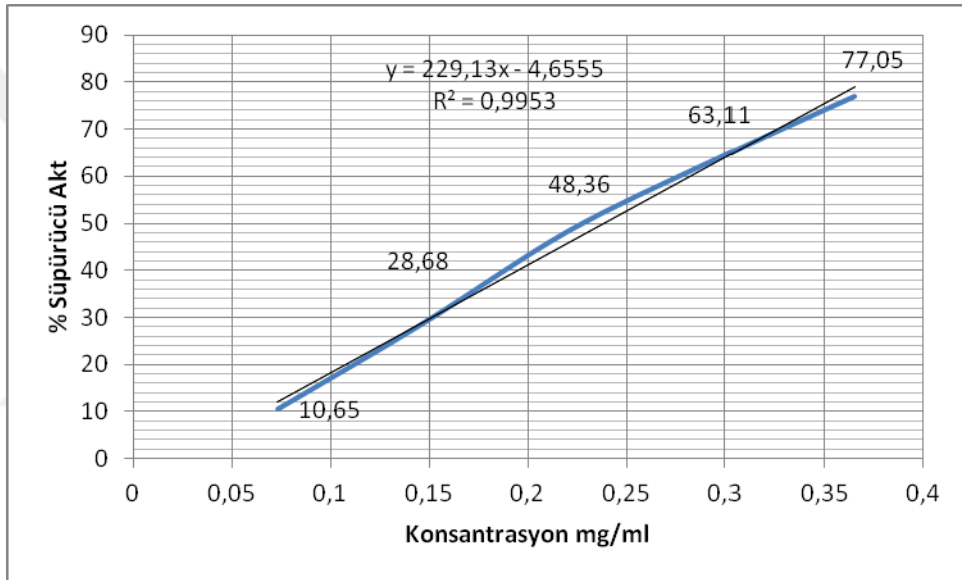
Hidrojen peroksit süpürücü aktivite Zhang ve arkadaşları (2000), yöntemi uyarınca belirlendi (97). Standart olarak (aynı zamanda pozitif kontrol olarak) askorbik asit kullanıldı. Titrimetrik bir yöntem olan bu deneyde tüketilen titrant hacmi üzerinden H₂O₂ süpürücü aktivite hesap edildi,

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ Süpürücü Akt} = ((V_0 - V_1)/V_0) \times 100$$

V₀: Kontrol titrant hacmi

V₁: Numune ve standart titrant hacmi

Standart Konsantrasyonları (mg/mL): 0,073-0,146-0,220-0,292-0,365



Grafik 4.5. Hidrojen peroksit süpürücü aktivite standart grafiği

Tablo 4.5. Hidrojen peroksit süpürücü aktivite düzeyleri

	Askorbik asit (mg/mL)	Yaprak Ekstresi (mg/mL)	Meyve Ekstresi (mg/mL)	Çekirdek Ekstresi (mg/mL)
IC ₅₀ Değeri	0.238	4.27	36.39	30.50

4.6. DPPH Radikali Söndürme Aktivitesi

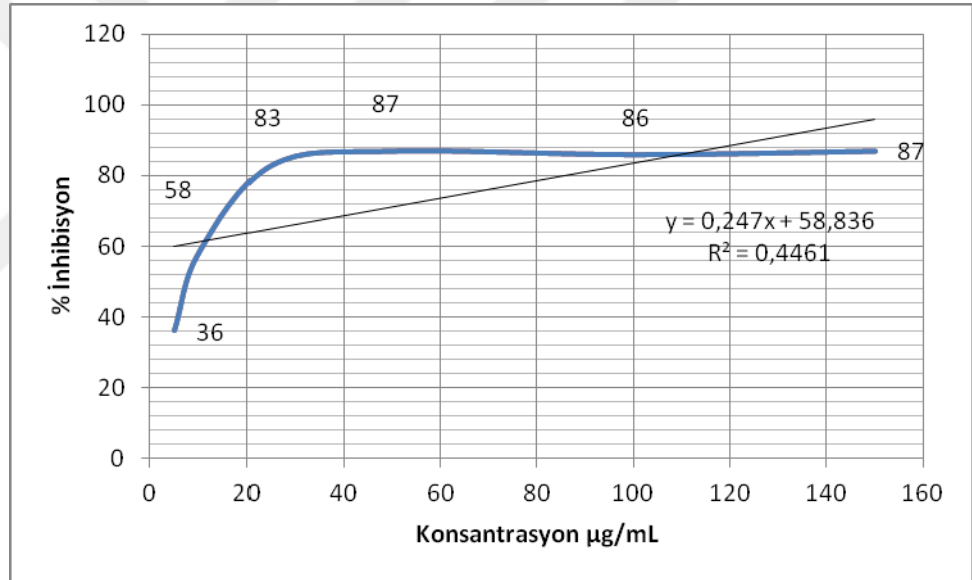
DPPH radikali söndürme aktivitesi tayini Blois (1958), yöntemi uyarınca gerçekleştirildi (98). Standart olarak güçlü bir radikal süpürücü antioksidan olan BHT'nin hazırlanan seyreltik çözeltileri kullanıldı. Standart ve örneklerin 517 nm'de absorbans ölçümü ile elde edilen değerler aşağıdaki formül kullanılarak % İnhibisyon değerlerine dönüştürüldü;

$$\% \text{ Inh} = ((A_k - A_1)/A_k) \times 100$$

A_k : Kontrol absorbans değeri

A_1 : Örneğin absorbans değeri

Standart konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$): 5-10-25-50-100-150



Grafik 4.6. DPPH söndürme aktivitesi standart grafiği

Standart grafiğinden de anlaşılacağı üzere reaksiyon kinetiği mix bir kinetik göstermektedir. İlk üç konsantrasyon değerinden sonra artan konsantrasyon inhibisyon üzerinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır. Yani reaksiyon hızı ve verimi bu noktalarda konsantrasyondan bağımsızdır. Bu nedenle standart grafiğinin lineer değişim gösteren düşük konsantrasyonlardaki değerleri ile % Inh değişimi kullanılarak elde

edilen standart eğrisinin R^2 değeri 0,9415 ve denklemi $y=2,1923x + 29,769$ şeklindedir. Hesaplamalarda bu değerler kullanıldı.

Tablo 4.6. DPPH Süpürücü aktivite düzeyleri

	BHT ($\mu\text{g/mL}$)	Yaprak Ekstresi (mg/mL)	Meyve Ekstresi (mg/mL)	Çekirdek Ekstresi (mg/mL)
IC ₅₀ Değeri	9.22	3.80	9.47	5.25

