

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**BAZI ZEYTİN KÜLTİVARLARININ ANTİGENOTOKSİK,
ANTİOKSİDATİF VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN
PERİFERAL LENFOSİT HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

BERKER KOCATÜRK

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Serap DOĞAN (Tez Danışmanı)
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Emin DİKEN (Eş Danışman)
Prof. Dr. Ümit ÇAKIR
Prof. Dr. Fatih SATIL
Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
Doç. Dr. Dudu DEMİR

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan **“BAZI ZEYTİN KÜLTİVARLARININ ANTİGENOTOKSİK, ANTIOKSİDATİF VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN PERİFERAL LENFOSİT HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI”** başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Berker KOCATÜRK

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)
tarafından 2021/029 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

BAZI ZEYTİN KÜLTİVARLARININ ANTİGENOTOKSİK, ANTİOKSİDATİF VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN PERİFERAL LENFOSİT HÜCRELERİNDE

ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

BERKER KOCATÜRK

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)

(EŞ DANIŞMAN: ÖĞRETİM GÖREVLİSİ DR. MEHMET EMİN DİKEN)

BALIKESİR, TEMMUZ - 2023

Zeytin yaprağı ekstraktı sekeroidler, flavonoidler, basit fenoller, fenolik asitler ve terpenoidleri içermektedir. Bu çalışmada *Olea europaea* türüne ait Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin yaprak kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının fitokimyasal özellikleri, antioksidan kapasiteleri, hidrojen peroksit kaynaklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik/antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların fitokimyasal özellikleri LC-MS/MS cihazı ile belirlenmiştir. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri *in vitro* ve *in vivo* olarak 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit (ABTS+) yöntemleri ile sitotoksik aktivite MTS testi ((5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil tiyazol)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum)), antigenotoksik aktivite mikronükleus, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile belirlenmiştir. LC-MS/MS sonuçları göre kültürler arasında en yüksek fenolik bileşiğin oleuropein olduğunu tespit edilmiştir. DPPH analizi sonucunda en iyi antioksidan aktivite distile su ile hazırlanan Kiraz kültüründe ($0,14 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); ABTS⁺ analizi sonucunda en iyi antioksidan aktivite etanol ile hazırlanan Domat kültüründe belirlenmiştir ($0,023 \pm 0,002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). MTS testi sonuçlarına göre tüm ekstraktların lenfosit hücre canlılığını olumlu yönde etkilediğini ve belirtilen doz miktarlarında herhangi bir sitotoksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, artan inkübasyon süresinin ekstraktın hücre yaşamlılığındaki etkisini düşürdüğü tespit edilmiştir. Mikronükleüs sonuçlarına bakıldığında ise lenfosit hücreleri üzerinde zeytin yaprağının hidrojen peroksitin neden olduğu genotoksik hasarı azalttığı bulunmuştur. SMART testi verilerine göre, tüm kültürlerde kanat başına küçük tek nokta frekansları, pozitif kontrole göre en az 4.44 kat daha az belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Olea europaea*, sitotoksosite, genotoksosite, antioksidan aktivite, hidrojen peroksit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIGENOTOXIC, ANTIOXIDATIVE AND CITOTOXIC PROPERTIES OF SOME OLIVE CULTIVARS IN PERIPHERAL LYMPHOCYTE CELLS

PH.D THESIS

BERKER KOCATÜRK

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOGAN)

(CO-SUPERVISOR: LECTURER DR. MEHMET EMİN DIKEN)

BALIKESİR, JULY - 2023

Olive leaf extract contains seceroids, flavonoids, simple phenols, phenolic acids, and terpenoids. In this study, the phytochemical properties, antioxidant capacities, *in vitro* and *in vivo* cytotoxic/antigenotoxic effects of Uslu, Domat, Gemlik, and Kiraz cultivars belonging to the *Olea europaea* species prepared with different solvents on human lymphocyte cells were investigated. Phytochemical properties of the extracts were determined by LC-MS/MS device. Antioxidant capacities of extracts *in vitro* and *in vivo* by DPPH and ABTS⁺ methods, cytotoxic activity MTS test ((5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethyl thiazol)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium)), antigenotoxic activity was determined by micronucleus, somatic mutation and recombination test (SMART). According to the LC-MS/MS results, it was determined that the highest phenolic compound among the cultivars was oleuropein. As a result of DPPH analysis, the best antioxidant activity was found in Kiraz cultivar prepared with distilled water ($0.14 \pm 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$); As a result of ABTS⁺ analysis, the best antioxidant activity was determined in Domat cultivar prepared with ethanol ($0.023 \pm 0.002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). According to the MTS test results, it was observed that all extracts supported lymphocyte cell viability and did not show any cytotoxic effect in the specified dose ranges. For all that, it was determined that increasing incubation time decreased the effect of the extract on cell viability. Looking at the micronucleus results, it was found that olive leaf inhibited the genotoxic damage caused by hydrogen peroxide on lymphocyte cells. Based on SMART test data, small single point frequencies per wing were determined at least 4.44 times less than in the positive control in all cultivars.

KEYWORDS: *Olea europaea*, cytotoxicity, genotoxicity, antioxidant activity, hydrogen peroxide

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Oleaceae (Zeytingiller) Familyasının Genel Özellikleri	2
1.1.1 <i>Olea europaea</i> L.....	2
1.1.1.1 <i>Olea europaea</i> L. cv. Domat	3
1.1.1.2 <i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu.....	4
1.1.1.3 <i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik	4
1.1.1.4 <i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz	5
1.2 Zeytin Yaprağının Yapısı ve Özellikleri	6
1.3 Serbest Radikaller.....	7
1.3.1 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	7
1.4 Antioksidanlar	8
1.4.1 DPPH.....	8
1.4.2 ABTS ⁺	9
1.5 Hücre Kültürü ve Sitotoksosite	10
1.5.1 MTS.....	10
1.6 Genotoksik Aktivite	11
1.6.1 Genetoksosite Belirlemede Kullanılan Testler	12
1.6.1.1 Mikronükleus Testi (MN).....	12
1.6.1.2 Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	13
1.7 Literatür Özeti	14
1.8 Çalışmanın Amacı	19
2. MATERYAL - METOT	20
2.1 Materyal	20
2.1.1 Bitki Örneklerinin Toplanması.....	20
2.2 Metot	20
2.2.1 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	20
2.2.2 LC-MS/MS ile Fenolik Madde Dağılımı Analizi.....	20
2.2.3 Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması.....	20
2.2.3.1 DPPH.....	21
2.2.3.2 ABTS ⁺	21
2.2.3.3 <i>In vivo</i> Antioksidan Etkilerin Belirlenmesi	21
2.2.4 Hücre Kültürü İşlemleri.....	22
2.2.4.1 Malzemelerin Sterilizasyonu	22

2.2.4.2 Besiyerinin Hazırlanması.....	22
2.2.4.3 Kandan Lenfosit İzalasyonu	22
2.2.5 Sitotoksosite Testi	23
2.2.5.1 MTS Testi.....	23
2.2.6 Genotoksosite Testleri.....	23
2.2.6.1 Mikronükleus Testi.....	23
2.2.6.2 <i>In vivo</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	24
2.2.6.3 <i>In vivo</i> Toksisite Testi.....	24
2.2.7 İstatistiksel Analizler	25
3. BULGULAR	26
3.1 LC-MS/MS Sonuçları	26
3.2 Antioksidan Sonuçları	28
3.2.1 DPPH ve ABTS ⁺ Testi Sonuçları	28
3.2.2 <i>In vivo</i> Antioksidan Test Sonuçları	29
3.2.2.1 <i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu Kültivarına Ait <i>In Vivo</i> Antioksidan Test Sonuçları ..	29
3.2.2.2 <i>Olea europaea</i> L. cv. Domat Kültivarına Ait <i>In Vivo</i> Antioksidan Test	30
Sonuçları	30
3.2.2.3 <i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik Kültivarına Ait <i>In Vivo</i> Antioksidan Test Sonuçları	30
3.2.2.4 <i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz Kültivarına Ait <i>In Vivo</i> Antioksidan Test Sonuçları	31
3.3 Sitotoksosite Sonuçları.....	31
3.3.1 MTS Testi Sonuçları.....	31
3.3.1.1 <i>Olea europaea</i> Uslu Kültivarına Ait MTS Sonuçları	31
3.3.1.2 <i>Olea europaea</i> Domat Kültivarına Ait MTS Sonuçları.....	33
3.3.1.3 <i>Olea europaea</i> Gemlik Kültivarına Ait MTS Sonuçları.....	34
3.3.1.4 <i>Olea europaea</i> Kiraz Kültivarına Ait MTS Sonuçları.....	36
3.4 Genotoksosite Sonuçları.....	37
3.4.1 Mikronükleus Testi Sonuçları.....	37
3.4.2 <i>In vivo</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Sonuçları	39
3.4.3 <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları	40
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	47
4.1 LC-MS/MS Sonuçları	47
4.2 Antioksidan Kapasite Sonuçları	50
4.3 Sitotoksosite Testi Sonuçları	53
4.3.1 MTS Testi Sonuçları.....	53
4.4 Genotoksosite Test Sonuçları.....	57
4.4.1 Mikronükleus Testi Sonuçları	57
4.4.2 <i>In vivo</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Sonuçları	63
4.4.3 <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları	65
4.4.3.1 <i>Olea europaea</i> Uslu Kültivarına Ait <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları.....	65
4.4.3.2 <i>Olea europaea</i> Domat Kültivarına Ait <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları	65
4.4.3.3 <i>Olea europaea</i> Gemlik Kültivarına Ait <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları	66
4.4.3.4 <i>Olea europaea</i> Kiraz Kültivarına Ait <i>In vivo</i> Toksisite Sonuçları	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
6. KAYNAKLAR.....	70
EKLER	84
EK A: Etik Kurul Kararı.....	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Olea europaea</i> L. cv. Domat.....	3
Şekil 1.2: <i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu.....	4
Şekil 1.3: <i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik.....	5
Şekil 1.4: <i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz.....	6
Şekil 1.5: Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma.....	8
Şekil 1.6: DPPH radikali ve kararlı formu	9
Şekil 1.7: ABTS ⁺ 'nin persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi	9
Şekil 1.8: MTS'nin etki mekanizması. Canlı hücrelerde NADH'den bir ara elektron alıcısı tarafından elde edilen MTS solüsyonunda Formazan'a elektron geçişini (indirgeme) gösterir	11
Şekil 1.9:Hücreler üzerinde genotoksinlerin etkileri.....	12
Şekil 1.10: Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler	13
Şekil 1.11: Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu	13
Şekil 2.1: Santrifüjlemeden sonra Ficoll-Paque ile işlenmiş bir kanın katmanları.....	22
Şekil 3.1: Uslu kültürünün yüzde antioksidan sonuçları	29
Şekil 3.2: Domat kültürünün yüzde antioksidan sonuçları.....	30
Şekil 3.3: Gemlik kültürünün yüzde antioksidan sonuçları.....	30
Şekil 3.4 : Kiraz kültürünün yüzde antioksidan sonuçları.....	31
Şekil 3.5: Uslu kültürünün MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir (p<0.05).....	33
Şekil 3.6: Domat Kültürünün MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir (p<0.05)	34
Şekil 3.7: Gemlik kültürünün MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir (p<0.05).....	36
Şekil 3.8: Kiraz kültürünün MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir (p<0.05).....	37
Şekil 3.9: Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % puparasyon sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05)	41
Şekil 3.10 Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).....	41
Şekil 3.11: Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05)	42
Şekil 3.12: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).....	42
Şekil 3.13: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir (p<0.05).....	43

Şekil 3.14: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$)	43
Şekil 3.15: Gemlik kültürünün su su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).....	44
Şekil 3.16: Gemlik kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).....	44
Şekil 3.17: Gemlik kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$)	45
Şekil 3.18: Kiraz kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).....	45
Şekil 3.19: Kiraz kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).....	46
Şekil 3.20: Kiraz kültürünün su, metanol ve etanol ekstraktları ile muamele edilmiş <i>Drosophila melanogaster</i> sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).....	46
Şekil 4.1: a- Bir MN, b- İki MN içeren binükleat hücreler.....	60
Şekil 4.2: Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler [54].....	61
Şekil A.0.1 Etik Kurul Kararı.....	84

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Canlı organizmadaki önemli ROT çeşitleri	7
Tablo 3.1: <i>Olea europaea</i> kùltivarlarının LC-MS/MS sonuçları.....	26
Tablo 3.2: <i>Olea europaea</i> Kùltivarlarının yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının IC ₅₀ değerleri	28
Tablo 3.3: <i>Olea europaea</i> kùltivarlarının mikronùkleus sonuçları.....	38
Tablo 3.4 : Uslu kùltivarına ait smart testi sonuçları	39
Tablo 3.5: Domat kùltivarına ait smart testi sonuçları.....	39
Tablo 3.6: Gemlik kùltivarına ait smart testi sonuçları.....	40
Tablo 3.7: Kiraz kùltivarına ait smart testi sonuçları.....	40

SEMBOL LİSTESİ

ABTS	: 2,2-(azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit))
Cyt-B	: Sitokalsin-B
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FBS	: Fetal bovine serum
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
IC₅₀	: %50 inhibitör konsantrasyonu
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Monopotasyum fosfat
MN	: Mikronükleus
MTS	: 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetiltiyazol)-3-(4-sülfofenil-2H-tetrazolyum
Na₂HPO₄	: Disodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NDI	: Nükleer bölünme indeksi
Pen/Strep	: Penisilin/ Streptomisin
ROS	: Reaktif oksijen türleri

ÖNSÖZ

Çalışmam boyunca beni destekleyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Serap DOĞAN ve eş danışmanım Öğretim Görevlisi Dr. Mehmet Emin DİKEN hocama ve çalışmam sırasında benden yardımları esirgemeyen Ar. Gör. Dr. Begümhan Yılmaz Kardeş hocama ve laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tezimi 2021/29 nolu proje ile destekleyen Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan ve bilimi destekleyen İzmir Kavram Meslek Yüksekokulu Müdürü Sayın Prof. Dr. Derman KÜÇÜKALTAN hocama teşekkür ederim.

Balıkesir, 2023

Berker KOCATÜRK





Hayatını kaybeden 50.783 vatandaşımız anısına...

06/02/2023

04:17

1. GİRİŞ

Canlı hücreler sürekli olarak hücre içi metabolik faaliyetlerimiz sonrasında oluşan ya da hücre dışı maruz kalınan kimyasal ve fiziksel ajanlar (pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.) kaynaklı potansiyel olarak zararlı serbest radikal türlerine maruz kalmaktadır [1]. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulundurlar ve bundan dolayı çok kararsız ve reaktif moleküllerdir [2]. Yüksek derecede reaktif hidroksil radikali (OH^\cdot), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türleri (ROS) canlı hücreler için oldukça tehlikeli moleküllerdir [1].

Hidrojen peroksit (H_2O_2), mutajenik potansiyeli nedeniyle hayvanlarda iyi bilinen bir kanser indükleyicisidir ve hücrelerde doğal bir oksidatif hasar kaynağıdır. Tek ve çift sarmal kırılmaları da dâhil olmak üzere bir dizi DNA lezyonuna neden olur [3].

Kalıtım materyalimiz olan DNA'nın bu moleküllere maruz kalması ciddi derecede önem taşımaktadır. Eğer DNA'da meydana gelen hasarlar onarılmadan kalırsa mutasyonlar görülebilmektedir. Oluşan bu mutasyonlar gen mutasyonu, kromozom mutasyonu ve genom mutasyonu gibi değişik düzeylerde meydana gelmektedir [4]. Bazı diyet bileşiklerinin antioksidan özellikleri DNA hasarının önlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Birçok şifalı bitkilerin antioksidan kapasitesi sayesinde periferik kanla ilgili toksisitenin tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir [5]. Bitki doğal ürünlerinde bulunan antioksidan aktivite gösteren moleküllerin DNA oksidatif hasarını önleyerek koruyucu etkiler sağlayabileceği gösterilmiştir [6].

Geçmişten günümüze kadar insanoğlu hem temel besin kaynağı olarak hem de tedavi edici özelliklerinden dolayı bitkileri kullanmışlardır. Tıp alanında günümüzde bitkisel kaynaklara olan ilginin giderek artmasıyla birlikte sentetik olarak elde edilen ilaçlara ek olarak alternatif tedavi arayışları, antioksidan, antigenotoksik ve antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktlarının destek tedavi olarak kullanımının yaygınlaşması, bitkilerin öneminin daha da artmasına neden olmuştur [7, 8]. Yapılan birçok çalışma bitkisel besinlerle beslenmenin insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerini ortaya koymakla birlikte ROS'ların neden olduğu birçok hastalığa karşı da koruduğunu ortaya çıkarmıştır. Bitkisel kaynaklı besinler flavonoidler ve fenolik asitler gibi oldukça önemli molekülleri de içermektedirler. Şu ana kadar 8000 civarında fenolik bileşik tanımlanmış ve bu sayının da

gün geçtikçe artacağı beklenmektedir [9]. Zeytin yaprağının bileşiminde birçok fenolik bileşen bulunmaktadır. Zeytin yaprağının ekstraktlarında tanımlanan en bilinen fenolik bileşikler; oleuropein, hidroksitirozol, verbaskozid, apigenin 7-glukozid ve luteolin 7-glukoziddir [10]. Günümüzde zeytin yaprağının sağlık açısından faydalarını gösteren birçok bilimsel çalışma mevcuttur. Bu fenolik bileşikler, hayvan ve insanlar ile yapılan çalışmada sağlık yararları bildirmiştir ve dünya çapındaki bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Bu çalışmalar genellikle antioksidan etki, antimikrobiyal etki , hipoglisemik etki, hipokolesterolemik etki, kardiyoprotektif etki, hipokolesterolemik etki, antiinflamatuvar etki ve antihipertansif etki üzerine yoğunlaşmıştır [10].

1.1 Oleaceae (Zeytingiller) Familyasının Genel Özellikleri

Oleaceae familyası 25 cins ve yaklaşık 600 türden oluşan orta büyüklükte bir familyadır. Familyaya ait türlere Antarktika hariç tüm kıtalarda, tropik ve ılıman bölgelerde ve hemen hemen tüm rakımlarda rastlamak mümkündür [11]. Familyaya ait üyeler kışın yaprak döken ya da her dem yeşil çalı veya odunsu tırmanıcı bitkilerdir. Hipogin ve dört parçalı çiçekleri olan familya üyelerinin ovaryumları iki karpelli ve sinkarptır. Meyve tipleri ise üzüm, çekirdekli veya kanatlı nus şeklindedir. Türkiye florasında Oleaceae familyasına ait 7 cinsin bulunduğu belirtilmiştir [11, 12].

1.1.1 *Olea europaea* L.

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) dünyada yaklaşık 8 milyon hektarlık alanı kaplayan Akdeniz ülkelerinin en önemli meyve ağaçlarından biridir. Zeytin yaprağı; zeytinin meyvesinden sonra besin değeri en yüksek kısmıdır. Bu nedenle özellikle Akdeniz halkı arasında belirli rahatsızlıkların tedavisi için en fazla tüketilen bitki çaylarından birisidir. Bundan dolayı zeytin yaprağı son yıllarda bilim insanlarının da ilgisini oldukça çekmektedir [13].

Zeytin yaprağı potansiyel olarak faydalı birçok biyoaktif bileşiği içerdiğinden antioksidan özelliklere sahiptir [14]. Antioksidan özelliğini kimyasal yapısında oksidasyonu önlemek için hidrojen verebilen hidroksil gruplarının varlığından kazanmaktadır [15]. Fenolik maddelerin 5 grubu olan oleuropeositler (oleuropein ve verbaskozid); flavonlar (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin diosmetin); flavoneller (rutin); flavon-3-oller (kateşin) ve substitue fenoller (tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilik asit ve kafeik asit) zeytin yaprağı ekstresinde mevcuttur. En fazla miktarda bulunan diğer bileşikler ise hidroksitirozol, luteolin, apigenin ve verbascosiddir [16]. Tarihsel

olarak, zeytin yaprağı ateş, hipertansiyon, kardiovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve sıtma gibi diğer hastalıklara karşı mücadele için halk ilacı olarak kullanılmıştır [17]. Ayrıca zeytin yaprakları sağlıklı ve güvenilir bir antioksidan kaynağı olduğundan gıda ürünlerinin duyuusal ve besinsel özelliklerindeki raf ömrünü de uzatma özelliğine sahiptir [18].

1.1.1.1 *Olea europaea* L. cv. Domat

Orijin: Manisa / Akhisar

Yöre: Ege Bölgesi

Çeşit Özellikleri: Ülkemizin en önemli zeytin çeşitlerinden birisidir. Oldukça kuvvetli gelişim göstermektedirler. Ayrıca soğuk havalara dayanıklılığı oldukça fazladır. Yaprak şekli uzun ve eliptik yapıdadır (Şekil 1.1). Meyvesi orta irilikte olup et miktarı %89 civarındadır. Yağ oranı ise %23 olup danesi iri ve etli bir zeytindir. Genel olarak salamuralık zeytin olarak değerlendirilir [19].



Şekil 1.1: *Olea europaea* L. cv. Domat [19]

1.1.1.2 *Olea europaea* L. cv. Uslu

Orijin: Manisa / Akhisar

Yöre: Ege Bölgesi

Çeşit Özellikleri: Verimli ve oldukça etli meyvelere sahip olan bu zeytin çeşidi ülkemizin en önemli zeytin çeşitlerinden birisidir. Sulanan bölgelerde çok kuvvetli şekilde büyüyen bu çeşit zeytin çeşitleri arasında en hassas çeşit olarak da bilinmektedir. Bundan dolayı soğuk bölgelerde kuvvetli soğuklar gelmeden hasadın gerçekleştirilmesi gerekir. Yaprak şekli uzun ve eliptik yapıdadır (Şekil 1.2) [19].



Şekil 1.2: *Olea europaea* L. cv. Uslu [19]

1.1.1.3 *Olea europaea* L. cv. Gemlik

Orijin: Bursa / Gemlik

Yöre: Marmara Bölgesi

Çeşit Özellikleri: Trilye, kaplık, kıvrıcık gibi sinonimleri de bulunmaktadır. Ağacı orta kuvvette gelişmekte ve yuvarlak-yaygan bir görünüme sahiptir. Meyveleri orta iriliktir. Yağ oranı yüksek (%29) olup sofralık kalite dışı kalan ürünler yağlık olarak değerlendirilmektedir. Yaprak şekli oval ve hafif simetrik yapıdadır (Şekil 1.3) [19].



Şekil 1.3: *Olea europaea* L. cv. Gemlik [19]

1.1.1.4 *Olea europaea* L. cv. Kiraz

Orijin: Manisa / Akhisar

Yöre: Manisa Bölgesi

Çeşit Özellikleri: Büyük ağaç oluşturan bu çeşidin meyveleri olgunluk döneminde kiraza benzediğinden bu isimle anılmaktadır. Yağlık ve sofralık olarak değerlendirilmektedir. Kuvvetli periodisite göstermektedir. Verticillium solgunluğu hastalığına duyarlı olduğu belirtilmiştir. Yaprak şekli uzun ve uzun eliptik yapıdadır(Şekil 1.4) [19].



Şekil 1.4: *Olea europaea* L. cv. Kiraz [19]

1.2 Zeytin Yaprakının Yapısı ve Özellikleri

Zeytin yaprakları bünyesinde uçucu yağlar, organik asitler, tanen ve rezin ihtiva ederler. Bununla birlikte birçok fenolik bileşik hem zeytinde hem de zeytin yaprağında ortak olarak bulunur. Bu bileşiklerden en önemlileri hidroksitirozol, tirozol, rutin, verbaskozit, lutein-7-glikozit ve oleuropeindir [20]. Oleuropein zeytinin bütün kısımlarında bulunmasına rağmen en fazla bulunduğu yer zeytin yaprağıdır.

Long ve arkadaşları Güney Afrika bölgesine ait zeytin yaprakları ile yaptıkları bir çalışmada zeytin yaprağındaki antioksidan, antimikrobiyal, hipolipidemik ve özellikle hipotansif faaliyetlerden sorumlu ana aktif bileşiğin oleuropein adı verilen sekoiridoid olduğunu belirlemişlerdir [22]. 2022 yılında yapılan bir başka çalışmada ise zeytinyağına zeytin yaprağı ilavesinin antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve en yüksek konsantrasyonda fenolik ve tokoferol bileşikleri ve %10 zeytin yaprağı ile ekstrakte edilen natürel sızma zeytinyağında elde edildiği tespit edilmiştir [23].

1.3 Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulundurulur ve bundan dolayı çok kararsız ve reaktif moleküllerdir. Kararsız ve reaktif olmaları nedeniyle çevrelerinde bulunan atom ve moleküllere saldırırlar [2]. Bu moleküllere “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROT)” denilmektedir [24].

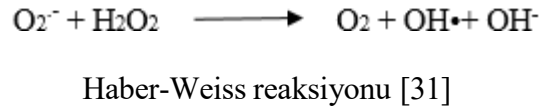
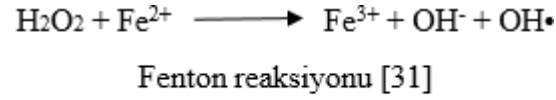
Serbest radikaller kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, göz hastalıkları, bağışıklık sistemi hastalıkları ve yaşlanmayı çabuklaştırma gibi rahatsızlıklara yol açmaktadır [25]. Organizmada bulunan organik bileşiklerle reaksiyona girebilir ve yapısal değişikliklere yol açabilirler. Bu değişiklikler sonucunda da oksidasyon, kromozom kırılmaları, mutasyonlar ve ölümler meydana gelebilir [26]. Canlı organizmadaki bazı ROT çeşitleri Tablo 1.1’te gösterilmiştir [27].

Tablo 1.1: Canlı organizmadaki önemli ROT çeşitleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar	Singlet Oksijen
Süperoksit radikali (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	1O_2
Hidroksil radikali (OH^-)	Lipid hidroperoksit(LOOH)	
Alkoksi radikali (LO^-)	Hipoklorik asit (HCl)	
Peroksil radikali (LOO^-)		

1.3.1 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

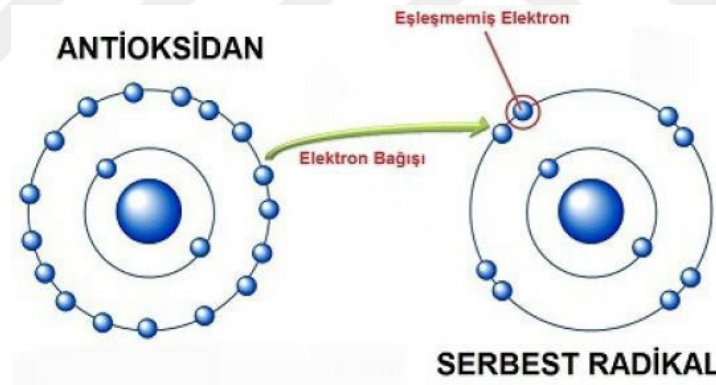
Oksijen atomuna iki elektron eklenmesiyle ya da süperoksite bir elektron eklenmesiyle oluşan hidrojen peroksit, eşlenmemiş elektron içermediğinden gerçek bir radikal değildir [28]. Radikal olmamasına rağmen serbest radikal oluşturma açısından tehlikeli olan hidrojen peroksit, Ferro demir (Fe^{+2}), hidrojen peroksit ve fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline dönüşerek bir seri radikal reaksiyonuna yol açarlar [29]. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süper oksit (O_2^-) ile reaksiyona girerek çok güçlü bir radikal olan hidroksil (OH^-) radikalini oluşturabilir ve bu reaksiyona Haber-Weiss ismi verilir. Hidroksil (OH^-) radikali aşırı reaktif olduğundan dolayı hücresel komponentlerle hızlıca reaksiyona girebilir ve bu yüzden de çok toksik bir etki gösterebilir [30].



1.4 Antioksidanlar

ROT' ların oluşumunu engellemek ve bunların oluşturdukları hasarların önüne geçmek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalara kısaca antioksidanlar adı verilmektedir [32]. Vücudumuzda serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidatif strese karşı etkili olan antioksidanlar vücut tarafından salgılanırlar ya da dışarıdan besin yoluyla takviye olarak alınmaktadır. Hem endojen antioksidanlar hem de eksojen antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak ve serbest radikallerin toksik etkilerine karşı savunma sistemi olarak görev yaparlar [33].

Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma Şekil 1.5' de gösterilmiştir [34].

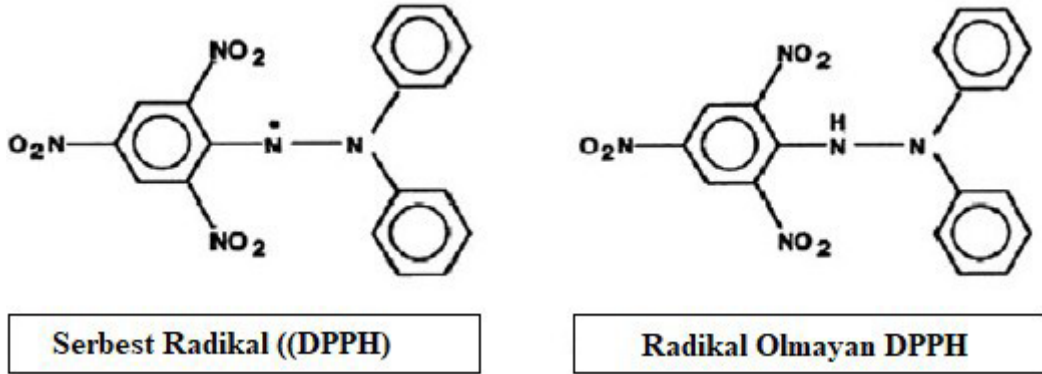


Şekil 1.5: Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma

1.4.1 DPPH

DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme kapasitesi yöntemi bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [35]. M. Blois, DPPH kullanarak antioksidan aktivitenin spektroskopik tayininin temelinin sunarken, Brand-Williams ve arkadaşları DPPH ve çeşitli antioksidanlar için reaksiyon

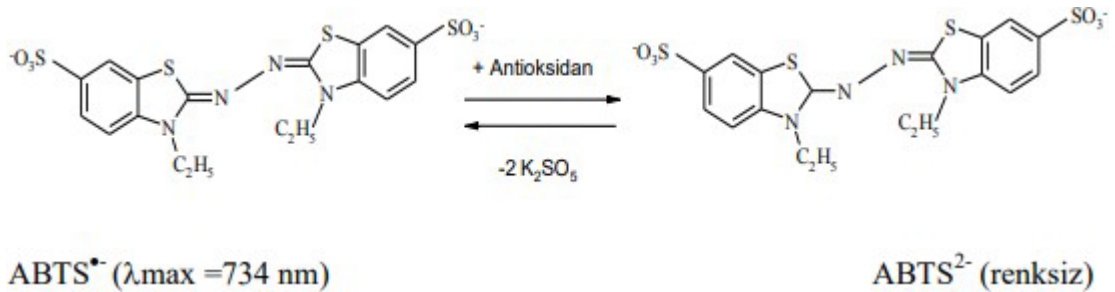
sitokiyometrisini belirlemişlerdir [36]. DPPH, bir bütün olarak molekül üzerindeki yedek elektronun delokalizasyonu sayesinde kararlı bir serbest radikal olarak karakterize edilir (Şekil 1.6). Böylece moleküller, diğer birçok serbest radikal gibi dimerize olmazlar [37].



Şekil 1.6: DPPH radikali ve kararlı formu [37]

1.4.2 ABTS⁺

2,2-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}), radikal katyon bazlı analizler, Scopus atıf oranlarına göre 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal bazlı analizlerle birlikte en çok kullanılan antioksidan kapasite analizleri arasındadır [38]. Bu yöntemde mavi – yeşil renkli olan radikalın giderilmesi sonucunda meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esastır. 1999 yılında Re ve arkadaşları tarafından tekrar modifiye edilen bu yöntemde ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS⁺ oluşmaktadır (Şekil 1.7) [39].



Şekil 1.7: ABTS^{•+}'nin persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikalinin antioksidan ile etkileşimi [40]

1.5 Hücre Kültürü ve Sitotoksiste

Ökaryotik organizmaların hücrelerinin özel olarak tasarlanmış kaplarda laboratuvar ortamında sıcaklık, nem ve besin maddeleri gibi çevre koşullarını kontrol ederek kontaminasyondan korunarak yaşatılması hücre kültürü olarak tanımlanmaktadır [41]. Hücreler, kültürden önce doğrudan dokudan çıkarılabilir, enzimatik veya mekanik yollarla ayrıştırılabilir ya da daha önce oluşturulmuş bir hücre hattından veya hücre suşundan türetilir [42]. Hücre kültürü, hücrelerin fizyolojisi ve biyokimyasının incelenmesi, hücrelerin ilaç, toksin ve biyomalzemeler gibi test edilen maddelere tepkisinin araştırılması gibi çeşitli araştırmalar için temel bir laboratuvar tekniği haline gelmiştir [43].

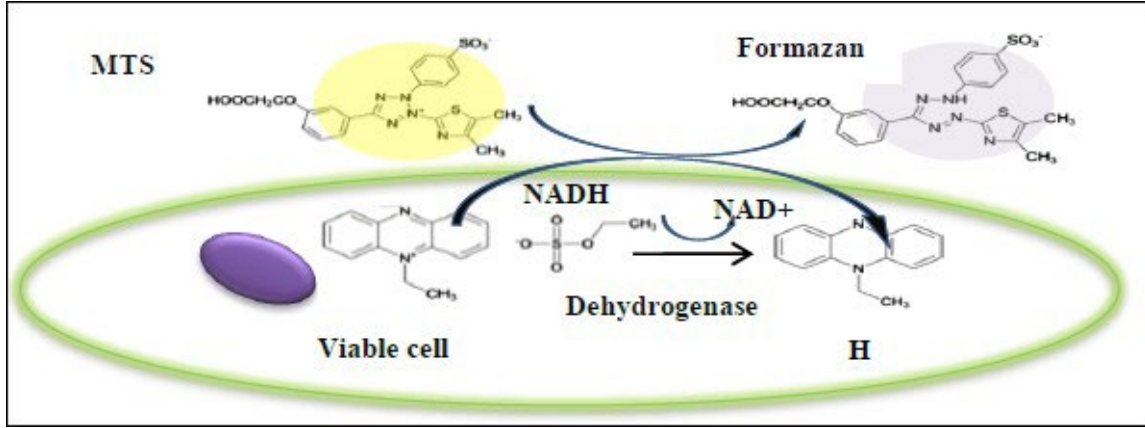
In vitro hücre kültürü sistemlerindeki bir madde hücrelerin morfolojisinde bir değişiklik meydana getiriyorsa, onların büyüme hızını olumsuz yönde etkiliyor ya da ölmelerine neden oluyorsa sitotoksik olarak nitelendirilmektedir [44]. *In vitro* sitotoksiste deneyleri ilaç taramasının yanı sıra etnobotanik olarak kullanılan doğal maddelerin sitotoksitesinin belirlenmesi için sık olarak faydalanılmaktadır. Bu testlerin avantajları hızlı, ucuz, hayvansal deneyleri gerektirmemesi ve çok sayıda numunenin test edilebilmesidir [45].

1.5.1 MTS

5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3-(4-sülfofenil) tetrazolyum yapısında bir tetrazolyum tuzu (MTS) ile yapılan test, canlı hücre sayısının uygun, yaygın olarak kullanılan ve uygun maliyetli dolaylı bir ölçüsü olduğu kanıtlanmıştır [46, 47] MTS testinin prensibi proliferasyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile MTS'yi koyu pembe kırmızı formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır (Şekil 1.8) [47].

MTS testinin avantajları şunlardır;

- ✓ Kolay uygulanabilir.
- ✓ Ucuzdur.
- ✓ Doğru, hızlı ve kesin sonuçlar verir [48].