4.7. Antimikrobiyal Aktivite

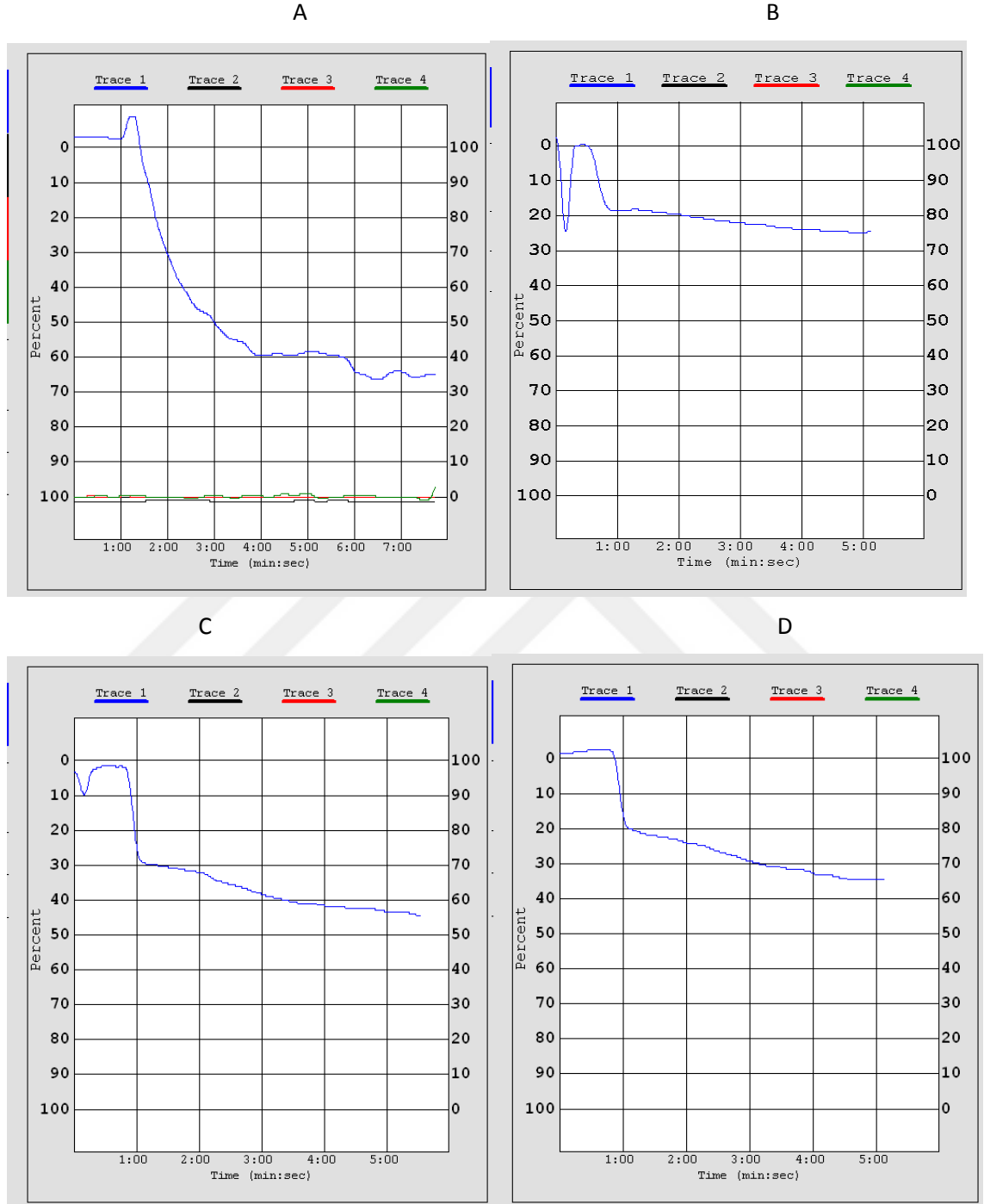
Zeytin yaprak, meyve ve çekirdek ekstralarının antimikrobiyal aktivite tayinleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından tavsiye edilen agar dilüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (99,100). Bakteri ve mantarların çoğalmasını önleyen en düşük etkili derişimler minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak belirlendi. Her bileşik için minimal inhibitör konsantrasyonları standart bakteri ve mantar suşlarına karşı test edildi. Flukonazole mantarlar için Ampicillin, Ciprofloxacın, Amikacin, Ampicillin, Tigecycline ve Vankomisin bakteriler için standart ilaç olarak kullanıldı.

Tablo 4.7. Antimikrobiyal aktivite sonuçları ($\mu\text{g/mL}$)

	Test Bakteri ve Mantarları	Staph	Enterokok	E.Coli	Pseudo	C.albicans	C. glab	Acineto	Klebs	MRSA
	Meyve Ekstresi	400	200	200	400	200	200	400	400	400
	Çekirdek Ekstresi	800	400	400	800	400	400	800	400	800
	Yaprak Ekstresi	200	100	100	200	200	200	200	200	200
Kontrol		Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var
Kontrol		Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var
Kontrol		Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var	Üreme var
Referans1	Ampicillin	1.56	1.56	3.12					1.56	
Referans2	Amikacin				1.56			3.12	1.56	
Referans3	Ciprofloksacin			1.56					1.56	
Referans4	Flucanazole					6.25	3.12			
Referans5	Vankomicin									3.12
Referans6	Tigecycline							1.56		
Testte kullanılan mikroorganizmalar ve kodları: Candida glabrata ATCC 90030, Acinetobacter baumannii ATCC 19606, Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, Staphylococcus aureus MRSA ATCC 43300, Staphylococcus aureus ATCC 29213, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Escherichia coli ATCC 25922, Candida albicans ATCC 14053										

4.8. Antitrombotik Aktivite

Ekstrelerin antitrombotik aktivitelerini belirlemek için Chrono-Log Agregometre cihazı ve optik agregometri tekniği kullanıldı (101).



Şekil 4.8. Optik Agregometri ölçüm diagramları. A:Kontrol; B:Yaprak ekstresi; C:Meyve ekstresi; D:Çekirdeksk ekstresi

Bu yöntemde kör olarak aynı kan örneğinin trombositçe fakir plasması kullanılır. Kontrol olarak sadece agonist (kollagen+ADP) ile uyarılan ve herhangi bir antitrombotik ajan içermeyen PRP'nin agregasyon yüzdesi baz alınır. Örneklerin antitrombotik etkinliği ise aşağıdaki formül uyarınca hesaplanır.

$$\text{Antitrombotik aktivite} = ((\%T_k - \%T_1)/\%T_k) \times 100$$

T_k: Kontrol %T; T₁:Örnek %T

Tablo 4.8. Antitrombotik aktivite düzeyleri

	Kontrol	Yaprak Ekstresi (1mg/mL)	Meyve Ekstresi (1mg/mL)	Çekirdek Ekstresi (1mg/mL)
Bağlı Antitrombotik Aktivite	%100	%23.22	%5.01	%7.36

Tablo 4.8.1. Antioksidan parametrelerin topluca gösterimi.

Antioksidan Parametreler			
	Yaprak Ekstresi	Meyve Ekstresi	Çekirdek Ekstresi
Total Fenolik Madde İçeriği ($\mu\text{g GA/mg}$ ekstre)	280.19	270.99	317.24
Total Flavanoid Madde İçeriği ($\mu\text{g Querc/mg}$ ekstre)	4.24	4.43	0.86
İndirgeyici Potansiyel ($\mu\text{g BHT/mg}$ ekstre)	257.60	77.25	21.24
Metal Şelatlayıcı Aktivite (IC_{50})	13.33	24.76	17.37
H_2O_2 Süpürücü Aktivite (IC_{50})	4.27	36.39	30.50
DPPH Süpürücü Aktivite (IC_{50})	3.80	9.47	5.25

5.TARTIŞMA

Zeytin ağacının tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Bugün batı dilleri ailesindeki dillerde farklı telafuzları olan “oil” terimi Eski Yunan terminolojisinde “eleia” teriminden türemiştir ve zeytin ağacı anlamına gelmektedir. Latincedeki karşılığı da “Olea europaea” dır. İnsanoğlu ilk olarak kendiliğinden yetişen yabani zeytin ağacını (delice veya olaester olarak bilinir) keşfetmiş, daha sonra bu yabani ağacı ıslah etmiş ve günümüzde aşilayarak fidandan yetiştirilen bir kültür bitkisi haline dönüştürmüştür. Zeytin ağacının meyve vermesi ortalama 5-6 yıl sürmektedir. Meyvesi, çekirdeği ve yaprağı değerlendirilebilen ve 300-400 yıl yaşayabilen oldukça uzun ömürlü bir bitkidir (102). Ülkemizde yoğun bir biçimde Ege, Akdeniz ve Marmara Bölgesinde yetiştirilen zeytin ağaçları yaz-kış yapraklıdır. Ortalama 20-30 ay ağaç üzerinde kalan yaprakların bir kısmı dökülürken bir kısmı henüz çıktığı için ağaç her mevsim yeşil kalmaktadır.

Zeytin ağaçlarının çok uzun ömürlü olması, diğer birçok bitki türünü kolayca etkileyen pek çok hastalığa karşı dirençli oluşu, meyve ve yapraklarının beslenme ve hastalıklardan korunma bakımından son derece faydalı olabileceğinin bir işareti olarak kabul edilmiştir. Böylece zeytin meyvesi, meyvesinden elde edilen yağı, çekirdeği ve yaprağı asırlardır halk tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve günümüzde de hala tamamlayıcı tıp alanında kullanılmaya devam etmektedir (103). Zeytin ağacının oldukça uzun ömürlü olmasından ve hastalıklara karşı gösterdiği güçlü dirençten ağacın tüm bileşenlerinde değişen oranlarda bulunan “oleuropein” adlı sekeiridoid sorumlu tutulsa da zeytin ağacının oleuropein dışında çok sayıda biyoaktif molekülü bünyesinde barındırdığı rapor edilmiştir (104,105). Bu molekül gurupları başlıca; tokoferoller, hidrokarbonlar, glikozidler, steroller, fenolik bileşikler ve lezzet bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu bileşikler tad ve aroma veriyor olmanın ötesinde çok önemli tıbbi etkilere sahiptir. Literatürde bu konuya ilişkin yapılmış olan çalışmalarda tıbbi etkilerin; antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antikanserojen ve antiaging etkiler olduğu ortaya konulmuştur (106,107).