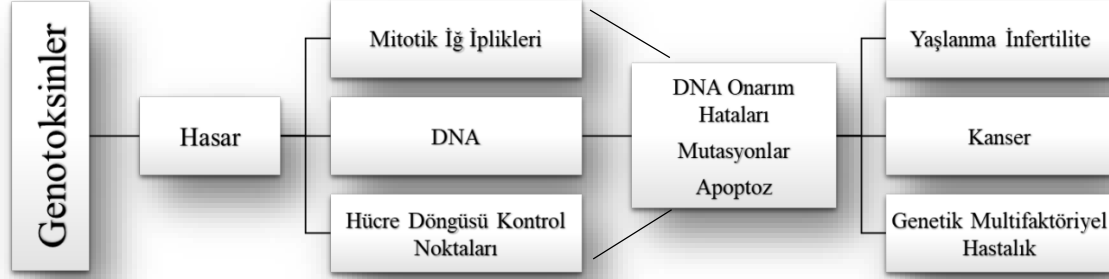
Şekil 1.8: MTS'nin etki mekanizması. Canlı hücrelerde NADH'den bir ara elektron alıcısı tarafından elde edilen MTS solüsyonunda Formazan'a elektron geçişini (indirgeme) gösterir [48]

1.6 Genotoksik Aktivite

DNA'nın yapısının korunması kalıtsal bilginin nesiller boyu sağlıklı bir şekilde aktarılmasında son derece önemlidir. Bu yapının korunmasında baz grupları üzerindeki polar gruplar etkin rol oynamaktadır. DNA'yı ise bu gruplar arasında bulunun hidrojen bağları oluşturur. Bu gruplar üzerindeki kimyasal değişiklikler DNA'nın yanlış eşlenmesine, eşlenmenin sonlandırılmasına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine neden olmaktadır [49]. Oluşan bu hasarlarla başa çıkmak için hücre iki strateji geliştirmiştir. Bunlardan birincisi DNA hasarı onarılır ya da tolere edilir. İkincisi ise DNA hasarı bulunan hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Onarılmamış DNA hasarı ise genellikle kromozom hasarı ve gen mutasyonları ile sonuçlanmaktadır [50].

DNA kırılmaları, gen mutasyonları, DNA yapısındaki kromozomal anormallikler gibi hasarlara genel olarak genotoksisite denir. Genotoksik etki ise DNA'nın eşlenmesinde rol oynayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasara ya da bazı değişimlere yol açması olarak tanımlanmaktadır [51, 52].

Genotoksinlerin hücreler üzerindeki etkileri Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



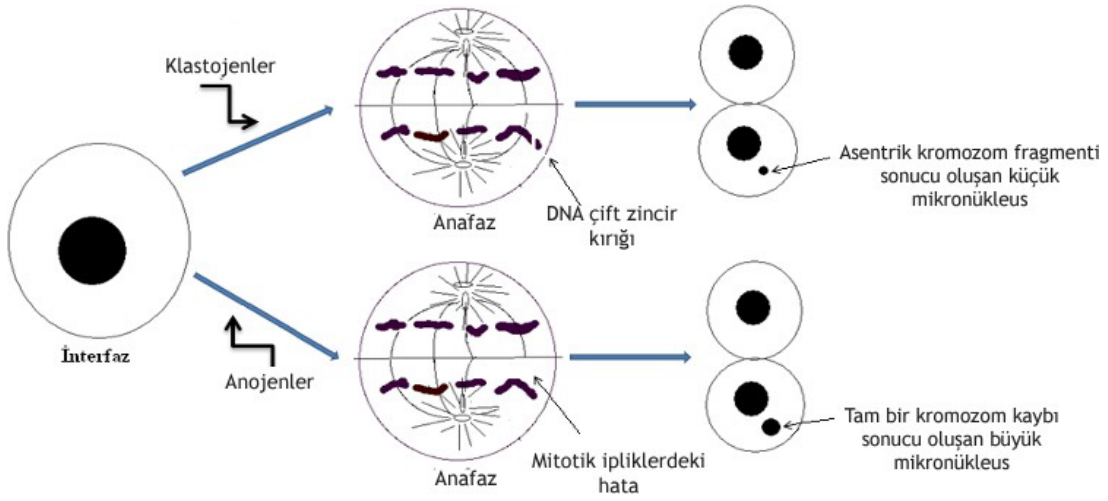
Şekil 1.9:Hücreler üzerinde genotoksinlerin etkileri [53]

1.6.1 Genetoksisite Belirlemede Kullanılan Testler

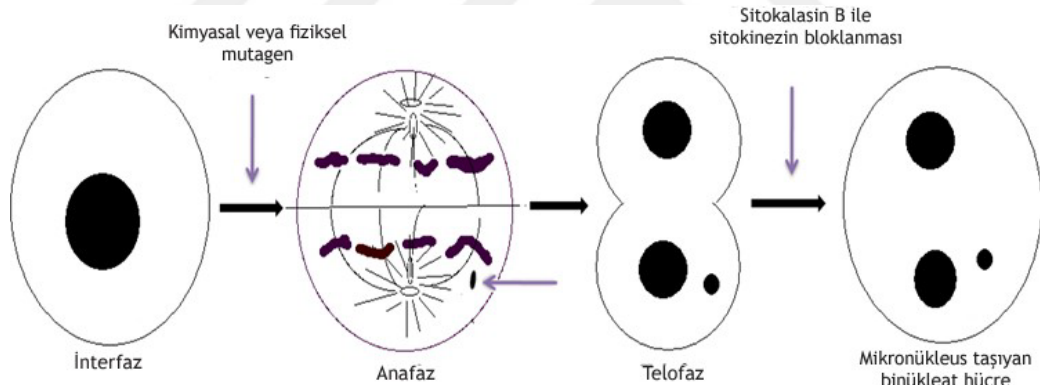
Genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, comet testi, kromozom anormallikleri (KA) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, mikronükleus (MN) ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) testleridir [54].

1.6.1.1 Mikronükleus Testi (MN)

Mikronükleus testi ilk olarak kimyasalların neden olduğu yapısal kromozom hasarının tespiti için geliştirilmiştir. Hücrelerin mitoz bölünmeleri esnasında ortaya çıkan mikronükleuslar çekirdeğe dâhil olmayan tam kromozom ya da kromozom parçalarından köken alan yapılar olarak tanımlanmaktadır. Bu yapıların oluşma nedenleri hücre döngüsünü kontrol eden enzimlerin eksikliğinden, mitotik iğdeki hasarlardan ya da kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. Anöploidiyi uyaran maddeler, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açtığından; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturduğundan dolayı mikronükleus oluşumuna neden olmaktadır. (Şekil 1.10 - Şekil 1.11) Bundan dolayı mikronükleus miktarında artış olması vücut hücrelerindeki genetik hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [55, 56, 57].



Şekil 1.10: Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler [58]



Şekil 1.11: Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu [58]

1.6.1.2 Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Drosophila melanogaster üzerinde geliştirilen somatik genotoksisite deneyleri arasında, somatik mutasyon rekombinasyon testi (SMART); nokta mutasyonları, delesyonlar, bazı kromozomal sapma türleri, mitotik rekombinasyonlar ve gen dönüşümleri gibi geniş bir genetik değişiklik yelpazesinin saptanmasını sağlar [59]. Bu test, yetişkin sineğin kanatlarında fenotipik olarak ifade edilen embriyonik gelişim sırasında heterozigotluk kaybından kaynaklanan mutasyonların ve rekombinasyonların saptanmasına dayanır [60,

61].Test protokolünün esnekliği ve çeşitli ajanlarla akut, kronik veya kombine tedavi olasılığı, bu testi çeşitli biyolojik olarak aktif mutajenlerin, promutajenlerin ve antimutajenlerin test edilmesinde paha biçilmez kılmaktadır. Bu test, dünya çapında kullanılan bitkisel infüzyonların ve farklı baharatların genotoksik ve antigenotoksik etkilerini test etmek için kullanılmıştır [62]. *Drosophila*, kanserleri kontrol eden insan genlerinin %68'inin bir ortolojisini sunar bu da *Drosophila* hakkındaki denemeleri insanlar üzerinde tahminlerde güvenilir ve kullanılabilir kılmaktadır [63, 64].

1.7 Literatür Özeti

Clewell ve arkadaşları (2016) tarafından uluslararası kabul görmüş protokollere uygun olarak zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) yapraklarından elde edilen oleuropein içeriği yüksek olan özellikle kadınlara tavsiye edilen Bonolive 'nin genotoksitesini ve güvenli doz miktarını araştırmak için sıçanlarda *in vivo* mikronükleus ve *in vitro* kromozom aberasyon testleri ile bir dizi genetik toksikoloji çalışması yapılmıştır. 90 gün süren çalışma sonucunda Bonolive'nin limit doza kadar (2 g/kg (canlı ağırlık/gün)) herhangi bir mutajenik ya da genotoksik etki göstermediği ayrıca zeytin, zeytinyağının ve zeytin ürünlerinin insanlarda da güvenle tüketebileceği rapor edilmiştir [65].

Anter ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarındaki oleuropein ve luteolin'in miktarları belirlenmiş ve genotoksik / antigenotoksik, sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. *Drosophila melanogaster*'in kanat imajinal disklerinde somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), farklı oleuropein ve luteolin konsatrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraktlar / fenoller için tespit edilen H₂O₂'ye karşı antigenotoksik aktivite ile birlikte, DNA koruması açısından oleuropein ve luteolin'in güvenliğini ortaya çıkarmışlardır. Oleuropein ve luteolin, farklı IC₅₀ (sırasıyla 10 l / ml, 170 M ve 40 M) ile doza bağlı bir sitotoksik etki göstermiştir. DNA fragmantasyon modelleri ve akridin turuncusu ve etidyum bromür ile hücre boyaması, oleuropein ve luteolin'in sitotoksik etkisine yönelik mekanizmanın, sitoplazmik ve nükleer değişikliklerle apoptotik yol olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, insan kanserinin önlenmesinde nutrasötik olarak önerilen zeytin yaprağı ekstratlarının faydalı etkisinin altında yatan etki mekanizmasını açıklamaya yardımcı olabileceğini ortaya çıkarmıştır [66].

Topalović ve arkadaşları (2019) standartlaştırılmış bir kuru zeytin yaprağı ekstresinin, insan tam kan hücrelerinde 17 β -estradiol ve dietilstilbestrol tarafından indüklenen DNA hasarı üzerindeki antigenotoksik potansiyelini, comet testini kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda zeytin yaprağı ekstresinin antigenotoksik etki gösterdiğini ve kuru zeytin yaprağı ekstraktının koruyucu potansiyelinin, temizleme aktivitesinin sinerjistik etkisinden ve hücrelerin antioksidan kapasitesini artırmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir [67].

Verschaeve ve arkadaşları (2020) Tunus lokasyonuna ait Chetoui (North), Meski (North), Oueslati (Center), Jarboui (Sahel) isimli dört zeytin kültüvarı yaprak ekstraktlarının comet testlerini kullanarak sulu ekstraktlarının *in vitro* toksisitesini, genotoksitesini ve antigenotoksitesini araştırmışlardır. Sonuç olarak ekstraktların hiç birinin toksik ve genotoksik olmadığı, ancak Meski'de (Tunus'un Kuzeyi) elde edilen ekstrakt için bazı şüpheler olduğunu yalnızca Vitotox testine dayanarak, özütlerin hiçbirinin antigenotoksik (veya kojenotoksik) özelliklere sahip olmadığı tespit edilmiştir [68].

Turkez ve arkadaşları (2012) zeytin yaprağı ekstresinin sıçanlarda permetrinin indüklediği genotoksik ve oksidatif hasarı nasıl etkilediğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Kullanılan hayvanları genel olarak dört (A, B, C ve D) deneysel gruba ayırmışlardır. Grup A sıçanları, kontrol hayvanları olarak kullanılmıştır ve intraperitoneal olarak damıtılmış su, Grup B ve C sıçanlarına sırasıyla intraperitoneal permetrin (60 mg kg⁻¹ canlı ağırlık) ve zeytin yaprağı ekstresi (500 mg kg⁻¹ canlı ağırlık) enjeksiyonları, Grup D sıçanları permetrin (60 mg kg⁻¹ canlı ağırlık) artı zeytin yaprağı ekstresi (500 mg kg⁻¹ canlı ağırlık) enjeksiyonları 21 gün boyunca uygulanmıştır. Genotoksik hasar, mikronükleus ve kromozomal aberasyon deneyleri ile değerlendirilmiştir ve sonuç olarak zeytin yaprağı özütünün yararlı etkilerle sahip olduğu ve permetrin toksisitesini antagonize edebildiği sonucuna varılmıştır [69].

Cabarkapa ve arkadaşları (2014) kuru zeytin yaprağı ekstresinin insan lökositlerinde adrenalin kaynaklı DNA hasarına karşı etkisini comet testi kullanarak araştırmışlardır. 6 sağlıklı denekten alınan periferik kan lökositleri, iki farklı protokol, ön tedavi ve tedavi sonrası olmak üzere 37 ° C'de 30 dakika süreyle üç nihai kuru zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu (0.125, 0.5 ve 1 mg / mL) ile *in vitro* olarak uygulanmıştır ve kuru zeytin yaprağı ekstresinin adrenalin tarafından indüklenen DNA lezyonlarının oluşumunu hafifletme kabiliyetinden değerlendirilmiştir. Yalnızca adrenaline maruz kalan hücrelere

kıyasla, kuru zeytin yaprağı ekstresinin, her üç konsantrasyonda ve her iki deney protokolünde DNA hasarında önemli bir azalma ($P < 0.001$) olduğunu tespit etmişlerdir. Pearson korelasyon analizi, kuru zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu ile lökosit DNA hasarı arasında anlamlı bir pozitif ilişki ortaya çıkarmıştır ($P < 0.05$) [15].

Cabarkapa ve arkadaşları (2017) CaNa_2 EDTA şelasyon tedavisinden önce ve sonra, kurşuna (Pb) mesleki olarak maruz kalan 19 işçinin periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı seviyeleri *in vitro* olarak araştırmışlardır. Kuru zeytin yapraklarının 1 mg / mL konsantrasyonlarda belirgin radikal temizleme aktivitesi gösterdiğini ve 0.125 - 1 mg / mL konsantrasyonlarda kendi başına kullanıldığında hiçbir genotoksisite göstermediğini ortaya çıkarmışlardır. Ancak hasara uğramış kan lenfositlerinde tedavi öncesi belirlenmiş konsantrasyonlarda kullanıldığında antioksidan yerine prooksidan olarak davrandığı ve DNA hasarını arttırdığı tespit edilmiştir [5].

Topalović ve arkadaşları (2015) insan periferik kan lökositlerinde L-tiroksinin genotoksisitesini değerlendirmek ve standartlaştırılmış oleuropein bakımından zengin kuru zeytin yaprağı ekstresinin hidrojen peroksit ve L-tiroksin kaynaklı DNA hasarına karşı antioksidan ve antijenotoksik potansiyelini comet testini kullanarak araştırmışlardır. Ekstrenin çeşitli konsantrasyonları, iki farklı deney koşulları altında, ön işlem ve son işlem altında, her iki DNA hasar indükleyicisi ile test edilmiş ve sonuçlar, L-tiroksinin genotoksik etki gösterdiğini ve kuru zeytin yaprağı ekstresinin tiroksin kaynaklı genotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır [15].

Justyna Makowska-Wazs ve arkadaşları (2016) Portekiz'de hasat edilen yabani zeytin yapraklarında bulunan fenolik asitler, flavonoidler, oleuropein, yağ asitleri profili ve uçucu yağ bileşikleri gibi seçilmiş fitokimyasalların kalitatif ve kantitatif bir değerlendirmesini sağlamayı ve bunların antioksidan ve insan melanomu HTB-140 ve WM793, prostat kanseri DU-145 ve PC-3, hepatoselüler karsinom Hep G2 hücre hatlarının yanı sıra normal insan derisi fibroblastları BJ ve prostat epitel hücreleri PNT2'ye karşı sitotoksik potansiyelini araştırmışlardır. Zeytin yapraklarında gallik asit, protokateşik, *p*-hidroksibenzoik, vanillik asitler, apigenin 7-*O*-glukozit, luteolin 7-*O*-glukozit ve rutin tespit edilmiştir. Ayrıca zeytin yaprağı metanol ekstraktının DU-145 ve PC-3 hücre hatları üzerinde önemli, seçici bir sitotoksik etki uyguladığı tespit edilmiştir [70].

Amira Zaïri ve arkadaşları (2020) iki çeşit *Olea europaea*'dan elde edilen sulu yaprak ekstraktlarının fitokimyasal bileşimi, antioksidan aktivitesi, sitotoksik potansiyeli ve allelopatik potansiyeli araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Test edilen bitkilerin bileşenlerini belirlemek ve ölçmek için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için spektrofotometrik yöntemleri kullanmışlardır. Sitotoksik potansiyel murin oligodendrositleri (158N) kullanılarak araştırılırken, allelopatik aktivite için çimlenme tohumları testi kullanılmıştır. HPLC analizi, her iki ekstrede de 10 fenolik bileşiğin varlığını göstermiş ve Chemlali çeşidinin en yüksek antioksidan ve allelopatik aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca sitotoksikite etkisi ile ilgili olarak, işlenmemiş hücrelere kıyasla her iki ekstrede de hücre canlılığında önemli bir artış gözlemlendiği vurgulanmıştır [71].

Jessica Ruzzolini ve arkadaşları (2018) Oleuropein'nin melanomu tedavi etmek için kullanılan geleneksel ilaçların sitotoksitesini güçlendirip güçlendiremeyeceğini doğrulamış ve potansiyel olarak yeni bir terapötik strateji ortaya koymuşlardır. Oleuropeinin sitotoksik etkisini tek başına veya kemoterapötiklerle kombinasyon halinde A375 insan melanom hücreleri üzerinde test etmişlerdir. Oleuropeinin 500 M'lik bir dozda apoptozu uyarabildiğini, 250 M'lik toksik olmayan bir dozda ise hücre proliferasyonunu etkilediğini ve pAKT/pS6 yolunun aşağı regülasyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir [72].

Jose Gustavo De la Ossa (2019) bu *in vitro* çalışmada Tuscan *Olea europaea* ekstraktlarının endotel hücreleri ROS'lardan koruyup korumadığı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, H₂O₂ uygulanmasından sonra hücre canlılığı ve ROS ölçümü yapılmış ve sonuç olarak zeytin yapraklarının ROS'a karşı koruyucu rapor edilmiştir. [13].

Mădălina Borugă ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada LC-MS ile zeytin yaprağı etanolik ekstraktının bileşimi belirlenmiş, A375 insan melanom hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksikite, MTT testi (canlı hücre sayısı), Annexin V-FITC vasıtasıyla belirlemişlerdir. Ekstrakt, aralarında luteolin ve rutin baskın bileşikler ve önemli bir ursolik asit içeriğine sahip triterpenik asitler olduğu bir dizi polifenol içerdiği tespit edilmiştir. Test edilen en yüksek konsantrasyonda, 100 µg/mL'de, insan melanom hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki olduğu, büyüyen kılcal damarların gelişimini etkilediği,

daralmış kılcal damarları indüklediği, ancak HET-CAM üzerinde hiçbir toksisite belirtisi kaydedilmediği belirtilmiştir [73].

Gabriella Tamasi ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada, zeytin meyveleri, yağlar ve prinalarda seçilen biyoaktif bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Tüm numunelerde toplam polifenol içeriği ve antioksidan aktivite analiz edilmiştir, Radikal (DPPH) süpürme potansiyeli fotometrik ve EPR yöntemleri ile analiz edilmiş, Vis/EPR sinyal oranı meyveler için sırasıyla $1,05 \pm 0,45$ ve $1,66 \pm 0,39$ olarak belirtilmiştir. En yüksek konsantrasyonlarda (%5) seçilen ekstraktlar fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki göstermişlerdir [74].

Majumdera ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarının *in vitro* sitotoksik aktivitesi, fare metastatik melanom B16F10 hücre hatlarına karşı değerlendirmişlerdir. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri, sırasıyla DPPH radikal süpürme aktivitesi ve biyoaktif bileşiklerin varlığı için sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Sulu zeytin yaprağı ekstraktlarının, ERK 1/2 ve p53 aracılı yol yoluyla B16F10 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini, zeytin yaprağı ekstraktlarının metabolik profili, özellikle oleuropein aglikon, apigenin, luteolin, tirosol, oleuropein ve hidroksitirosol olmak üzere 23 metabolit içerdiğini göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarında bulunan oleuropein, melanom B16F10 hücre dizilerinde ERK1/2 reseptörünün aktivasyonunun bozulmasından sorumlu olabildiğini ve sonuç olarak bu bulguların, melanom cilt kanserinde oleuropeinin antikanser aktivitesini belirlemek için moleküler düzeyde yapı ve işlevin daha fazla araştırılması için yol açtığını tespit etmişlerdir [10].

Bouallagui ve arkadaşları (2019), Chemlali çeşidinden elde edilen çevre dostu zeytin yaprağı ekstraktlarının fitokimyasal profilini ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Zeytin yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşimi, antioksidan aktivitesi ve MCF-7 ve HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Oleuropeinin 16.9 mg/ml'lik bir konsantrasyonda bulunup, tespit edilen başlıca fenolik bileşik olduğu belirtilmiştir. İncelenen ekstraktların antioksidan potansiyeli, DPPH ve ABTS⁺ yöntemleriyle ortaya konmuş ve 23.7 ile 46.5 mM Trolox eşdeğerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir [75].

1.8 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada *Olea europaea* türüne ait Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin yaprak kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının fitokimyasal özellikleri, antioksidan kapasiteleri, hidrojen peroksit kaynaklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik/antigenotoksik etkiler, in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Ekstraktların fitokimyasal özellikleri LC-MS/MS cihazı ile belirlenmiştir. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri in vitro ve in vivo olarak 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit (ABTS+) yöntemleri ile sitotoksik aktivite MTS testi, antigenotoksik aktivite mikronükleus, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada, *Olea europaea* L. kültürlerinin ekstraktlarının antioksidan kapasitesi ve periferik lenfositlerde H₂O₂'in indüklemiş olduğu mutajenik etkiyi ne kadar baskıladığı belirlenmiştir. Bu nedenle, bu araştırma kapsamında elde edilen bulguların literatüre sağlayacağı önemli katkıların yanı sıra, oksidatif DNA hasarlarına *Olea europaea* L. bitkisinden faydalanılarak sentezlenebilecek potansiyel farmakolojik ürünlerin tasarımı için önemli bir kaynak oluşturacağına düşünmekteyiz.

2. MATERYAL - METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki Örneklerinin Toplanması

Zeytin yaprakları dört farklı kültivar olacak şekilde (Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz) Manisa / Akhisar bölgesinden budama mevsiminde özenle toplanmıştır. Toplanan örnekler karanlık ortamda, hava akımının olduğu steril bir laboratuvarında kurutulmuş ve deneylerde kullanılmaya kadar uygun koşullarda saklanmıştır.

2.2 Metot

2.2.1 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Kurutulmuş ve öğütülmüş yapraklar 5 g tartılarak 50 ml su, etanol ve metanol ekstraktları ile ayrı ayrı ekstrakte edilerek ve 24 saat çalkalayıcıda tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar süzülür ve işlem 3 kez tekrarlanarak elde edilen ekstraktlar evaporatörde buharlaştırılarak miktarları belirlenmiştir [6].

2.2.2 LC-MS/MS ile Fenolik Madde Dağılımı Analizi

LC-MS/MS cihazı ile fenolik madde tayini için Sifaoui ve arkadaşları ekstraksiyon metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Her örnekten ayrı ayrı 0,25 g alınarak 20 mL çözücü eklenmiştir (%12,7 su, %14,8 etanol ve %72,5 metanol). Daha sonra 55°C'de 1 saat boyunca sabit bir karıştırma hızında (300 rpm) çalkalayıcıda bırakılmıştır. Tüplerin etrafı ekstraksiyon sırasında hafif bozulmayı önlemek için alüminyum folyoya sarılarak +4°C' de bir gece bekletilmiştir. Elde edilen ekstraktlar evaporatörde buharlaştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir [76].

Fenolik bileşiklerin analizinde LC (Agilent 1260 Infinity)-MS/MS (Agilent 6420 Triple Quadropole LC-MS/MS), kolon olarak ise C18 ODS kolon (25 × 4.6 mm × 5 µm) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi: 2 µL ve akış hızı 0.4 mL/dk olarak ayarlandı. LC-MS/MS şartı olarak da mobil faz %0.1 formik asit içeren su (çözelti A); metanol (çözelti B) olarak hazırlanmıştır.

2.2.3 Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması

Olea europaea kültivarlarının antioksidan kapasiteleri, *in vitro* radikal süpürme aktivitesi yöntemine dayalı olarak DPPH ve ABTS⁺ testleri ile belirlenmiştir.

2.2.3.1 DPPH

Zeytin kùltivarlarının antioksidan kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal yakalama aktivitesi kullanılarak belirlendi. 0.024 g DPPH tartıldı ve bir balon joje içerisinde MeOH ile çözüldü. 0,05 mL bitki ekstresi (0,1–100 mg/L) [77], 2,5 mL DPPH ve 2,5 mL MeOH bir test tüpüne eklendi ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Spektrofotometrik ölçümler 517 nm'de yapılmış ve numunelerin radikal süpürme aktivitesi belirlenmiştir. [78].

2.2.3.2 ABTS⁺

Zeytin kùltivarlarının ABTS radikal temizleme aktivitesi, Re ve arkadaşlarının yöntemi ile yapılmıştır. ABTS⁺ radikal çözeltisi, eşit hacimlerde ABTS⁺ tuzu ve amonyum persülfat kullanılarak hazırlanmış ve gece boyunca karanlıkta tutulmuştur. Numune analizi için, 2,95 mL ABTS⁺ çözeltisi ve 0,05 mL bitki ekstraktı (0,1- 100 mg/L) [77] 3 mL'lik bir küvete eklenmiş ve ölçümler 734 nm'de UV-Görünür bir spektrofotometre (Perkin Elmer lambda-35 UV-Görünür bir spektrofotometre) ile yapılmıştır. Ölçümler her ekstrakt için üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir [78].

2.2.3.3 *In vivo* Antioksidan Etkilerin Belirlenmesi

Bu test için standart *Drosophila melanogaster* kùltür şartları ve besiyeri ortamı sağlanmıştır. Besiyeri; 500 mL distile su içerisinde 43 g şeker, 9 g agar, 90 g irmik, 20 g maya, 4 damla mikostatin ve 5 mL propiyonik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. Önceden sterilizasyonu sağlanmış şişelere besiyeri 20'şer gram olacak şekilde eşit miktarda dağıtılmıştır [79].

Bitki ekstraktlarının *in vivo* antioksidan aktivitesini değerlendirmek için 50 yetişkin Oregon R (yabanıl tip) *D. melanogaster* suşu, bitki ekstraktları (50 mg/L), H₂O₂ (6.5 µg /mL) ve su, metanol ve etanol çözücü kontrolleri (%5, v/v) içeren besiyerleri ile muamele edilmiştir. Negatif kontrol grubuna hiçbir eklenti yapılmamıştır. Daha sonra kùltürler 22 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Her bir sinek grubu, 100 µl buz soğukluğunda 0.1 M fosfat tamponunda (pH: 7.0) homojenleştirilmiş ve 4000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısımları kullanılmak üzere ayrılmıştır [80].

2.2.4 Hücre Kültürü İşlemleri

2.2.4.1 Malzemelerin Sterilizasyonu

Pipetler, pipet uçları, beherler ve falcon tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavlanırken, hücre kültür kabini ve çalışma ortamı %70 etanol ve UV lambası ile sterilize edilmiştir.

2.2.4.2 Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılmak üzere 500 mL RPMI 1640 besiyerine lenfosit hücre proliferasyonu için büyüme faktörleri içeren 50 ml fetal sığır serumu (FBS) eklendi. Olası kontaminasyonu önlemek için besiyerine 2,5 ml penisilin/streptomisin solüsyonu), lenfosit hücre bölünmesini desteklemek için ortama 5 ml fitohemaglutinin solüsyonu (1 mg/ml) ilave edildi ve köpüklenmeyi önlemek için şişe hafifçe çalkalandı. Hazırlanan besiyeri kullanılmaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

2.2.4.3 Kandan Lenfosit İzalasyonu

Bireylerden toplanan kan EDTA'lı tüplere aktarılmıştır. Çalışma kapsamında üç erkekten kan alınmıştır. 7 ml Ficoll-Paque'a 3 ml EDTA'lı kan karıştırmayı önlemek için falcon tüpünün kenarından yavaşça ilave edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 1500 rpm hızla 30 dakika santrifüj edildi ve santrifüjleme sonucu oluşan tabakaların 2. tabakasında toplanan lenfositler pipet ile temiz bir test tüpüne aktarılmıştır. (Şekil 2.1) Daha sonra 10 ml izotonik fizyolojik çözelti ilave edilerek tekrar 1500 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemenin ardından süpernatant atıldı ve pelet daha önce hazırlanmış olan RPMI 1640 ortamında çözdürülmüştür [81]. Hazırlanan besiyerine 5 ml besiyeri eklendi ve her besiyerine 100 µl taze izole edilmiş insan lenfositleri ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 2.1: Santrifüjlemeden sonra Ficoll-Paque ile işlenmiş bir kanın katmanları.

2.2.5 Sitotoksisite Testi

2.2.5.1 MTS Testi

Olea europaea kùltivarlarının toksik etkisi MTS yöntemi ile araştırılmıştır. MTS testi 4 günlük bir prosedürdür. Bu test yönteminin prensibi, tetrazolyum halkasını içeren sarı MTS reaktifinin canlı hücrelerde bozunma sonucu mor renge dönüşmesidir. Hücre belirli dozlarda (0.1, 0.25, 0.5, 1, 10, 25, 50, 100 mg/L) bitki özleri ilave edildi. Negatif kontrol olan lenfosit solüsyonuna test numunesi eklenmedi. Tüm numuneler ve kontroller grupları, 2 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 24. ve 48. saatin ardından lenfosit hücreleri 96-Well Plate içerisine her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiş ve üzerlerine 20 µL MTS reagent ilave edilip 4 saat boyunca inkübasyon sürecine başlatılmıştır. Ölçümler daha sonra mikropłaka okuyuculu bir spektrofotometre kullanılarak 490 nm dalga boyunda yapılmıştır [82, 83].

2.2.6 Genotoksisite Testleri

2.2.6.1 Mikronükleus Testi

Mikronükleus testinin ilk adımında 5 ml besiyerine 500 µl kan eklendi. Binükleus hücreler elde etmek için inkübasyonun 44. saatinde hücre bölünmesi sitokinez aşamasında durdurmak amacıyla 3 µg/mL olan sitokalazin B (cytB) eklenmiştir. 48. Saatte ise bitki ekstraktları ve H₂O₂ kültür ortamlarına eklenmiştir. 72 saat sonunda kültürler 800 RPM' de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra süpernatant atıldı ve pelet, 7-8 mL 0.075 M KCl ilave edilerek oda sıcaklığında 7 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kültürler, lenfositleri çökertmek için 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Çöken lenfositleri fikse etmek amacıyla her kültüre 7-8 mL olacak şekilde yavaşça 3:1 oranında metanol: asetik asit eklenmiştir. Birinci fiksasyon sonunda kültürler 1-2 damla formaldehit ilave edilerek 800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve bu fiksasyon adımı 3 Nihai fiksasyondan sonra, pelet az miktarda fiksatif içinde çözüldü ve -20 °C'de etanol içinde lamlar üzerine damlatıldı ve havayla kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan lamlar %5 Giemsa solüsyonu ile 15 dakika boyandı ve süre sonunda steril su ile yıkanarak serin yerde kurutulmuştur [6, 77, 84]. Nükleer bölünme indeksi 2.2'de gösterilen formüle göre hesaplanmıştır;

$$NDI = [(1 \times N1a) + (2 \times N2b) + (3 \times N3c) + (4 \times N4d)] / (N1 + N2 + N3 + N4) \quad (2.2)$$

a mononükleuslu hücre sayısı, b binükleuslu hücre sayısı, c trinükleuslu hücre sayısı, d tetranükleuslu hücre sayısı.

2.2.6.2 *In vivo* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Bu test için standart *Drosophila melanogaster* kültür şartları ve besiyeri ortamı sağlanmıştır. Besiyeri; 500 mL distile su içerisinde 43 g şeker, 9 g agar, 90 g irmik, 20 g maya, 4 damla mikostatin ve 5 mL propiyonik asit karıştırılarak hazırlanmıştır. Önceden sterilizasyonu sağlanmış şişelere besiyeri 20'şer gram olacak şekilde eşit miktarda dağıtılmıştır [79]. 7 adet erkek mwh/mwh ve 7 adet dişi flr3/ TM3, Bds genotopindeki *D.melanogaster* çaprazlanmış ve 22 °C sıcaklıkta 72±4 saatlik inkübasyon sonrasında üçüncü instar evresindeki larvalardan 70'er tanesi deney ve kontrol grubu olarak belirlenen besiyerlerine eklenmiştir. Negatif kontrol grubu besiyerine hiçbir bitki ekstraktı eklenmemiş, deney grubuna ise bitki ekstraktı (50 mg/L) uygulanmıştır. Oluşan ergin bireylerden kanat preparatları hazırlanmış ve ışık mikroskobu (400x) altında incelenmiştir. Her bir *Drosophila*'nın kanatlarında gözlenen noktalar, tek noktalar (mwh veya flr3 fenotipi) veya ikiz noktalar (her iki mutasyona da uğramış klonlar) olarak sınıflandırılarak kanat başına nokta sıklığı (Fr) hesaplanmıştır. Tek noktaların 3'ten az olması durumunda "küçük tek noktalar", 3'ten fazla olması durumunda ise "büyük tek noktalar" olarak sınıflandırma yapılmıştır. Fr değeri deney grupları içinde nokta sayısının (n) kanat sayısına (N) bölünmesiyle elde edilmiştir [59].

2.2.6.3 *In vivo* Toksikite Testi

Bu test belirlenen dozda 4 farklı zeytin kültivarına ait ekstraktlara tabii tutulan *D. melanogaster*' in gelişme süreçleri izlenerek tespit edilmiştir. Çalışmada *D. melanogaster* Oregon R sineğinin yabancı tip suşları kullanılmıştır. Aynı şişede 48 saatlik inkübasyonun ardından 10 yetişkin erkek ve dişi sinek larvası toplandı ve aynı sayıda larva, bitki ekstresi (50 mg/L), H₂O₂ (6.5 µg/mL) ve normal besiyeri (Negatif Kontrol) içeren kültür şişelerine aktarıldı. Ortaya çıkan kültürler, larvalar olgunluğa ulaşana kadar 22°C'de inkübe edildi. Puparasyon oranı, hayatta kalma oranı ve eklosyon oranı, 2.5, 2.6 ve 2.7' de verilen işlemler ile pupa ve yetişkin sinekler sayılarak belirlenmiştir [85, 86]

$$\% \text{Puparasyon} = (\text{Pupa sayısı} / \text{Larva sayısı}) \times 100 \quad (2.5)$$

$$\% \text{Hayatta kalma} = (\text{Yetişkin sinek sayısı} / \text{Larva sayısı}) \times 100 \quad (2.6)$$

$$\% \text{Eklosyon} = (\text{Yetişkin sinek sayısı} / \text{Pupa sayısı}) \times 100 \quad (2.7)$$

2.2.7 İstatistiksel Analizler

Deneyler sonucunda elde edilen bulguların istatistiksel yönden değerlendirilmesinde IBM S.P.S.S statistic 21 programı kullanılmıştır. Antioksidan aktivite, sitotoksite ve genotoksite test sonuçları kontrol ve deney grupları arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde paired sample t testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 0,05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlanmıştır.



3. BULGULAR

3.1 LC-MS/MS Sonuçları

Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan ekstraktlarında LC-MS/MS analizi ile 36 fenolik bileşeni araştırılarak Tablo 3.1’de verilmiştir. 36 bileşenden 6 tanesi hiç bir kültürde tespit edilememiştir. Bu bileşenlerin konsantrasyonları 0,62 - 9819,17 µg/g arasında değişkenlik göstermiştir.

Tablo 3.1: *Olea europaea* kültürlerinin LC-MS/MS sonuçları.