Temel kahvaltılık besin öğelerinden biri olan zeytin meyvesinin rengi, büyüklüğü ve tadı meyvenin olgunluk derecesi, çeşidi ve yetiştiği bölgenin iklim ve toprak yapısına bağlı olarak değişmekle birlikte kimyasal bileşimi büyük oranda benzerdir. Bir zeytin meyvesinin ortalama %50-60'ını su, %18-25'ini yağ, %18'ini

şeker oluşturup bunlar major bileşenlerdir. Geriye kalan kısmı minör bileşenleri oluşturup bunlar içerisinde major bileşenlerden olan yağlar (özellikle oleik asit) ile birlikte tıbbi etkilerden sorumlu olan polifenoller, sekeiridoitler, glikozidler ve tokoferoller de yer almaktadır (108).

Yapmış olduğumuz çalışmada, zeytin meyvesinin etli kısımlarından, yapraklarından ve çekirdeğinden elde ettiğimiz ekstrelerin antioksidan, antimikrobiyal ve antitrombotik etkinliklerini araştırdık. Araştırma bulgularımıza göre, nonpolar bileşenleri uzaklaştırıldıktan sonra sadece hidrofilik karakterli biyomolekülleri içeren zeytin meyve ekstrelerinde 1,00 mg ekstrenin eşdeğer gallik asit düzeyi 270,99 µg olarak belirlendi. Tespit edilen total fenolik madde içeriği bünyesinde fenolik asitler, fenolik alkoller, flavanoidler ve sekeiridoitler bulunmaktadır. Vinha ve arkadaşları (109) tarafından yapılan bir çalışmada Portekiz zeytini etli kısım polar fraksiyon ekstrelerinde mg ekstre eşdeğeri total fenolik asit düzeyleri 300 µg gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur. Irmak ve arkadaşları (110) ise ülkemizde yetişen bazı zeytin çeşitleri ile yaptıkları bir çalışmada gram ham zeytin etli kısımları başına kafeik asit eşdeğeri total fenolik madde içeriğini Uslu, Gemlik ve Ayvalık çeşitlerinde sırasıyla 421, 275 ve 251 µg olarak tespit etmişlerdir. Bu değerler ham zeytin değerlerine ait olup sofralık zeytinlerin sofraya gelene kadar kullanılan işleme yöntem ve tekniklerine bağlı olarak fenolik madde miktarlarında belirli oranlarda azalma olmaktadır. Benzer şekilde aynı kayıplar zeytin endüstrisinin en önemli ürünü olan zeytinyağında da kullanılan yöntem ve tekniklere bağlı olarak gerçekleşmektedir (111).

Bulgularımıza göre, total fenolik madde içeriği bakımından en yüksek içeriğe sahip ekstre 317,24 µg ile zeytin çekirdek ekstresidir. Yaprak ekstrelerinde ise düzey 280,19 µg olarak belirlendi. Ekstrelerde ölçtüğümüz bir diğer parametre de quercetin eşdeğeri total flavanoid madde miktarıdır. Total fenolik madde miktarı yaprak ve çekirdeğe göre daha düşük bulunan meyve ekstresinin total flavanoid madde miktarı 4,43 µg düzeyi ile en yüksek bulunmuştur. Bu parametre yaprak ekstresinde 4,24 µg, çekirdek ekstresinde 0,86 µg olarak belirlenmiştir. Total fenolik madde içeriğinin flavanoid yüzde bileşimine bakacak olursak yaprak ekstresi için % 1,51, meyve ekstresi için % 1,63 iken çekirdek ekstresi için diğer iki ekstrede yaklaşık altı kat daha düşük olan % 0,27 olarak belirlenmiştir. Bu değerler bize zeytin çekirdeği iç kısmında bulunan ve zeytin çekirdeği ekstrelerindeki biyoaktif bileşenleri büyük oranda bünyesinde

barındıran jelimsi yağlı komponentin fenolik madde içeriği bakımından zengin olduğunu ancak total fenolikler içerisinde flavanoidlerin yüzde bileşimi bakımından yaprak ve meyveye göre düşük düzeyde bulunduğunu göstermektedir. Çetinkaya ve Kulak (112) Kilis yöresi zeytinlerinde yapmış oldukları çalışmada total fenolik madde içeriği ve bu içeriğin flavanoid bileşimi arasındaki oranların zeytinin gelişme dönemine bağlı olarak farklılıklar gösterdiğini rapor etmişlerdir. Birçok meyve türünde olduğu gibi zeytinde de gelişme dönemlerine bağlı olarak biyoaktif bileşen içeriği değişim göstermektedir (113).

Fenolik bileşikler bitkilere özgü kimyasal türler olup sebze ve meyvelerin insan sağlığı ve beslenmesindeki vazgeçilemez rollerinde büyük pay sahibidirler. Bu nedenle son yıllarda birçok bitkisel materyalin bu bileşenleri ne ölçüde içerdiğini araştıran çalışmalar yapılmakta ve sonuçları yayınlanmaktadır. Zeytin de bu bağlamda önemli türlerden biridir ve bilinen en sağlıklı besin öğelerinden bir tanesi sayılmasında fenolik bileşiklerce zengin bir içeriğe sahip olması dikkate alınan faktörlerden biri olmuştur.

Serbest radikallerin fizyolojik konsantrasyonların üzerinde oluşmasıyla ortaya çıkan oksidatif stresin canlı sistemler üzerindeki zararlı etkileri artık tüm detaylarıyla açık bir biçimde bilinmektedir. Organizmanın sahip olduğu enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri normal koşullarda bu radikallerin konsantrasyonlarını sınırlamakta ve oksidatif hasara karşı organizmayı korumaktadır. Ancak eksojen ya da endojen kaynaklı bazı faktörler kimi zaman aşırı radikal üretimini tetikleyerek, kimi zaman antioksidan sistemin baskılanmasına yol açarak bazen da her iki duruma aynı anda neden olarak var olan biyokimyasal oksidan/antioksidan homeostazın oksidanlar lehine bozulmasına ve oksidatif stres oluşmasına sebep olurlar. İşte böyle zamanlarda eksojen antioksidanların organizmada var olan ancak yetersiz kalan antioksidan sistemi desteklemeleri oldukça önem kazanmaktadır. Bitkisel besin öğelerinin ya da tıbbi bitkilerin antioksidan potansiyelleri bu yüzden son derece önemlidir. Bir biyomolekül antioksidan etkinliğini farklı biçimlerde ortaya koyabilir; i) ortamda var olan radikale karşı süpürücü etki gösterebilir, ii) radikalın oluşumunu inhibe edebilir, iii) antioksidan enzimlerin sentezini indükleyebilir veya aktivitesini artırabilir, iv) oluşan oksidatif hasarı onarıcı etki gösterebilir (114).

Çalışmamızda, ekstrelerin radikal süpürücü etkinliklerini belirlemede “DPPH radikali söndürme” tekniğini kullandık. DPPH kararlı bir serbest radikaldir ve radikal