	Uslu (µg/g)	Domat (µg/g)	Gemlik (µg/g)	Kiraz (µg/g)
(-)-Epikateşin	TE*	TE*	TE*	TE*
(+)-Kateşin	TE*	TE*	TE*	TE*
2.5-Dihidroksibenzoik asit	5.69±0.27	2.62±0.08	25.20±0.03	3.70±0.12
2-Hidroksisünamik asit	TE*	TE*	TE*	TE*
3.4-Dihidroksifenilasetik acid	TE*	TE*	TE*	TE*
3-Hidroksibenzoik asit	TE*	TE*	TE*	TE*
3-Hidroksitirozol	889.51±5.51	611.11±1.62	776.36±0.78	603.01±0.66
4- Hidroksibenzoik asit	32.11±0.04	20.08±0.15	444.40±0.44	24.91±0.34
Apigenin 7-glukozid	234.35±3.53	71.40±0.31	85.85±0.09	168.45±0.10
Apigenin	40.02±0.38	51.11±0.38	435.86±0.44	12.95±0.10
Kafeik asit	65.87±0.68	26.18±0.08	34.46±0.03	37.38±0.35
Klorojenik asit	8.66±0.06	3.81±0.35	58.70±0.06	20.80±0.46
Eriyodiktol	7.71±0.04	9.97±0.05	153.68±0.15	5.21±0.08
Ferulik asit	101.85±2.19	66.67±0.55	162.12±0.16	37.83±0.32
Gallik Asit	7.17±0.17	2.87±0.14	65.97±0.07	7.51±0.08

Tablo 3.1' in devamı

Hesperidin	250.04±2.30	126.74±2.32	48.81±0.05	435.57±1.07
Homovanilik asit	TE*	TE*	TE*	TE*
Hiperosit	66.20±0.41	11.24±0.56	319.91±0.32	73.72±0.70
Kaemferol	48.47±0.74	89.48±1.38	52.21±0.05	33.40±0.19
Luteolin 7-glukozid	465.27±1.68	309.57±2.35	2857.90±2.86	574.85±10.97
Luteolin	178.81±0.57	385.90±0.13	203.22±0.20	109.66±0.14
Oleuropein	3763.15±52.13	2726.91±33.61	9819.17±9.82	5622.79±113.48
p-Koumarik asit	97.53±0.15	109.85±0.44	372.86±0.37	51.89±0.48
Pinoresinol	8.32±0.23	18.25±0.96	698.35±0.70	9.11±1.29
Protokatekuik asit	26.93±0.18	19.93±0.38	418.21±0.42	28.06±0.63
Pirokatekol	TE*	TE*	TE*	TE*
Kuersetin	6.38±0.39	9.41±0.92	15.36±0.02	15.99±0.43
Rosmarinik asit	1.07±0.05	1.54±0.37	22.01±0.02	1.01±0.02
Rutin hidrat	104.53±26.63	274.8±6.87	141.68±29.33	95.21±1.91
Sinapik asit	10.28±0.77	3.06±0.08	232.22±0.23	8.03±0.07
Siringik asit	3.38±0.30	3.32±0.08	12.39±0.01	3.70±0.25
Taksifolin	11.38±0.20	10.85±0.10	47.30±0.05	18.53±0.48
Tirosol	112.13±17.40	288.75±20.74	372.54±22.46	203.56±18.02
Vanilik Asit	0.84±0.12	1.06±0.14	0.62±0.18	2.70±0.02
Vanillin	5.54±0.08	10.75±0.33	5.66±0.01	5.70±0.02
Verbaskozid	2580.79±64.28	2008.80±1.93	8762.36±8.76	4693.83±4.60

*Tespit Edilememiştir

3.2 Antioksidan Sonuçları

3.2.1 DPPH ve ABTS⁺ Testi Sonuçları

DPPH ve ABTS⁺ radikal süpürme testi ile gerçekleştirilen antioksidan aktivite verileri % 50 inhibisyon oranları şeklinde hesaplanarak Tablo 3.2’ de sunulmuştur.

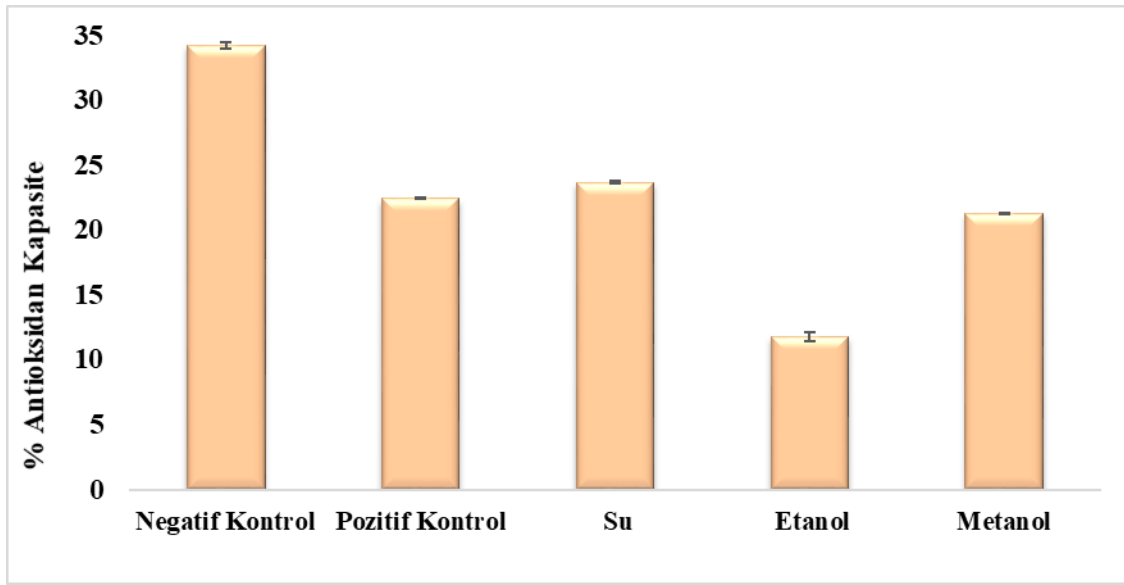
Tablo 3.2: *Olea europaea* Kültivarlarının yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının IC₅₀ değerleri

Örnekler	DPPH (IC ₅₀)	ABTS ⁺ (IC ₅₀)
Gallik Asit (Pozitif Kontrol)	1.600 ± 0.000 (µg/mL)	0.970 ± 0.001 (µg/mL)
<i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu (µg/µL)		
Su	0.16 ± 0.01	0.063 ± 0.002
Etanol	0.20 ± 0.01	0.029 ± 0.003
Metanol	0.21 ± 0.20	0.042 ± 0.001
<i>Olea europaea</i> L. cv. Domat (µg/µL)		
Su	0.21 ± 0.01	0.079 ± 0.004
Etanol	0.16 ± 0.02	0.023 ± 0.002
Metanol	0.20 ± 0.02	0.035 ± 0.003
<i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik (µg/µL)		
Su	0.21 ± 0.02	0.073 ± 0.002
Etanol	0.24 ± 0.06	0.048 ± 0.002
Metanol	0.19 ± 0.01	0.039 ± 0.002
<i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz (µg/µL)		
Su	0.14 ± 0.01	0.040 ± 0.004
Etanol	0.17 ± 0.02	0.028 ± 0.004
Metanol	0.20 ± 0.01	0.036 ± 0.002

3.2.2 *In vivo* Antioksidan Test Sonuçları

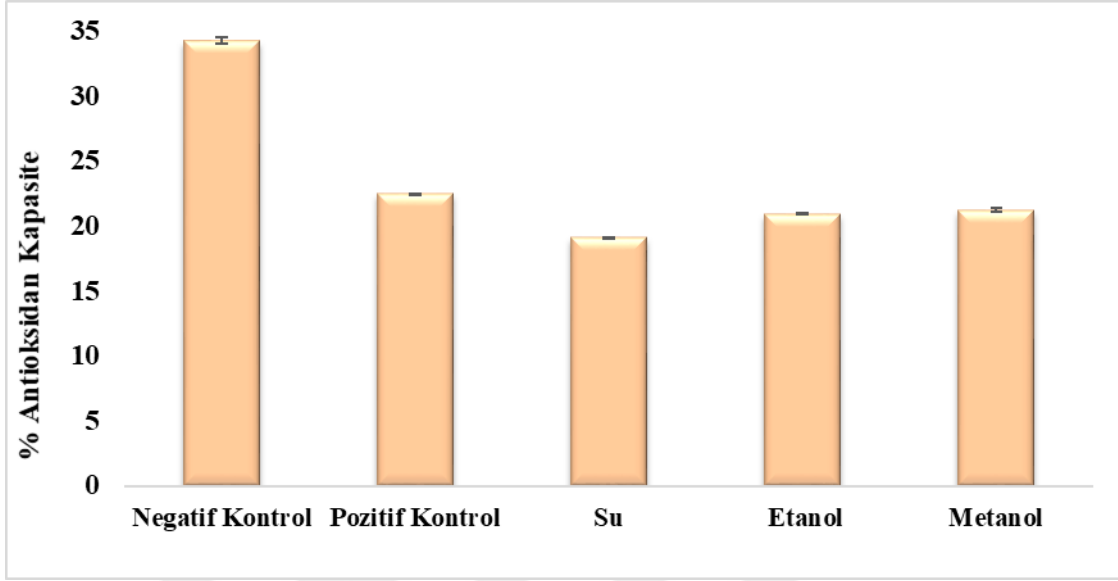
In vivo ortamda gerçekleştirilen antioksidan aktivite test sonuçları Şekil 3.1-3.4'te verilmiştir. DPPH reaktifi süpürücü aktiviteleri % Antioksidan kapasite olarak sunulmuştur. DPPH reaktifi süpürücü aktiviteleri zeytin kültürleri arasında Gemlik ve Kiraz, ekstraktlar arasında ise etanollü ekstraktların daha yüksek aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. ($p>0,05$)

3.2.2.1 *Olea europaea* L. cv. Uslu Kültürüne Ait *In Vivo* Antioksidan Test Sonuçları



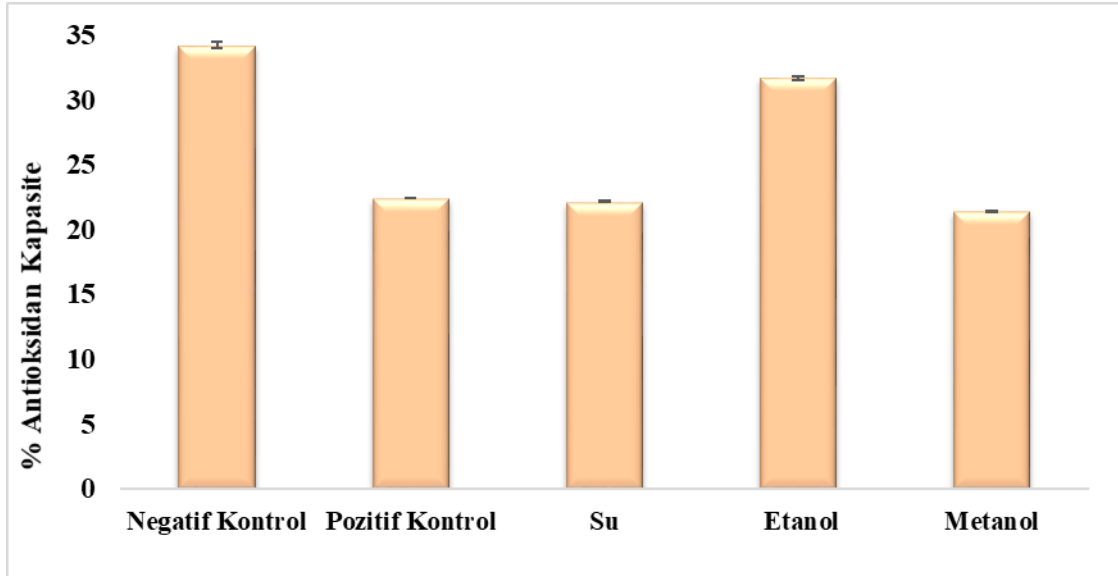
Şekil 3.1: Uslu kültürünün yüzde antioksidan sonuçları

3.2.2.2 *Olea europaea* L. cv. Domat Kùltivarına Ait *In Vivo* Antioksidan Test Sonuçları



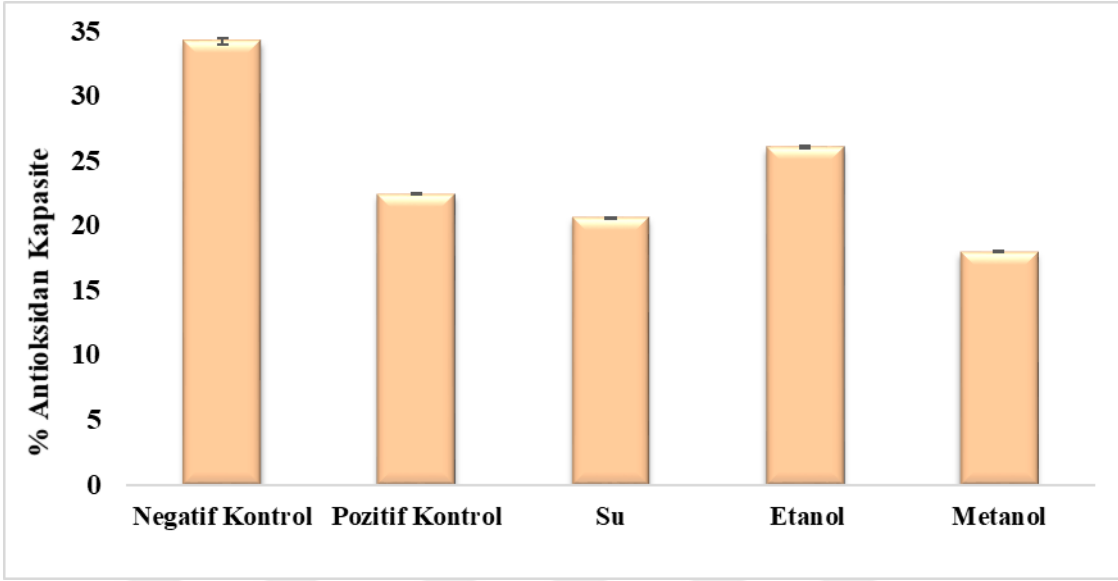
Şekil 3.2: Domat kùltivarının yüzde antioksidan sonuçları

3.2.2.3 : *Olea europaea* L. cv. Gemlik Kùltivarına Ait *In Vivo* Antioksidan Test Sonuçları



Şekil 3.3: Gemlik kùltivarının yüzde antioksidan sonuçları

3.2.2.4 *Olea europaea* L. cv. Kiraz Kültivarına Ait *In Vivo* Antioksidan Test Sonuçları



Şekil 3.4 : Kiraz kültivarının yüzde antioksidan sonuçları

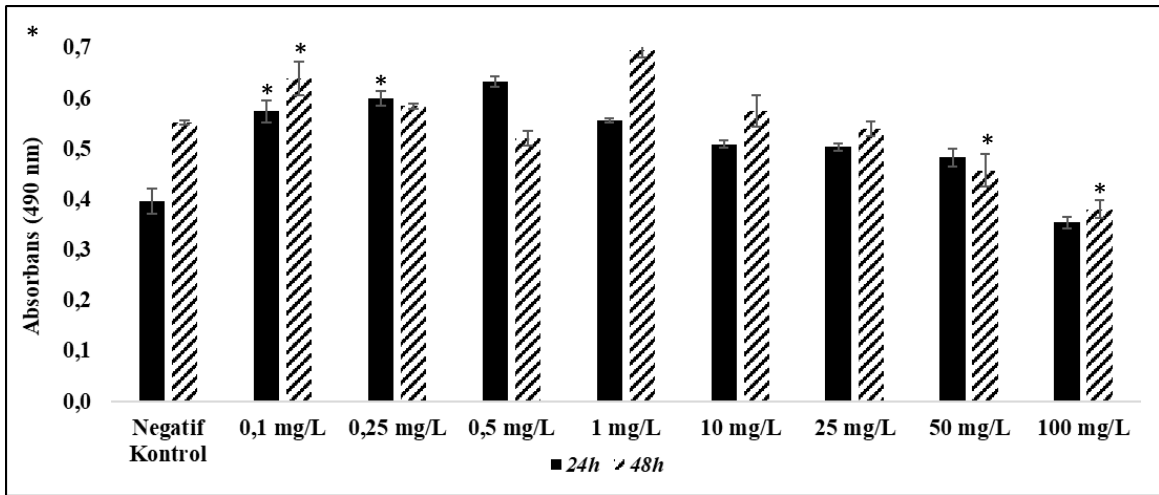
3.3 Sitotoksosite Sonuçları

3.3.1 MTS Testi Sonuçları

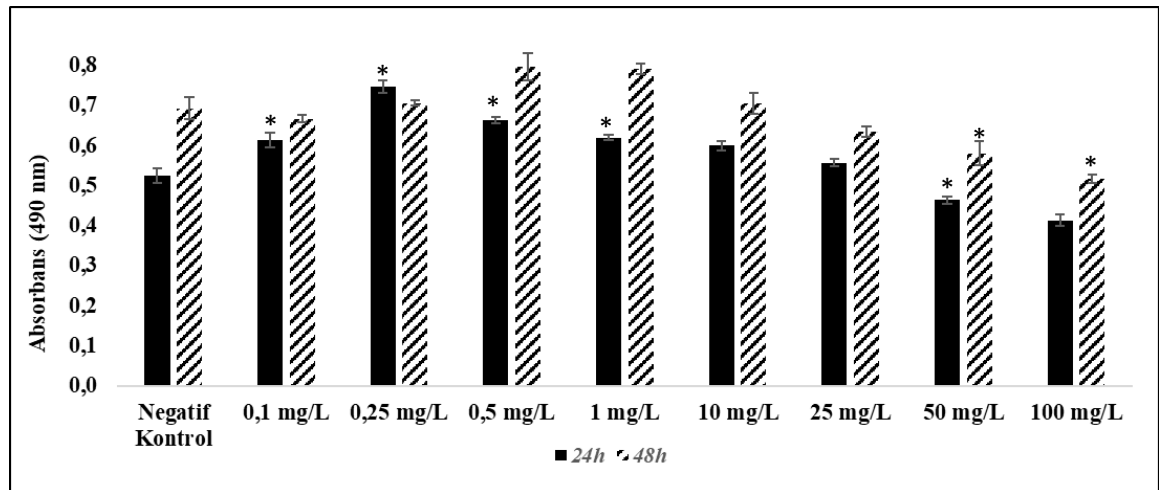
Olea europaea kültivarlarının yaprak kısımlarından hazırlanan etanol, metanol ve su ekstraktları lenfosit kültürleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş ve lenfosit kültürü numunelerinin sitotoksik aktivitesi, hücre yaşamlılığını belirlemek için kullanılan ve bir kalorimetrik yöntem olan MTS deneyi ile 490 nm'de incelenmiştir.