süpürücü etkinliği belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntem ilk olarak 1958 yılında Blois ve arkadaşları (59) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde radikal yapıdaki DPPH· molekülü ekstre bünyesindeki antioksidan karakterli hidrojen donörü bileşikler tarafından indirgenerek radikal karakterde olmayan DPPH-H molekülüne dönüştürüldü. Ekstrelerin radikal süpürücü aktivitesi 517 nm'deki absorbans azalması izlenerek ölçüldü. Elde ettiğimiz bulgular göstermektedir ki; DPPH radikali süpürücü aktivite için hesap edilen IC₅₀ değerleri BHT, yaprak, meyve ve çekirdek ekstraları için sırasıyla 9,22 µg/mL, 3,8 mg/mL, 9,47 mg/mL, 5,25 mg/mL'dir. Her bir ekstre için 1/IC₅₀ olarak tanımlanan antiradikal aktivite değerleri ise yaprak, meyve ve çekirdek ekstraları için sırasıyla 0,26; 0,11 ve 0,19'dur. Martinez ve arkadaşları zeytin meyve ekstralarının DPPH radikali karşısında kuvvetli radikal süpürücü aktiviteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir(115). Stankovich ve arkadaşları (2017), (116) Fransa ve Sırbistan zeytin yaprak ekstralarında DPPH yöntemi kullanarak antioksidan aktivite tayini yapmışlar ve IC₅₀ değerlerini sırasıyla 113,30 ve 94,39 µg/mL bulmuşlardır. Orak ve arkadaşları (2019), (117) ise Çekişte ve Uslu türü zeytin yaprak ekstralarında DPPH yöntemi IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0,63 mg/mL ve 0,65 mg/mL olarak belirlemişlerdir. Zeytin çekirdek ekstralarının antioksidan etkinliğinden kuvvetle muhtemel çekirdeğin içinde hapsolmuş olan jelimsi ve yağlı karakterdeki sıvı kısım sorumludur. Zeytin çekirdeğinde bu sıvı çekirdek ağırlığının %2'si kadardır (118). Servili ve arkadaşları farklı zeytin organlarında yaptıkları analizlerde C₃₁H₄₂O₁₇ molekül yapısına sahip nuezhenide adlı biyoaktif molekülün sadece çekirdek ekstraktında bulunduğunu rapor etmişlerdir (119). Nuezhenide üzerinde çalışmalar hala devam etmektedir. Bizim sonuçlarımıza göre DPPH radikali süpürücü aktivite düzeyi en yüksek oranda çekirdek ekstrasında gözlemlendi. Bu yüksek aktiviteden diğer fraksiyonlarda bulunmayıp çekirdek ekstrasına özgü olan nuezhenide molekülü sorumlu olabilir. Ryan ve arkadaşları (120) zeytin çekirdeği ekstraktında tirozol, hidroksitirozol, olerupein, verbaskozid, nuezhenide ve 3,4-DHPEA-DEDA tespit etmiş ve biyoaktiviteden bu bileşenlerin sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir.

Fe⁺² gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton Reaksiyonu uyarınca ortamda bulunan hidrojen peroksit kullanılarak en reaktif radikal olan hidroksil radikali oluşumu gerçekleşir.



Hidroksil radikali diğer oksijen radikallerine oranla yük/molekül ağırlığı bakımından daha yüksek bir orana sahiptir ve yarı ömrü çok kısadır. Tüm biyomoleküllerle çok kısa bir süre içerisinde etkileşime girebilir. Nükleik asitler, enzimler, karbonhidratlar ve yağ moleküllerine radikalik saldırıda bulunabilir. Özellikle membran lipidlerinde radikalik zincir reaksiyonların oluşmasına neden olur. Bu zincir reaksiyonlar sırasında farklı lipid yapıların farklı bölgelerden radikalik saldırıya maruz kalması sonucu farklı moleküler yapı ve büyüklüğe sahip lipid peroksitleri oluşmaktadır. İndirgen potansiyele sahip moleküller söz konusu lipid peroksit moleküllerini indirgeyerek zincir reaksiyon dizisini sonlandırabilirler (121). Bu bağlamda bitki ekstralarında indirgeyici potansiyel düzeyi antioksidan kapasitenin de bir göstergesidir.

Ekstrelerimizin Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme potansiyeli test edildi. Bulgularımıza göre 1 mg/mL ekstrenin BHT eşdeğeri cinsinden düzeyi yaprak, meyve ve çekirdek için sırasıyla 257,6; 77,25 ve 21,24 $\mu g /mL$ düzeylerindedir. En yüksek indirgeyici potansiyel yaprak ekstresinde elde edilmiştir. Ammar ve arkadaşları (122) zeytin yapraklarının metanol ve etanol ekstralarında antioksidan parametreleri test etmişler ve metanol ekstralarını en yüksek fenolik içeriğe sahip bulurken etanol ekstralarında indirgeyici potansiyelin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Geçiş metallerinin biyolojik ortamlarda fizyolojik sınırların üzerindeki hatta bazı durumlarda fizyolojik düzeylerdeki mevcudiyeti dahi hemen her zaman serbest radikal üretimini ve oksidatif stresi artırıcı yönde etki eder. Özellikle demir atomu +2 ve +3 olmak üzere iki farklı yükseltgenme basamağında bulunur ve ferik formu olan Fe^{+3} biyokimyasal olaylarda olabildiğince inaktif ancak ferröz formu olan Fe^{+2} son derece aktiftir. Ferröz demir çok önemli bir pro-oksidan iyondur. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları aracılığı ile hidroksil radikali oluşumuna neden olur. Metal şelatörleri, ortamdaki metal iyonları ile kompleksler oluşturarak onları bağlar ve aktivitelerine son verirler. Bu etkileri nedeniyle metal şelatlayıcı bileşikler indirekt etkili antioksidanlar olarak kabul edilirler. Bununla birlikte şelatlayıcı ajanlar organizmada son derece toksik etkiler gösteren ve özellikle beyin, karaciğer ve böbrekler gibi hayati organlarda birikme potansiyeli yüksek olan ağır metallerin de bağlanarak vücuttan atılmasında önemli rol oynarlar.

Uygun moleküler geometriye sahip biçimde bünyesinde –OH, –COOH, –SH, –C=O gibi etkileşime açık fonksiyonel guruplardan en az iki tane içeren bileşikler metallerle şelat oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (123). Besinler ve tıbbi önemi olan bitkisel preparatlarda antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerden biri de metal şelatlayıcı aktivitedir. Çalışma bulgularımıza göre en yüksek metal şelatlayıcı aktivite 13,33 mg/mL olan IC₅₀ değeri ile yaprak ekstresinde görüldü, onu 17,37 mg/mL ile çekirdek ekstresi ve 24,76 mg/mL ile meyve ekstresi izledi. Wang ve arkadaşları zeytin yaprak ekstreleri verilen farelerde beyinde kadmiyum toksisitesine bağlı nöron hasarının önemli ölçüde önlendiğini ve antioksidan kapasitenin arttığını rapor etmişlerdir (124). Fabiani ve arkadaşları (125) zeytin fenolik bileşenlerinin insan mononükleer kan hücrelerini koruduğunu, oksidatif hasarı azalttığını ve bu koruyuculuğu sağlayan özelliklerinden bir tanesinin de metal şelatlayıcı yeteneklerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarında oluşan hidroksil radikalının kaynağı ortamda bulunan hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksitin memeli organizmalardaki sitotoksik etkisinin en kesin göstergelerinden bir tanesi genetik bir kusur olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliğinde yetersiz üretilen NADPH nedeniyle gultasyon rejenerasyonunun sağlanamaması ve bu nedenle glutasyon peroksidaz enziminin hidrojen peroksiti yeterince detoksifiye edememesi sonucu eritrositlerin ömrünün 120 günden 60-70 güne düşmesidir. Eritrositler yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonu nedeniyle ortalama ömürlerinin neredeyse yarısı kadar sürede lizise uğramaktadırlar. Bunun primer nedeni eritrosit membran lipidlerinde oluşan oksidasyon sonucu membran bütünlüğünün bozulmasıdır (126). Hidrojen peroksit benzer peroksidatif etkileri eritrositlerle birlikte diğer tüm hücrelerde de göstermektedir. Bu nedenle hücrel antioksidan savunma sisteminin önemli enzimlerinden olan katalaz ve glutasyon peroksidaz dışında nonenzimatik antioksidan moleküllerin de hidrojen peroksite karşı gösterdiği süpürücü aktivite son derece önemlidir. Ekstrelerimizin hidrojen peroksiti süpürücü aktivitelerine baktığımızda yaprak ekstresinin 4,27 mg/mL IC₅₀ değeri ile en güçlü aktiviteye sahip olduğu meyve ve çekirdek ekstrelerinin sırasıyla 36,39 mg/mL ve 30,50 mg/mL değerlerine sahip olduklarını belirledik. Lins ve arkadaşları (2018), (127) *in vitro* olarak eritrositler üzerinde oluşturulan oksidatif strese karşı zeytin yaprak ekstrelerinin koruyucu etkinlik gösterdiğini, eritrositlerin lizisini engellediğini ve eritrosit membran lipidlerinin oksidasyonu ile oluşan MDA

düzeylerinin azalmasını sağladığını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar zeytin yaprak ekstralarının hemoglobin bünyesindeki Fe⁺²'nin Fe⁺³'e yükseltgenerek hemoglobinin oksijen bağlama yeteneğinden yoksun formu olan methemoglobine dönüşmesini engellediğini de tespit etmişlerdir.

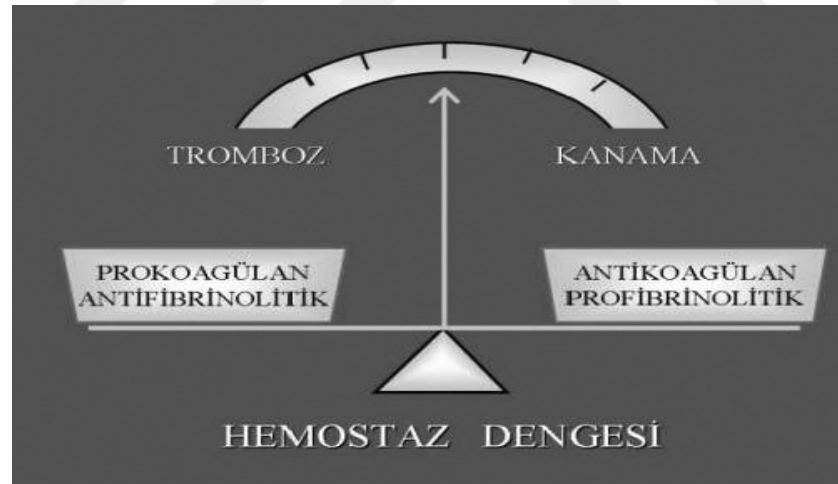
Penisilin keşfi ile birlikte enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede çok önemli mesafeler kat edilmiştir. Ancak penisilin doğal yollardan eldesi oldukça zor ve pahalı bir işlem olduğu için zamanla daha kolay ve ucuz yöntemler geliştirilerek yarı sentetik ve sentetik penisilinler üretilmeye başlandı. Bunu diğer antibiyotiklerin keşfi ve onların da devasa ölçeklerde laboratuvarlarda sentetik olarak üretimi izledi. Artan antibiyotik tüketimi zamanla mikroorganizmalarda direnç gelişimi ve yan etkilerin görülmesi gibi ciddi problemleri de beraberinde getirdi. Takip eden yıllarda, diğer çoğu sağlık probleminde olduğu gibi enfeksiyonla mücadelede de insanlar doğal ürünlere ve tamamlayıcı tıp uygulamalarına yönelim gösterdiler. Birçok besin maddesi ve tıbbi bitki antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle enfeksiyon hastalıklarında tercih edilmeye ve yoğun bir biçimde tüketilmeye başlandı. Bunlar arasında ıhlamur, kuşburnu, limon, zeytin, ada çayı, nane, kekik gibi günlük hayatta sıklıkla tükettiğimiz ürünler sayılabilir.

Ekstrelerimizin antimikrobiyal etkilerine bakacak olursak, her üç ekstrede de test edilen tüm mikroorganizmalara karşı değişen oranlarda antimikrobiyal ve antifungal etki elde edildi. Ancak yaprak ekstresi diğer iki ekstreye göre 100-200 µg/mL MIC değeri ile daha güçlü antimikrobiyal ve antifungal etki göstermiştir. Yaprak ekstresi bu etkisini hem Gr(+), hem Gr(-) hem de mantar suşları üzerine birbirine yakın düzeyde göstermiştir. Meyve ve çekirdek ekstraları ise yaprak ekstresine kıyasla daha zayıf olmakla beraber onlar da 200-400 µg/mL MIC değeri ile etkili bulunmuşlardır. Yaprak ekstraları test edilen tüm mikroorganizmalar üzerinde benzer düzeyde etkili iken meyve ve çekirdek ekstraları hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve MRSA'ya karşı 400-800 µg/mL MIC değeri ile düşük etkili bulunmuşlardır. Literatürde benzer şekilde zeytin ürünlerinin antimikrobiyal etkilerini ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Thielmann ve arkadaşları (2017), (128) zeytin meyve ekstraktının antimikrobiyal etkilerini, Lee ve arkadaşları (2010), (129) zeytin yaprağı ekstresinin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini, Cicerale ve arkadaşları (2012), (130) zeytin ve zeytinyağının antimikrobiyal

ve antienflamatuvar etkilerini, Masoko ve arkadaşları (2015), (131) zeytin yaprağı ekstresinin antifungal ve antienflamatuvar etkilerini rapor etmişlerdir.

Trombositler 2-5 μ çapında kan hücreleridir ve megakaryositlerden köken alırlar.

Periferik kandaki en küçük hücreler olduğu için kan pulcukları olarak da adlandırılan trombositler multifonksiyonel hücrelerdir. Bu fonksiyonlardan bir tanesi primer hemostazı sağlamaktır. Şöyle ki; damar endotelinde hasar olduğunda önce damar düz kaslarında vazokontraksiyon gelişir ve normalde dolaşımında disk halinde bulunan trombositler biraraya gelerek agregate olur ve bir trombosit tıkaçı oluşturur; buna primer hemostaz denilir. Kanın damar dışına çıkmasının engellenmesi bakımından bu fonksiyon hayati öneme sahiptir. Trombosit fonksiyon bozukluklarında trombositlerin adhezyon ve agregasyon yetenekleri yetersiz kalır ve hemostaz sağlanamadığı için kanama riski yükselir ve kanama zamanı uzar (132). Trombosit fonksiyon bozukluklarına bağlı kanama riski hayati öneme sahip olmakla beraber farklı uyarıcı faktörlere bağlı olarak agregate olan trombositlerin oluşturduğu trombus nedeniyle gelişen damar tıkanıklıkları da bir o kadar önemlidir.



Şekil 5. Kanama-tromboz (hemostaz)dengesi(133)

Fizyolojik olmayan koşullarda oluşabilecek trombosit agregasyonunun muhtemel tetikleyici faktörleri endotel hasarı, venöz staz ve kanın pıhtılaşma eğiliminin artması şeklinde sıralanabilir. Bu durumlarda izlenen tedavi stratejisinin bir bölümünü de antitrombotik etkili ilaçlar oluşturmaktadır. Bu ilaçlar halk arasında kan

sulandırıcılar olarak bilinmekte olup bazı bitkilerin kök, yaprak, çiçek ve meyve gibi unsurları da benzer etkilere sahip biyoaktif bileşenler içermektedir.

Trombosit agregasyonunu inhibe edici etki olarak tanımlanan “antitrombotik aktivite” tıbbi bitkilerin yararlı etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerden bir tanesidir. Çalışmamızda ekstrelerin antitrombotik etkinliğini ölçmede birçok klinik hematoloji laboratuvarının altın standart olarak kabul ettiği Chrono-Log Optik Agregometri tekniğini kullandık. Elde ettiğimiz veriler her üç ekstrenin de belli oranlarda antitrombotik aktivite gösterdiğini ancak yaprak ekstresinin meyve ve çekirdek ekstrelerine kıyasla daha yüksek antitrombotik etkinliğe sahip olduğunu ortaya koydu. %100 olarak değerlendirilen kontrol aktivitesine kıyasla ekstrelerin bağıl antitrombotik aktiviteleri yaprak, meyve ve çekirdek için sırasıyla %23,22 ; %5,01 ve %7,36 olarak belirlendi. Dub ve arkadaşları (2013), tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada zeytin yaprak ekstrelerinin tekrarlayan dozlarının uygulanmasının trombus oluşumunu azalttığını ve trombus morfolojisini değiştirerek damar duvarına tutunma potansiyelini azalttığını rapor etmişlerdir (134). Debicka ve arkadaşları (2018), (135) zeytin ve zeytinyağının antikanserojenik etkilerinin yanı sıra antiaterojenik ve antitrombotik etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Zbidi ve arkadaşları (2009), (136) zeytin ağacından izole ettikleri oleuropein ve (+)-cyclooolivil moleküllerinin güçlü antitrombotik etki gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Petroni ve arkadaşları (1995), da çalışmalarında zeytinden ekstrakte edilen polifenolik karakterli bileşiklerin eikozanoid üretimini ve platelet agregasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (137).