3.3.1.1 *Olea europaea* Uslu Kültivarına Ait MTS Sonuçları

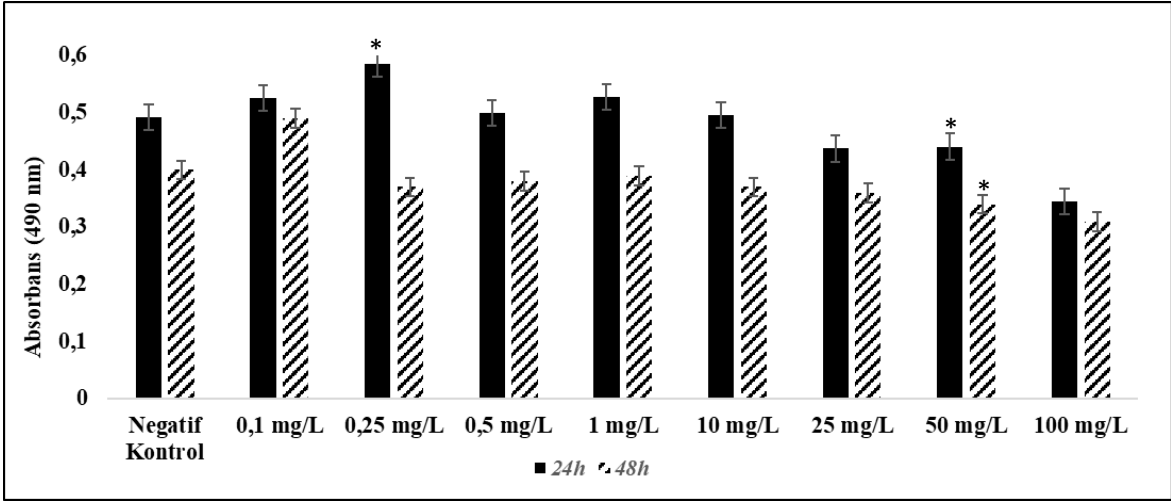
Olea europaea Uslu Kültivarına ait yaprakların etanol, metanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının MTS testi sonuçları Şekil 3.5'te verilmiştir.



(a)



(b)

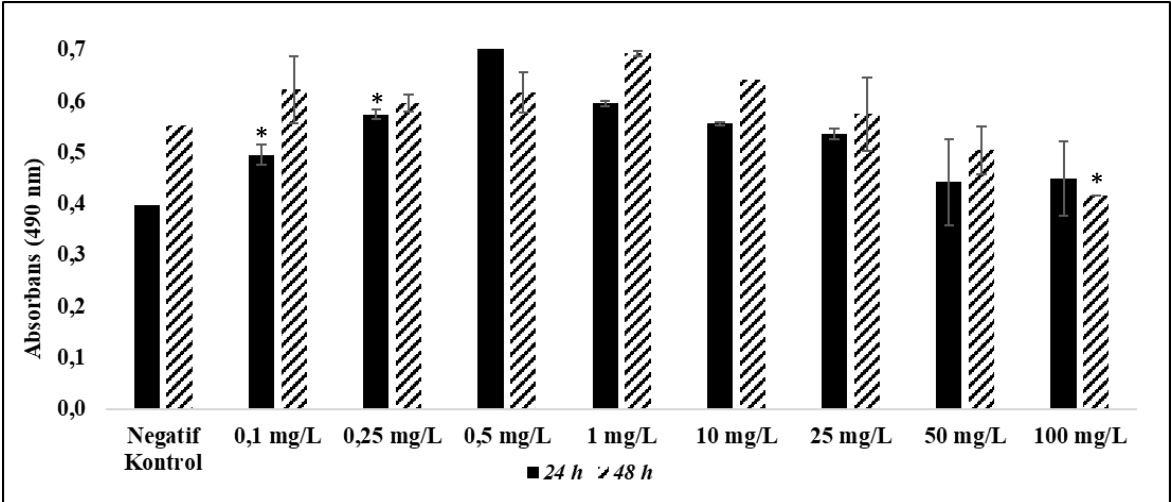


(c)

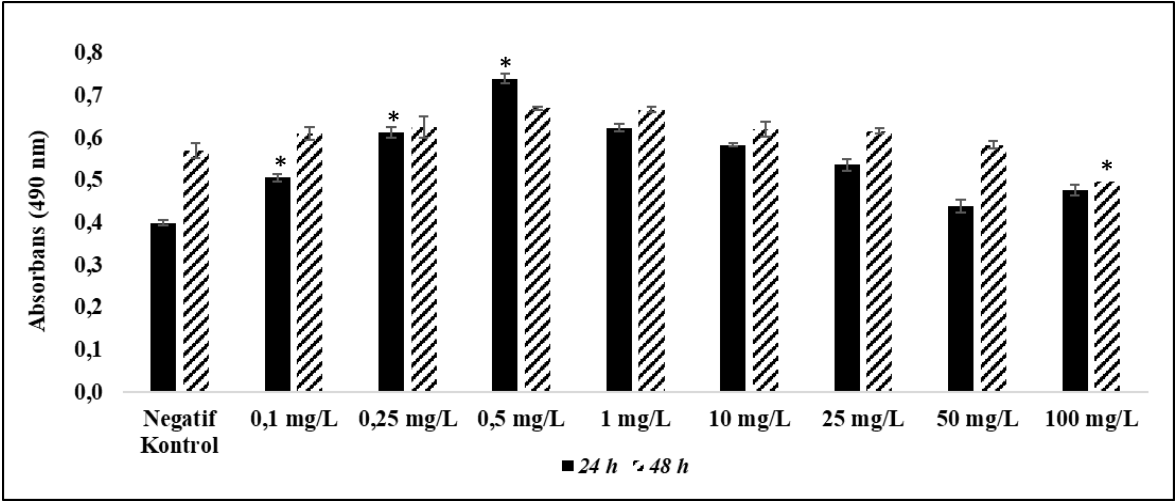
Şekil 3.5: Uslu kùltivarının MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir ($p<0.05$).

3.3.1.2 *Olea europaea* Domat Kùltivarına Ait MTS Sonuçları

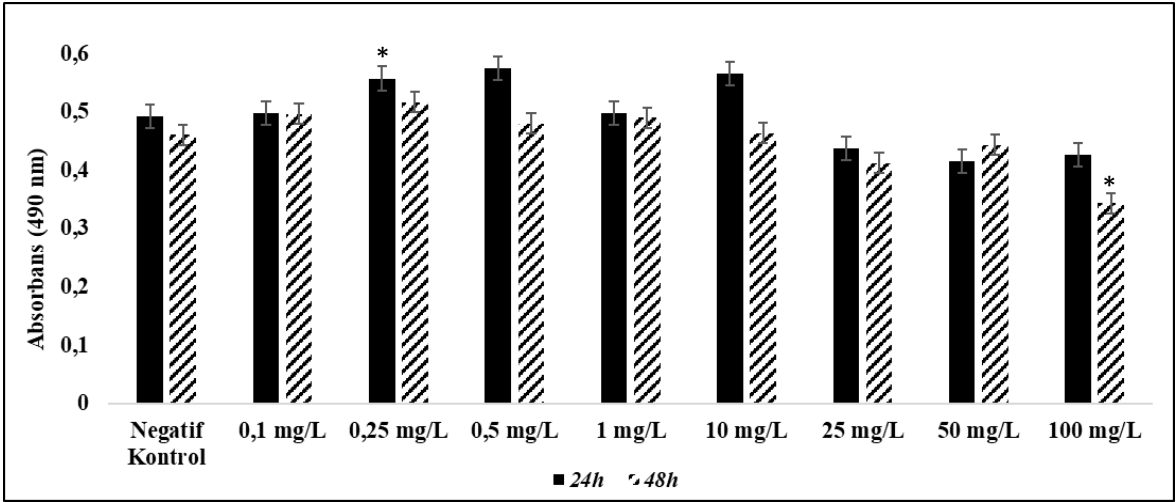
Olea europaea Domat kùltivarına ait yaprakların etanol, metanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının MTS testi sonuçları Şekil 3.6'da verilmiştir.



(a)



(b)

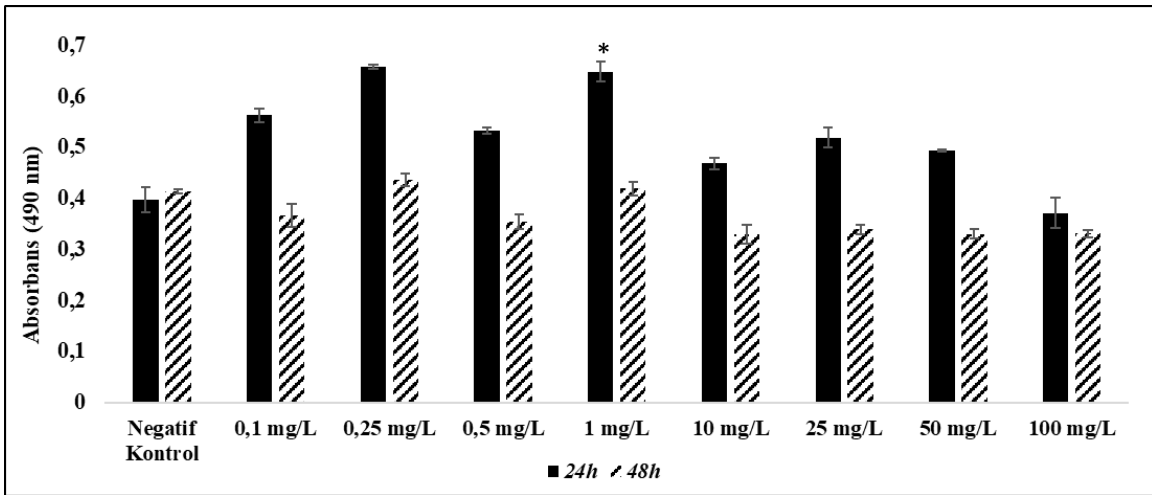


(c)

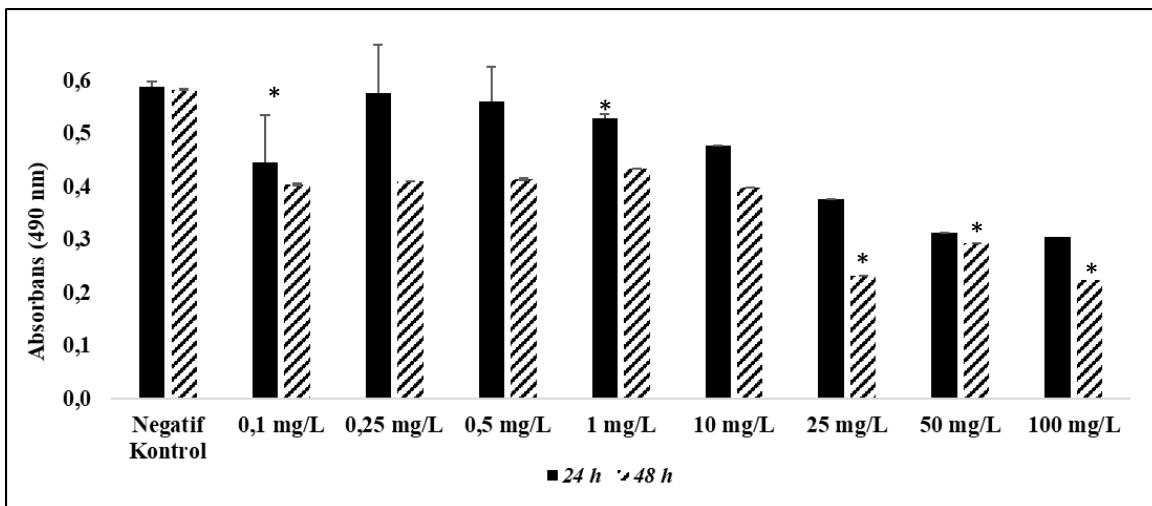
Şekil 3.6: Domat Kültivarının MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir ($p<0.05$).

3.3.1.3 *Olea europaea* Gemlik Kültivarına Ait MTS Sonuçları

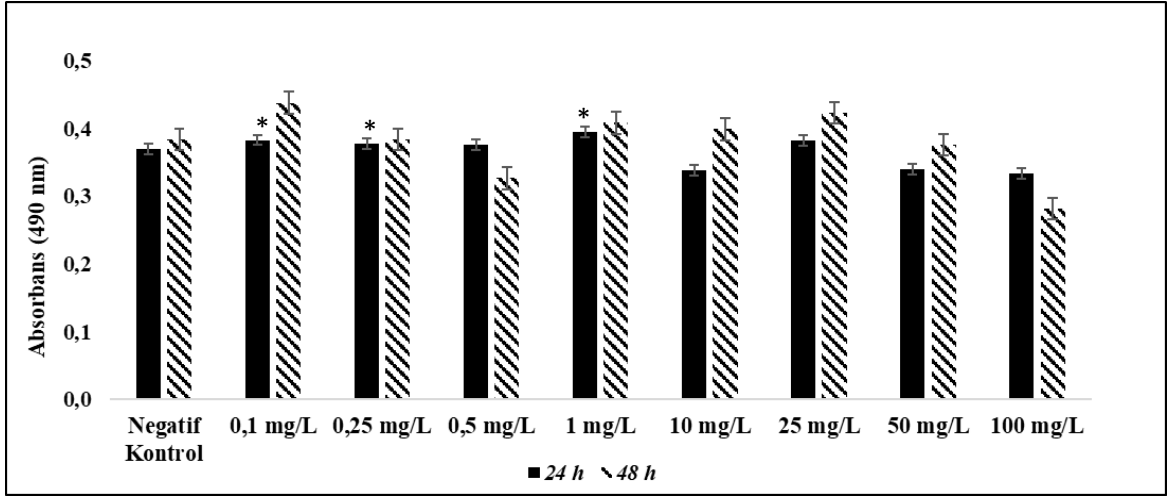
Olea europaea Gemlik kültivarına ait yaprakların etanol, metanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının MTS testi sonuçları Şekil 3.7’de verilmiştir.



(a)



(b)

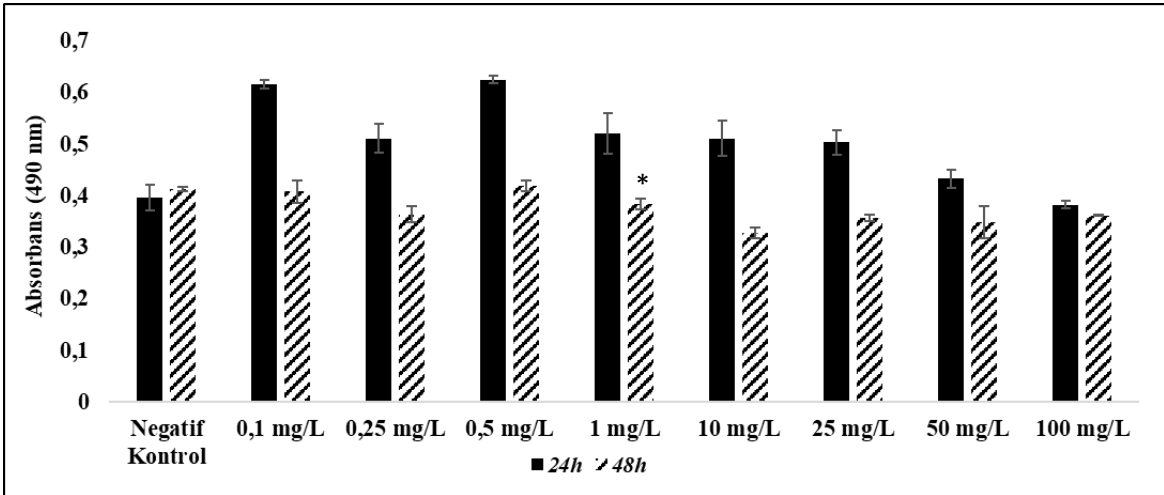


(c)

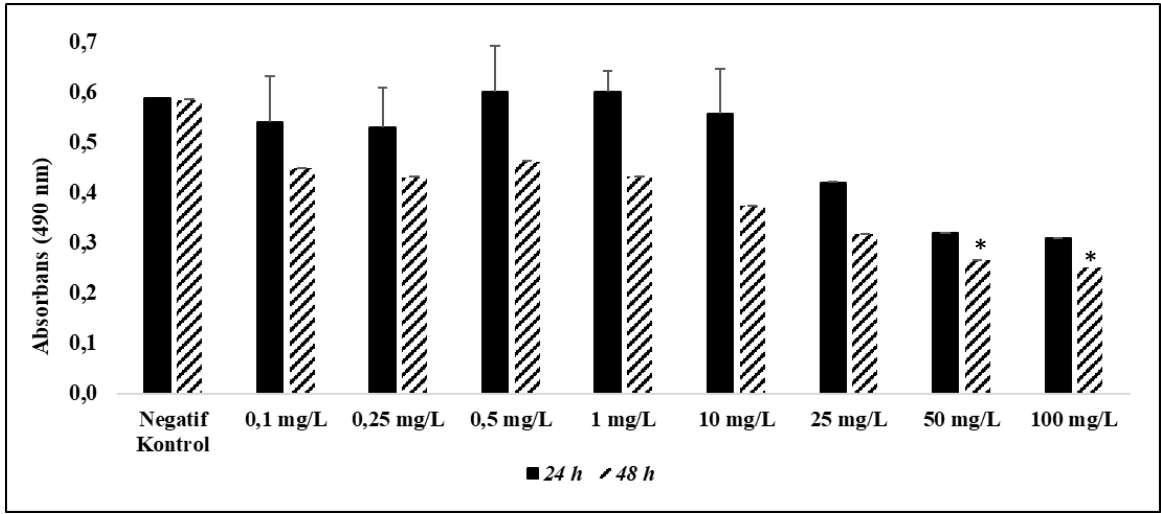
Şekil 3.7: Gemlik kültürünün MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir ($p<0.05$).