Elde edilen tüm sonuçlara toplu olarak bakıldığında, zeytin yaprak, meyve ve çekirdek ekstrelerinin test edilen parametrelerin tümü bakımından belirli oranlarda etkinlik gösterdiği görülmüştür. Yaprak ekstresi, tıbbi kullanım amaçlı preparat hazırlanması için aday bir doğal ürün olarak değerlendirilebilir. Zeytin çekirdeği, üzerinde az sayıda çalışma yapılmış doğal ürünlerden bir tanesi olup daha kapsamlı ve moleküler düzeydeki çalışmalarla fonksiyonları ve değerlendirilebilirliği ortaya konmalıdır. Zeytin ülkemizin önemli tarımsal üretim değerlerinden biridir, sadece sofralık zeytin ve zeytinyağı olarak tüketilmekle kalmamalı, yaprak ve çekirdekleri de tıbbi etkileri üzerinden ülke ekonomimize artı değer yaratmak üzere değerlendirilmelidir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Zeytin ülkemizin Güneydoğu Anadolu, Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerimizde yetiştirilen, genel olarak sofralık zeytin ve zeytinyağı olarak tüketilen ve ülke ekonomimize çok önemli katkılar sağlayan bir ağaç türüdür. Bilinen en sağlıklı besin maddelerinden bir tanesidir. Üzerinde en çok bilimsel araştırma yapılmış olan bitki türlerinin başında gelmektedir. PubMed’de “Olive” kelimesiyle yapılan taramalarda 28078 adet makale bulunabilmektedir. Çalışmalar daha çok zeytin bünyesindeki polifenollerin analizleri ve insan sağlığı üzerindeki faydalı etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Gerçekten de zeytin ve zeytinyağı dendiğinde ilk akla gelen şey sağlık ve lezzet olmaktadır. Araştırmacıların hemen tamamı zeytinin antikanserojen, antioksidan, antimikrobiyal, antiaging, antiaterojenik ve antiinflamatuvar etkileri konusunda benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Çağımızda ölüm nedenleri arasında ilk sırayı kardiyovasküler hastalıklar ikinci sırayı ise kanser hastalıkları almaktadır. Bu durumda güçlü antikanserojenik ve antiaterojenik etkileri ile zeytin ve zeytin ürünlerinin önemi ve değeri her geçen gün artmaya devam edecektir.

Ülke olarak dünya üzerindeki önemli zeytin ve zeytinyağı üreticisi ülkelerden bir tanesiyiz. Zeytin yapraklarını ise çok sınırlı miktarda kozmetik endüstrisinde kullanıyoruz. Oysa zeytin yaprakları çok değerli bir tıbbi ürün olarak da değerlendirilmelidir. Literatürdeki birçok araştırma bulgusu ile uyumlu olarak bizim çalışma sonuçlarımız da gösterdi ki zeytin yaprakları bünyesinde çok önemli bir antioksidan, antimikrobiyal ve antitrombotik potansiyel barındırmaktadır. Halk arasında zeytin yaprağı kullanılarak hazırlanan infüzyonların kan şekerini düşürmek amacıyla içildiği bilinmektedir. Zeytin yapraklarının antidiyabetik etkinliği daha kapsamlı bir biçimde moleküler düzeyde mutlaka araştırılmalıdır. Doğada antidiyabetik etki gösteren bitkisel ürün sayısı son derece sınırlıdır. Bunlardan bir tanesi de tarçın olup her ikisinde de ortak olan bir molekülün varlığı ortaya konulursa yeni bir antidiyabetik ilaç geliştirilebilir. İlaveten tarçın ve zeytin yaprakları kombine edilerek hazırlanacak bitkisel çaylarda sinerjik bir etki gözlenebilir. Bu çaylar ekonomik olarak da artı değer yaratabilir.

Zeytin çekirdekleri ezildiklerinde içlerinden çok az miktarda jelimsi yağlı bir sıvı çıkmaktadır. Çalışmamızda çekirdek ekstralarının tüm testlerde belli oranda

aktiviteye sahip olduğunu hatta fenolik madde bileşiminin yaprak ve meyve ekstrelerinden daha yüksek olduğunu saptadık. Halk arasında küçük zeytin çekirdeklerinin yutulması suretiyle ülser ve gastrit hastalarının tedavi edildiği bilinmektedir. Muhtemelen mide asitinin etkisiyle açığa çıkan zeytin çekirdeği öz sıvısı proton pompası inhibisyonu yaparak mide asit salgısını sınırlandırmakta ve iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Bu konuda da kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çekirdek öz sıvısının kozmetik endüstrisinde de kullanılabilme ihtimali bulunmaktadır, bünyesindeki yoğun fenolik madde ve yağ karışımı cilt lekelerinin giderilmesinde etkili olma potansiyeline sahiptir. Zeytin çekirdeğinin zeytinin meyve ve yaprakları kadar önemli olduğu ve ekonomik olarak değerlendirilmesi gerektiği mutlaka anlaşılmalı ve bu yönde girişimlerde bulunulmalıdır.

Sonuç olarak zeytin ülkemiz için son derece önemli bir değerdir ancak sadece sofralık zeytin ve zeytinyağı olarak değerlendirmekle kalmamalı, zeytine aynı zamanda çok önemli bir tıbbi ürün gözüyle bakılmalı ve bu yönde araştırmalar ve inovatif girişimler teşvik edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Maslanyj M, Simpson J, Roman E, Schüz J. Power frequency magnetic fields and risk of childhood leukaemia: misclassification of exposure from the use of the 'distance from power line' exposure surrogate. *Bioelectromagnetics*, 2009, 30(3), 183-8.
2. Bert B, Stephen TH. Air pollution and health, *Lancet*. 2002, 360: 1233–42.
3. Debela SA, Wu J, Chen X, Zhang Y, Stock status, urban public perception, and health risk assessment of obsolete pesticide in northern ethiopia.. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019, 7(2):1-11.
4. Aendo P, Thongyuan S, Songserm T, Tulayakul P. carcinogenic and non-carcinogenic risk assessment of heavy metals contamination in duck eggs and meat as a warning scenario in thailand. *Sci Total Environ*. 2019, 689: 215-22.
5. Otto-Buczowska E, Dryżałowski M. Metabolicsyndrome in youngpatients. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2015, 21(1): 32-6.
6. Saika K, Sobue T. Cancer statistics in the World. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013, 40(13): 2475-80.
7. Savoia C, Volpe M, Grassi G, Borghi C, Rosei EA, Touyz RM. Personalized medicine-a modern approach for the diagnosis and management of hypertension. *Clin Sci*. 2017, 131(22): 2671-685.
8. Falzon CC, Balabanova A, Prim Care. *Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine*. 2017, 44(2): 217-27.
9. Boss A, Bishop KS, Marlow G, Barnett MP, Ferguson LR. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*. 2016, 8(8).
10. Gündoğdu MA, Kaleci N, Nergis O, Doğan E, Farklı zaman periyotlarında hasat edilen bazı yabancı kökenli zeytin çeşitlerinin pomolojik ve bazı biyokimyasal karakterlerindeki değişimlerin saptanması. *Zeytin Bilimi* 2016, 6 (2): 61-67.

11. Diamond J, İçinde:*Tüfek Mikrop ve Çelik*. İnce Ü, (Çeviri editörleri). Ankara: Tübitak Popüler Bilim Kitapları. 2008:310-316.
12. Kiritsakis K. Flavor components of olive oil—*A review* 1998, 75(6): 673-81.
13. Ferreira ICFR, Barros L, Soares, ME, Bastos, ML, Pereira, JA. Antioxidant activity and phenolic contents of olea europaea l. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem*, 2007, 103, 188-195.
14. Kaplan M, Karaöz Arıhan S. Antik Çağdan Günümüze Bir Şifa Kaynağı: Zeytin Ve Zeytinyağının Halk Tıbbında Kullanımı. “ VIII. Milletlerarası Türk Halk Kültürü Kongresi”. 2011, İzmir.
15. Tibet Ü. Türkiye Zeytin Çeşitleri. *Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Yayınları*, 2009, (7)1:87-93 .
16. Kıvrak M. Balıkesir Üniv. Edremit M.Y.O. Açık Ders mucahitkivrak.baun.edu.tr/index.../zeytin%20cesitleri%205%20gda%20cesitleri.pdf 24 Mayıs 2019.
17. Tsartsou E, Nikolaos P, Castanas E, Kampa M. Network meta analysis of metabolic effects of olive oil in human shows the importance the importance of olive oil consumption with moderate polyphenol levels as part of the Mediterranean Diet. *Front in Nutr*, 2019, 6(6):1-11.
18. Rhodes CJ. Electron spin resonance. Part two: A diagnostic method in the environmental sciences. *Sci Prog*. 2011; 94(Pt 4): 339-413.
19. Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh I, Zhao L, Li XK. Oxidative Stress in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci*. 2016, 17(12):4-9..
20. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002, 82(1):47-95.
21. Sanghera1 GS, Malhotra PK, Sidhu GS, Sharma VK, Sharma BB. and Karan R. Genetic engineering of crop plants for enhanced antioxidants activity. *Int J Adv Res & Techn*, 2013, Volume 2, Issue 5.
22. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 , 82(1): 47-95.