3.3.1.4 *Olea europaea* Kiraz Kültivarına Ait MTS Sonuçları

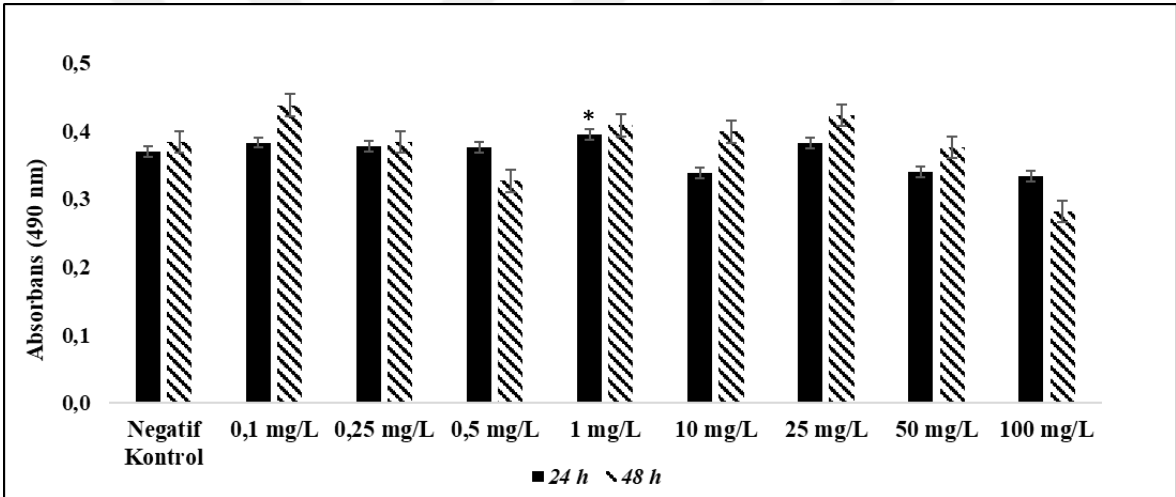
Olea europaea Kiraz kültürüne ait yaprakların etanol, metanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının MTS testi sonuçları Şekil 3.8’de verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.8: Kiraz kültivarının MTS sonuçları (a) etanol ekstraktı (b) metanol ekstraktı (c) su ekstraktı * istatistiksel anlamda önemi göstermektedir ($p < 0.05$).

3.4 Genotoksisite Sonuçları

3.4.1 Mikronükleus Testi Sonuçları

Olea europaea kültivarlarının yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının mikronükleus test sonuçları Tablo 3.3' te verilmiştir.

Tablo 3.3: *Olea europaea* kùltivarlarının mikronùkleus sonuçları.

Örnekler	MN ± SH	NDI ± SH	% İnhibisyon
Negatif Kontrol	10.37 ±0.21 ^b	1.35 ±0.05	
H ₂ O ₂ (6.5 µg/mL)	25.39 ±0.34 ^a	1.31 ±0.03	
Su (Çözgen Kontrolü)	4,86±1,47 ^{a,b}	1,31±0,01	
Etanol (Çözgen Kontrolü)	14,00±1,50 ^{a,b}	1,35±0,00	
Metanol (Çözgen Kontrolü)	15,47±1,19 ^{a,b}	1,31±0,00	
<i>Olea europaea</i> L. cv. Uslu			
Su (50 mg/L)	11.6 ±0.47 ^b	1.38 ±0.03	
Su (50 mg/L + H ₂ O ₂)	13.26 ±0.06 ^{a,b}	1.38 ±0.02	83.25
Etanol (50 mg/L)	13.68 ±0.50 ^{a,b}	1.22 ±0.02	
Etanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	16.92 ±0.53 ^{a,b}	1.24 ±0.02	55.90
Metanol (50 mg/L)	12.82 ±0.93 ^{a,b}	1.34 ±0.02	
Metanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	18.05 ±0.67 ^{a,b}	1.49 ±0.05	55.06
<i>Olea europaea</i> L. cv. Domat			
Su (50 mg/L)	12.44 ±0.30 ^{a,b}	1.36 ±0.03	
Su (50 mg/L + H ₂ O ₂)	14.83 ±0.11 ^{a,b}	1.37 ±0.01	72.21
Etanol (50 mg/L)	13.79 ±0.53 ^b	1.33 ±0.01	
Etanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	16.31 ±0.20 ^{a,b}	1.42 ±0.06	61.68
Metanol (50 mg/L)	14.73 ±0.52 ^{a,b}	1.35 ±0.01	
Metanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	17.56 ±0.34 ^{a,b}	1.51 ±0.04	54.78
<i>Olea europaea</i> L. cv. Gemlik			
Su (50 mg/L)	12.17 ±0.24 ^{a,b}	1.41 ±0.02	
Su (50 mg/L + H ₂ O ₂)	13.65 ±0.43 ^{a,b}	1.42 ±0.03	80.71
Etanol (50 mg/L)	11.67 ±0.36 ^{a,b}	1.31 ±0.02	
Etanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	13.21 ±0.72 ^{a,b}	1.33 ±0.01	76.40
Metanol (50 mg/L)	13.38 ±0.30 ^{a,b}	1.38 ±0.05	
Metanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	14.21 ±0.41 ^{a,b}	1.49 ±0.05	72.24
<i>Olea europaea</i> L. cv. Kiraz			
Su (50 mg/L)	11.21 ±0.39 ^{a,b}	1.36 ±0.01	
Su (50 mg/L + H ₂ O ₂)	12.97 ±0.49 ^{a,b}	1.32 ±0.02	86.29
Etanol (50 mg/L)	12.08 ±1.30 ^b	1.34 ±0.01	
Etanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	11.95 ±0.21 ^{a,b}	1.31 ±0.02	92.34
Metanol (50 mg/L)	11.72 ±0.49 ^b	1.43 ±0.01	
Metanol (50 mg/L + H ₂ O ₂)	11.75 ±0.82^{a,b}	1.40 ±0.02	85.97

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

3.4.2 *In vivo* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Sonuçları

Olea europaea Uslu kùltivarına ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının SMART testi sonuçları Tablo 3.4' te verilmiştir.

Tablo 3.4 :Uslu kùltivarına ait smart testi sonuçları

	Kùçük Tek Noktalar			Bùyük Tek Noktalar		İkiz Noktalar	
	Kanat Sayısı	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr
Negatif Kontrol	50	2	0.04 ^b	0	0.00 ^b	0	0 ^b
H ₂ O ₂ (6.5 µg/mL)	50	20	0.40 ^a	4	0.08 ^a	12	0.24 ^a
Su Ekstraktı	45	4	0.09 ^b	1	0.02	0	0 ^b
Etanol Ekstraktı	44	3	0.07 ^b	0	0	0	0 ^b
Metanol Ekstraktı	50	5	0.1 ^{a,b}	0	0	0	0 ^b

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

Olea europaea Domat kùltivarına ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının SMART testi sonuçları Tablo 3.5' te verilmiştir.

Tablo 3.5: Domat kùltivarına ait smart testi sonuçları

	Kùçük Tek Noktalar			Bùyük Tek Noktalar		İkiz Noktalar	
	Kanat Sayısı	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr
Negatif Kontrol	50	2	0.04 ^b	0	0.00 ^b	0	0 ^b
H ₂ O ₂ (6.5 µg/mL)	50	20	0.40 ^a	4	0.08 ^a	12	0.24 ^a
Su Ekstraktı	43	4	0.09 ^b	1	0.02 ^a	0	0 ^b
Etanol Ekstraktı	50	2	0.04 ^b	1	0.02 ^b	0	0 ^b
Metanol Ekstraktı	40	1	0.03 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

Olea europaea Gemlik kùltivarına ait su, metanol ve etanol ekstraktlarının SMART testi sonuçları Tablo 3.6' te verilmiştir.

Tablo 3.6: Gemlik kültivarına ait smart testi sonuçları

	Küçük Tek Noktalar			Büyük Tek Noktalar		kiz Noktalar	
	Kanat Sayısı	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr
Negatif Kontrol	50	2	0.04 ^b	0	0.00 ^b	0	0 ^b
H ₂ O ₂ (6.5 µg/mL)	50	20	0.40 ^a	4	0.08 ^a	12	0.24 ^a
Su Ekstraktı	50	3	0.06	0	0 ^b	0	0 ^b
Etanol Ekstraktı	50	3	0.06 ^b	1	0.02 ^{a,b}	0	0 ^b
Metanol Ekstraktı	30	3	0.1 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

Olea europaea Kiraz kültivarına ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının SMART testi sonuçları Tablo 3.7' te verilmiştir.

Tablo 3.7: Kiraz kültivarına ait smart testi sonuçları

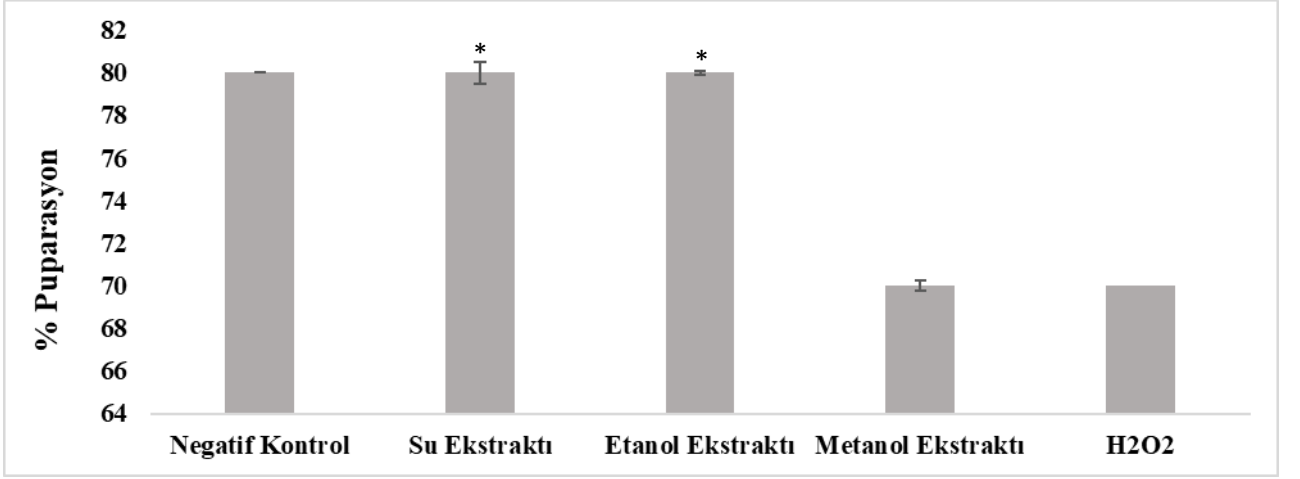
	Küçük Tek Noktalar			Büyük Tek Noktalar		kiz Noktalar	
	Kanat Sayısı	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr	Nokta Sayısı	Fr
Negatif Kontrol	50	2	0.04 ^b	0	0.00 ^b	0	0 ^b
H ₂ O ₂ (6.5 µg/mL)	50	20	0.40 ^a	4	0.08 ^a	12	0.24 ^a
Su Ekstraktı	50	4	0.08 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b
Etanol Ekstraktı	35	3	0.09 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b
Metanol Ekstraktı	50	3	0.06 ^b	0	0 ^b	0	0 ^b

a: Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

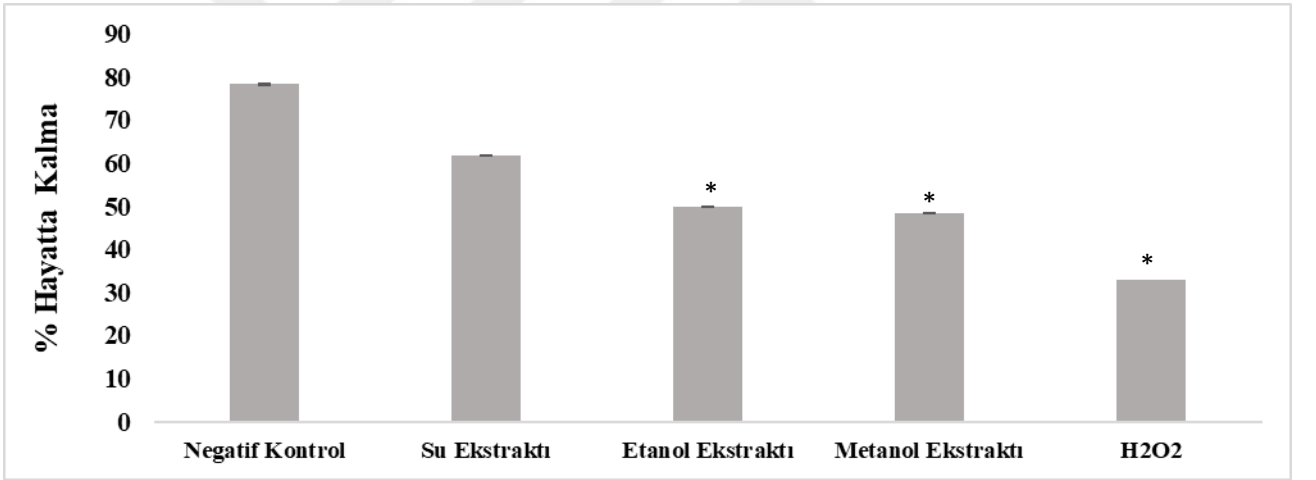
b: Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olanlar (p<0.05).

3.4.3 *In vivo* Toksikite Sonuçları

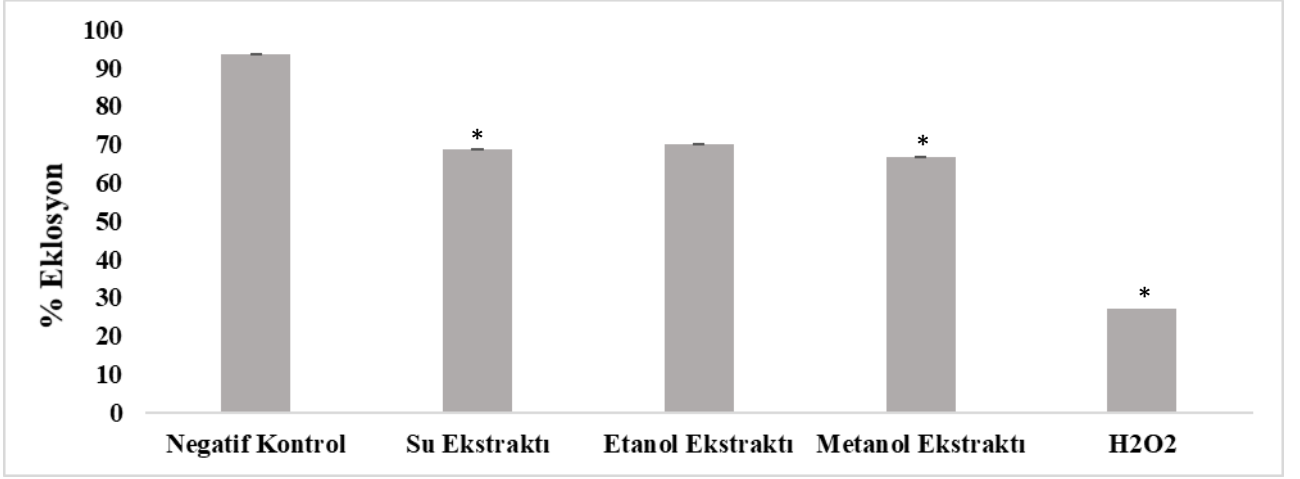
Olea europaea Uslu kültivarına ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının (50 mg/L) negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemi göstermektedir Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.9: Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % puparasyon sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).

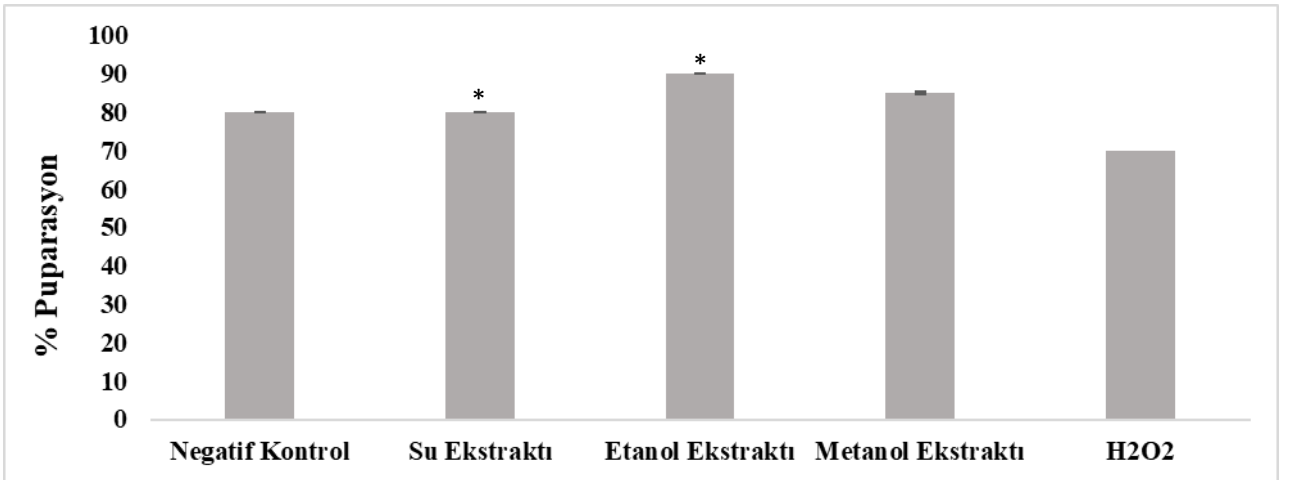


Şekil 3.10 Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p<0.05$).