23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39(1):44-84.
24. Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 4(2): 216-23.
25. Gebicki JM. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Arch Biochem Biophys.* 2016, 595:33-9.
26. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2002, 32(11):1102-15.
27. Hagymási K, Egresi A, Lengyel G. Antioxidants-Antioxidative Stress: *Facts And Questions*, 2015. *Orv Hetil.* 2015, 156(47):1884-7.
28. Whayne TF, Saha SP, Mukherjee D. Antioxidants In The Practice Of Medicine; What Should The Clinician Know? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2016,16(1):13-20.
29. Zulaikhah ST, The Role of Antioxidant to Prevent Free Radicals in *The Body Sains Medika*, Vol. 8, No. 1, 2017, 39-45.
30. Lewandowski L, Kepinska M, Milnerowicz H. Inhibition Of Copper-Zinc Superoxide Dismutase Activity By Selected Environmental Xenobiotics. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018, 58:105-113.
31. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - *An Evolutionary Overview.* 2008, 275(15):3959-70.
32. Couto N, Wood J, Barber J. The Role Of Glutathione Reductase And Related Enzymes On Cellular Redox Homoeostasis Network. *Free Radic Biol Med.* 2016, 95:27-42.
33. Peh HY, Tan WS, Liao W, Wong WS. Vitamin e therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacol Ther.* 2016, 162:152-69.
34. Duval C, Poelman MC. Scavenger Effect Of Vitamin E And Derivatives On Free Radicals Generated By Photoirradiated Pheomelanin. *J Pharm Sci.* 1995 Jan, 84(1):107-10.

35. Yang X, He T, Han S, Zhang X, Sun Y, Xing Y, Shang H. The Role of Traditional Chinese Medicine in the Regulation of Oxidative Stress in Treating Coronary Heart Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 4(3):68-75.
36. Nimse SB, Dilipkumar Pal. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Soc Chem*, 2015, 5, 27986-28006.
37. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi, MR. Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Ind J Pharmacol* 2001, 33: 2-16.
38. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013, 13:162750-55.
39. Yabuzaki J. Carotenoids Database: Structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database* . 2017, (1):1-11.
40. Agarwal S, Rao A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000, 163(6):739-44.
41. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta*. 2010, 411(23-24):1875-82.
42. Altınbas A. SDU Tıp Fak Kardiyoloji A.D. Açık Ders
<https://www.slideshare.net/mbolmez/as-11936871> 3 Mart 2019
43. Sindhia V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumaria R, Dhakaa N, Potential applications of antioxidants e A review. *J Pharm Res*. 2013, 8(3): 828 -835.
44. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem*. 2010, 17:3262-3288.
45. Yıldız G, Uylaşer V. Doğal bir antimikrobiyel: Oleuropein. *Uludağ Üniv. Ziraat Fak Der*. 2011, 25(1):131-142.
46. Ötleş S, Özyurt VH. Oleuropein ve Önemi. *Zeytin Bilimi* 2012, 3 (1) 59-71.
47. Shamshoum H, Vlavcheski F, Tsiani E. Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors*. 2017, 43(4):517-528.

48. Gikas EFN. Conformation of Oleuropein, the major bioactive compound of *olea europea*. *Bazoti and A. Tsarbopoulos*. *Mol. Struct.: Theochem*. 2007, 821, 125-132.
49. Zbidiab H, Salidob S, Altarejosb J, Perez-Bonillab M, Bartegia A, Rosadoc JA, Salidoc GM, Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Food Cells, Molecules and Diseases* 2009, (42)279–285.
50. Gentile L, Uccella NA, Sivakumar G. Oleuropein: Molecular Dynamics and Computation. *Curr Med Chem*. 2017, 24(39):4315-4328.
51. Marsillo V, Lanza B. Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76,520-524.
52. Brenes M, Castro A. Transformation of Oleuropein and its Hydrolysis Products during Spanish-style Green Olive Processing, *J Sci Food Agric*. 1998, 77, 353-358.
53. Sudjana ANC, D'Orazio V, Ryan N, Rasool J, Ng N, Islam TV and Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int. J. Antimic*. 2009, 33(5):461-463.
54. Lee OH, and Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour. Technol*. 2010, 101(10):3751-3754.
55. Winkelhausen, ER. Pospiech and G. Laufenberg. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Techn. Macedonia*. 2005, 24(1):41-46.
56. Fredrickson, WR. Method and composition for antiviral therapy with olive leaves. *U.S. Patent*. 2000, 6(117): 844-47.
57. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 2016:9130976-9.

58. Visalli G, Facciola A, Bertuccio MP, Picerno I, Di Pietro A. In vitro assessment of the indirect antioxidant activity of Sulforaphane in redox imbalance vanadium-induced. *Nat Prod Res.* 2017, 31(22):2612-2620.
59. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958, 181: 1199-1200.
60. Brand-Williams W, Cuvelier ME, and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Sci & Tech*, 1995, 28: 25-30.
61. Miller NJ, Rice EC, Davies MJ, Gopinathan V, and Milner A, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993, 84:407-412.
62. Berg RV, Haenen RMM, Berg H, and Bast A. Applicability of and improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurement of mixtures. *Food Chem*, 1999, 66: 511-517.
63. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol & Med*, 1999, 26: 1231-1237.
64. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996, 239(1):70-6.
65. Cao G, and Prior RL, In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol & Med*, 1999, 27: 1173-1181.
66. Lo KM, Cheung CK. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *Alba*. *Food Chem*, 2005, 85: 533-539.
67. Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M, Büyükköroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 2004, 90(2-3):205-15.
68. Ersöz G, Trombosit Aktivasyonu. *Ankara Ün Tıp Fak Dergisi*, 1997, 50(3):163-72.
69. Packham MA, Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol.* 1994, 72: 278-84.

70. Steen VM, Holmsen H. Current aspects on human platelet activation and responses. *Eur J Hematol.* 1987, 38: 383-399.
71. Aktan U. Hacettepe Üniv Tıp Fak Hematoloji A.D. Açık Ders
https://www.google.com/url?sa=i&rc=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&ved=2ahUKEwiShNSu9KTjAhUHKuwKHaN_AxQQjhx6BAgBEAI&url=http%3A%2F%2Fwww.hematoloji.hacettepe.edu.tr%2Fakedemikdersler%2Fagregasyon.pdf&psig=AOvVaw2azU8eym4BShBSIK1Lq8st&ust=1562661090487956
7 Nisan 2019.
72. Heesen M, Dietrich GV, Detsch O, Drevermann J, Boldt J, Hempelmann G. The in vitro effect of alpha-2 agonists on thrombocyte function and density of thrombocyte alpha-2 receptors, Article in German. *Anaesthesist.* 1996, 45(3):255-8.
73. Gachet C, Cazenave JP. ADP induced blood platelet activation: a review. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1994, 33: 347-58.
74. Coughlin SR. Thrombin receptor structure and function. *Thromb Haemostas* 1993, 66(1): 184-7.
75. Hardisty RM. Molecular mechanism of platelet adhesion. *Adv Exp Med Biol.* 1985, 192: 411-8.
76. Brantl SA, Khandoga AL, Siess W. Mechanism of platelet activation induced by endocannabinoids in blood and plasma. *Platelets.* 2014, 25(3):151-61.
77. Barinov EF, Mamedaliyeva SA, Tverdokhleba TA, Balykina AO. Interaction of epinephrine and ADP in regulation of platelet function in chronic cerebral ischemia. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2017, 61(2):51-5.
78. Immunol J, Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *Thromb Haemostas*, 1980, 125(6):2756-63.
79. Kaplan K. Trombosit fonksiyon bozuklukları. www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/2007thtk_08.pdf 8 Mayıs 2019.
80. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011, 25(4):155-67.

81. Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev.* 2011, 25(4):169-73.
82. Dikmen ZG, Akbıyık F. Trombosit fonksiyon bozuklukları. *Turk J Biochem.* 2014, 39(4):567–570.
83. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005, 19(2):111-23.
84. Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2002, 126(2):133-46.
85. Krishnegowda M, Rajashekaraiyah V. Platelet disorders: an overview. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015, 26(5):479-91.
86. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature.* 2008, 21;451(7181):914-8.
87. Hemost S, T. The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential. *Thrombocythemia and Polycythemia Vera.* 2006, Sep;32(6):589-604.
88. Franchi F, Angiolillo DJ. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol.* 2015, Jan;12(1):30-47.
89. Kline JA. Diagnosis and Exclusion of Pulmonary Embolism. *Thromb Res.* 2018, Mar;163:207-220.
90. Dikmen ZG, Akbıyık F, Trombosit fonksiyon testleri. *Turk J Biochem.* 2014, 39(4):549–553.
91. Frontroth JP. Light transmission aggregometry. *Methods Mol Biol.* 2013, 992:227-40.
92. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015, Feb 18;11:133-48.
93. Slinkard K. and Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1977, 28, 49-55.

94. Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, and Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000, 71, 109-114.
95. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J Nutr.* 1986, 44: 307–315.
96. Dinis TCP, Madeira VMC, Almedia LM. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 1994, 315: 161–169.
97. Zhang XY. Principle of Chemical Analysis, Beijing: *China Science Press.* 2000, 275-76.
98. Blois MS. Antioxidant Determinations By The Use Of A Stable Free Radical, *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.
99. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).* 2013, M100:23-28.
100. Wayne PA. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline Second Edition. *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).* 2010, CLSI document M 45:60-69 .
101. Catherine PM, Hayward KA, Moffat AR, Israels S, Plumhoff E, Flynn G, FRCPC and James LZ, Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 2010, 134:955-963.
102. Besnard G, Terral JF, Cornille A. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Ann Bot.* 2018, 121(3):385-403.
103. Khan MY, Panchal S, Vyas N, Butani A, Kumar V. *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. *Pharmacognosy Reviews.* 2007, Vol 1, Issue 1, Jan-May.

104. Cumaoglu A, Ari N, Kartal M, Karasu Ç. Polyphenolic extracts from *Olea europea* L. protect against cytokine-induced β -cell damage through maintenance of redox homeostasis. *Rejuvenation Res.* 2011, 14(3):325-34.
105. Yuan JJ, Wang CZ, Ye JZ, Tao R, Zhang YS. Enzymatic hydrolysis of oleuropein from *Olea europea* (olive) leaf extract and antioxidant activities. *Molecules.* 2015, 20(2):2903-21.
106. Nan JN, Ververis K, Bollu S, Rodd AL, Swarup O, Karagiannis TC. Biological effects of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: An extra view from genome-wide transcriptome analysis. *Hell J Nucl Med.* 2014, 62-9.
107. Boss A, Bishop KS, Marlow G, Barnett MP, Ferguson LR. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients.* 2016, 8(8): 132-38.
108. Susamcı E, Ötleş S, Irmak Ş, Sofralık Zeytinin Besin Öğeleri, Duyusal Karakterizasyonu ve İşleme Yöntemleri Arasındaki Etkileşimler. *Zeytin Bilimi.* 2011, 2 (2), 65-74.
109. Vinhaa AF, Ferreres F, Silva BM, Valent P, Goncalves A, Pereira JA, Oliveira MB, Seabra RM, Andrade PB. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* 2005, 89, 561–568.
110. Irmak Ş, Güngör FÖ, Susamcı E. Bazı Sofralık Zeytin Çeşitlerimizin Toplam Fenolik Madde Miktarları ve İşleme Tekniklerinin Bu Bileşikler Üzerine Etkileri. *Zeytin Bilimi.* 2010, 1 (2), 57-64.
111. Clodoveo ML, Dipalmo T, Crupi P, Durante V, Pesce V, Maiellaro I, Lovece A, Mercurio A, Laghezza A, Corbo F, Franchini C. Comparison Between Different Flavored Olive Oil Production Techniques: Healthy Value and Process Efficiency. *Plant Foods Hum Nutr.* 2016, 71(1):81-7.
112. Çetinkaya H, Kulak M, Relationship Between Total Phenolic, Total Flavonoid and Oleuropein in Different Aged Olive (*Olea europaea* L.) Cultivar Leaves. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines (AJTCAM),* 2016, 13(2), 81-85.

113. Bouaziz M, Chamkha M, and Sayadi S, Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity during Maturation of the Olive Cultivar Chemlali from Tunisia *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5476–5481.
114. Huang G, Mei X, Hu J. The Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides. *Curr Drug Targets.* 2017, 18(11):1296-1300.
115. Martínez L, Castillo J, Ros G, and Nieto G. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary. *Pomegranate and Olive Extracts in Fish Patties Antioxidants.* 2019, 8(4), 86-98.
116. Stankovic M, Curcic S, Zlatic N, Bojovic B. Ecological variability of the phenolic compounds of *Olea europaea* L. leaves from natural habitats and cultivated conditions. *Biotechnol.* 2017, 31:499–504.
117. Orak HH, Karama'c M, Amarowicz R, Orak A, and Penkacik K. Genotype-related differences in the phenolic compound profile and antioxidant activity of extracts from Olive (*Olea europaea* L.) *Leaves Molecules.* 2019, 24, 1130-34.
118. Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Olive oil composition. In: Boskou D, editor. *Olive Oil: Am. Oil Chem. Soc. Press; Champaign, IL, USA: Chemistry and Technology.* 2006, 1–33.
119. Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Macchioni A, Montedoro G. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J Agric Food Chem.* 1999, 47(1):12-8.
120. Ryan D, Prenzler PD, Lavee S, Antolovich M, Robards K. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *J Agric Food Chem.* 2003, 51(9):2532-8.
121. Barbunsinski K. Fenton reaction-contraversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering.* 2009, 16(3): 347-58.
122. Altemimi AB. A Study of the Protective Properties of Iraqi Olive Leaves against Oxidation and Pathogenic Bacteria in Food. *Applications Antioxidants.* 2017, 6, 34, 2-13.

123. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 2006, 78, 803-811.
124. Wang Y, Wang S, Cui W, He J, Wang Z, and Yang X. Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury. *Neural Regen Res.* 2013, 8(22): 2021–2029.
125. Fabiani R, Rosignoli P, Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr.* 2008, 138(8):1411-6.
126. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016, 30(2):373-93.
127. Lins PG, Marina S, Pugine P, Scatolini AM, Melo MP. In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. *Heliyon.* 2018, 4(3):41-8.
128. Thielmann J, Kohnen S, Hauser C. Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. *Int J Food Microbiol.* 2017, 48-66.
129. Boo OHL, Lee Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biores Techn.* 2010, 3751-375.
130. Cicerale SRSJ, Keast LJJ. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr Op Biotech* 2012, 129-135.
131. Masoko P, and Makgapeetja DM. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *Olea africana* against pathogenic yeast and nosocomial pathogens. *BMC Complement Altern Med.* 2015, 15: 409.
132. Saluk J, Bijak M, Ponczek MB, Wachowicz B. The formation, metabolism and the evolution of blood platelets. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2014, 68:384-91.
133. Balkan C, Çocukluk Çağında Tromboz Ve Tedavisi. 39. *Hematoloji Kongresi*, 23-26 Ekim, Antalya.

134. Dub AM, Dugani AM. Antithrombotic effect of repeated doses of the ethanolic extract of local olive (*Olea europaea* L.) leaves in rabbits. *Libyan J Med.* 2013, 8(1):20947.
135. Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza AM, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 686.
136. Rosado JA, Salido GM, Zbidia H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegia A, Cells B, Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Molecules & Diseases.* 2009, 42, 279–285.
137. Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF and Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic compounds in olive oil. *Thromb Res* 1995;78:151-160.

EKLER

Ek.1. Özgeçmiş

1994 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Bölümünden mezun oldum, sırasıyla T.Ö.T.M. Biyokimya Lab., İnönü Üniversitesi Kimya Öğr. Böl., ve İnönü Üniversitesi Eczacılık Fak.'de görev yaptım. Halen İnönü Üniv. Eczacılık Fak.'deki görevime devam etmekteyim. Evliyim ve iki erkek çocuk babasıyım.



Etik Kurul İzni

13 Nisan 2013 tarihli Resmi Gazetede yayınlanan 28617 sayılı kanuna göre etik kurul iznine gerek duyulmamaktadır.



Tez Danışmanı
Prof. Dr. F. Zehra KÜÇÜKBAY