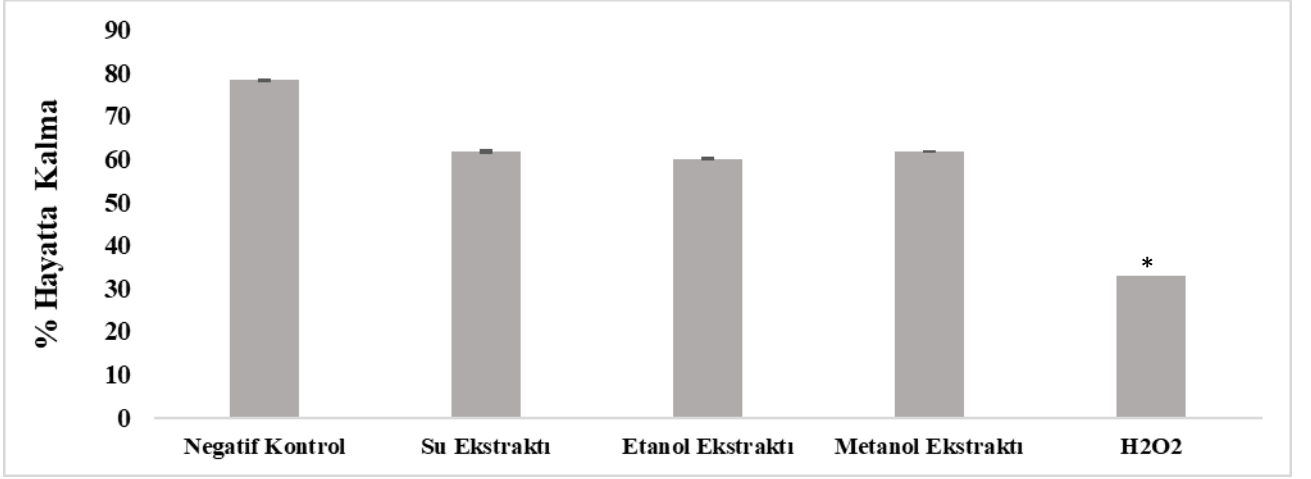


Şekil 3.11: Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

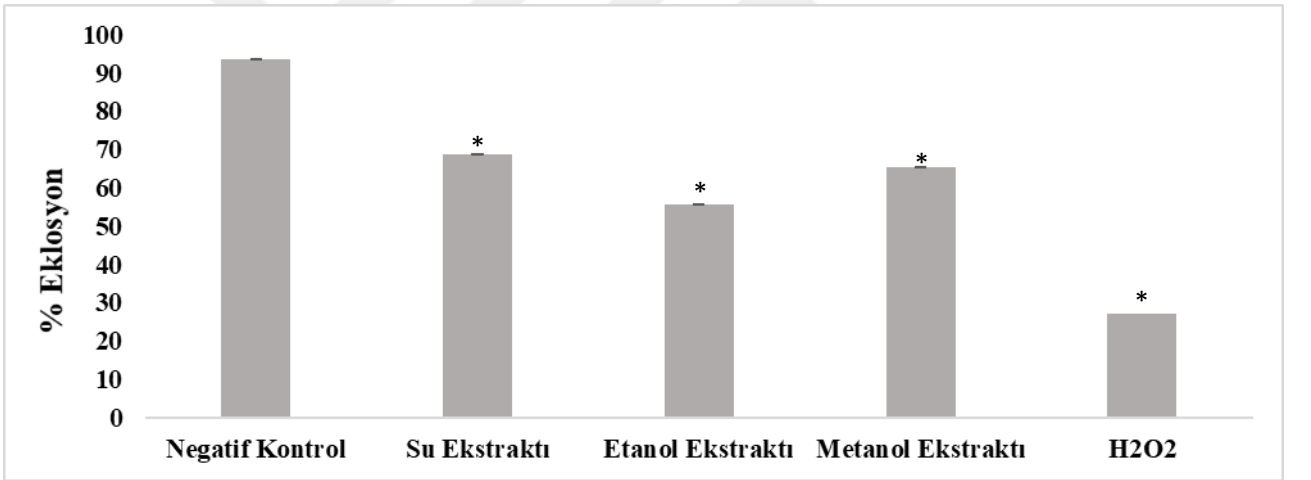
Olea europaea Domat kültürüne ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının (50 mg/L) negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemi göstermektedir Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.12: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

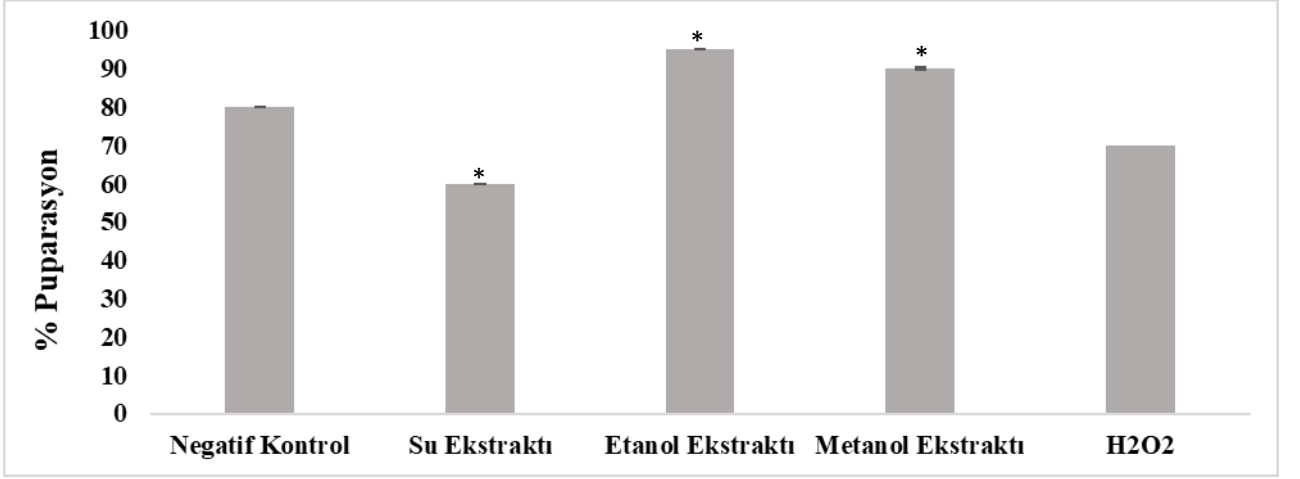


Şekil 3.13: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

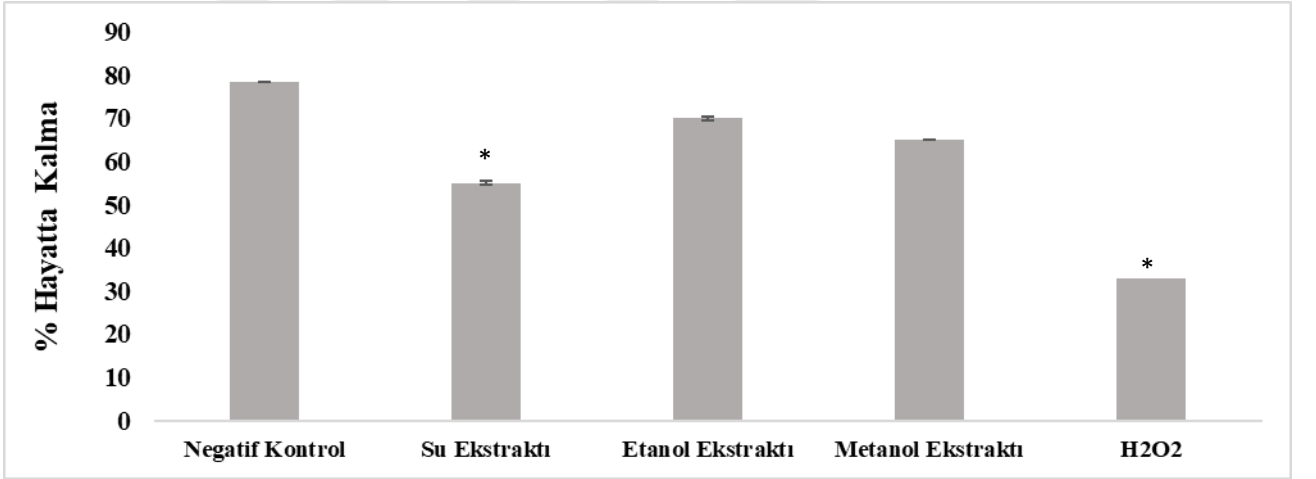


Şekil 3.14: Domat kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

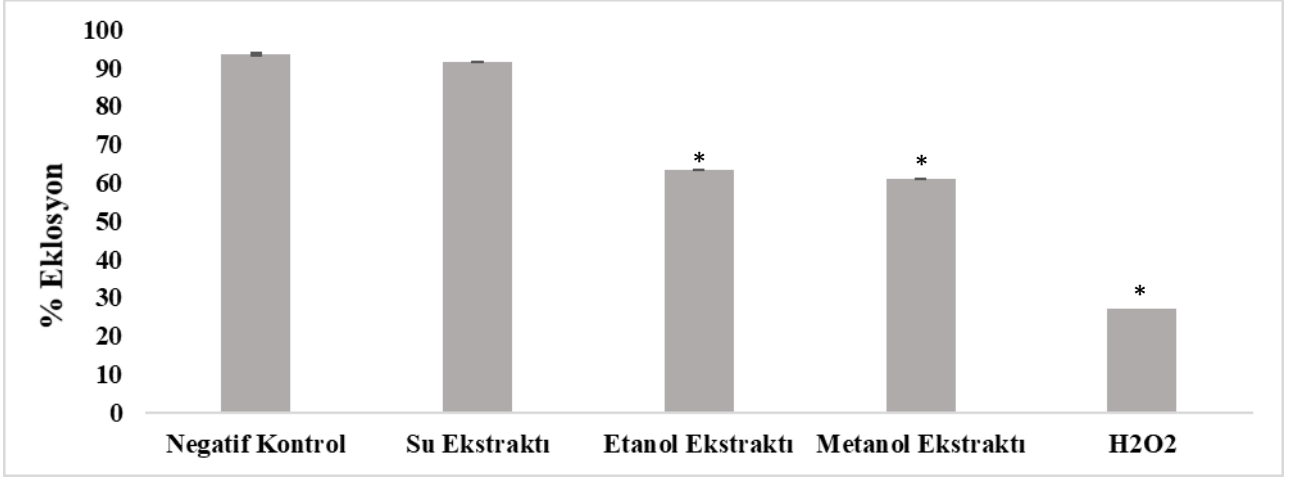
Olea europaea Gemlik kültürüne ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının (50 mg/L) negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemi göstermektedir Şekil 3.15, 3.16 ve 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.15: Gemlik kültürünün su su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

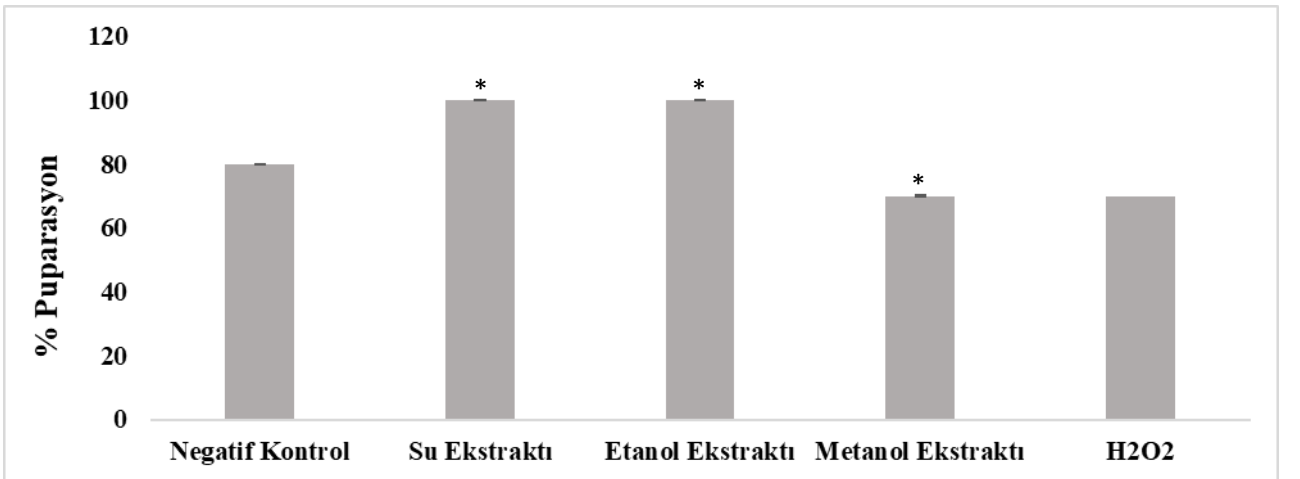


Şekil 3.16: Gemlik kültürünün su su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

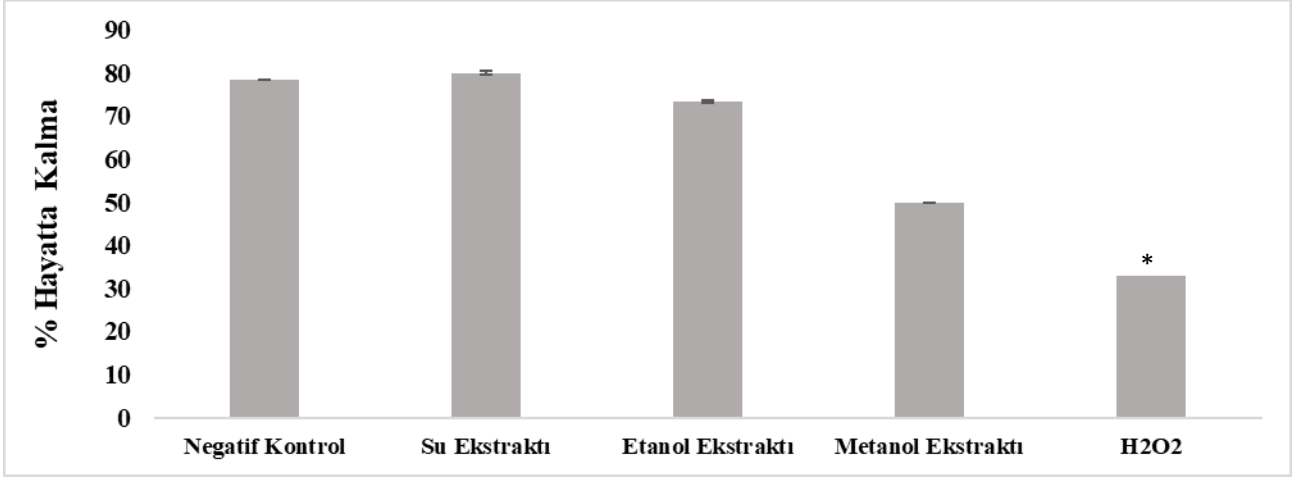


Şekil 3.17: Gemlik kültivarının su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

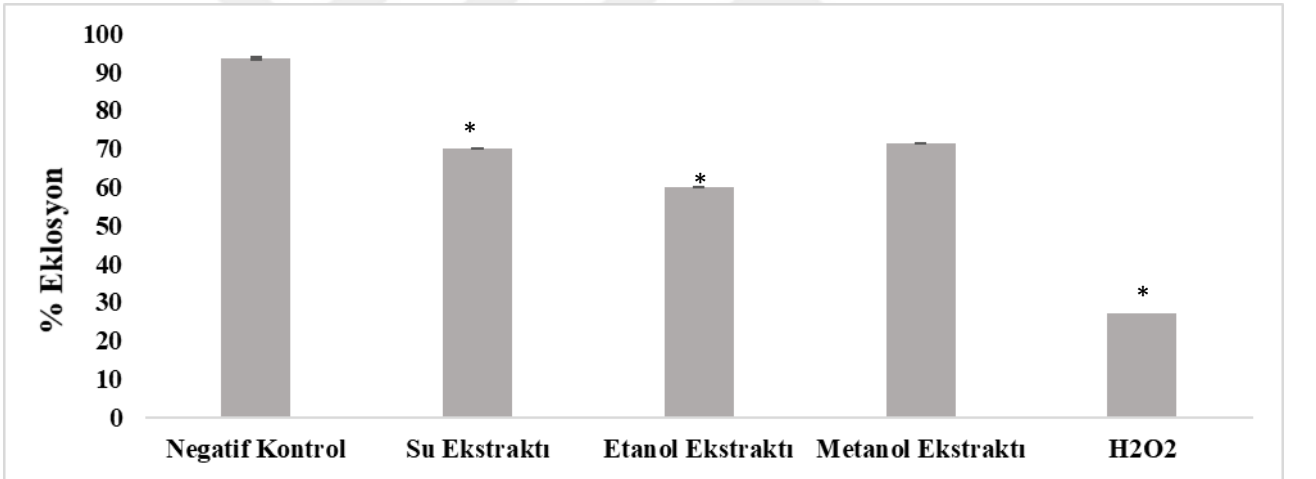
Olea europaea Kiraz kültivarına ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının (50 mg/L) negatif kontrole göre istatistiksel anlamda önemi göstermektedir Şekil 3.18, 3.19 ve 3.20’de verilmiştir.



Şekil 3.18: Kiraz kültivarının su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % puparasyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 3.19: Kiraz kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % hayatta kalma sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).



Şekil 3.20: Kiraz kültürünün su, metanol ve etanol ekstraktları ile muamele edilmiş *Drosophila melanogaster* sineklerinin % eklosyon sonuçları sonuçları *negatif kontrole göre istatistiksel anlamlılığı gösterir ($p < 0.05$).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kùltivarlarına ait zeytin ağaçlarından toplanan ve üç farklı çözücüde hazırlanan yaprak ekstralarının fitokimyasal özellikleri, antioksidan kapasiteleri, hidrojen peroksitle indüklenmiş insan lenfosit hücreleri üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* sitotoksik/antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Analizler sonucu ortaya çıkan veriler kontrol grupları ve birbirleri ile kıyaslanmıştır. Ayrıca, elde edilen veriler literatür ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4.1 LC-MS/MS Sonuçları

Bu çalışmada yapılan LC-MS/MS cihazı dört farklı zeytin kùltivarında 36 farklı fenolik bileşimin ((-)-epikateşin, (+)-kateşin, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-hidroksisünamik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 3-hidroksibenzoik asit,3-hidroksitirozol, 4- hidroksibenzoik asit, apigenin 7-glukozid, apigenin, kafeik asit, klorojenik asit, eriyodiktiol, ferulik asit, gallik asit, hesperidin, homovanilik asit, hiperosit, kaemferol, luteolin 7-glukozid, luteolin, oleuropein, *p* kumarik asit, pinosüinol, protokatekuik asit, pirokatekol, kuersetin, rosmarinik asit, rutin hidrat, sünapik asit, süringik asit, taksifolin, tirosol, vanilik asit, vanillin, verbaskozid) konsantrasyonları araştırılmıştır. *Olea europaea* türüne ait kùltivarların LC-MS/MS sonuçları Tablo 3.1' de verilmiştir. Tablo incelendiğinde 4 kùltivarda da (-)-Epikateşin, (+)-kateşin, 2-hidroksisünamik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik acid, 3-hidroksibenzoik asit homovanilik asit ve pirokatekol miktarları tespit edilememiştir. *Olea europaea* cv. Uslu kùltivarında en fazla bulunan fenolik bileşikler sırasıyla oleuropein, verbaskozid, 3-hidroksitirozol, luteolin 7-glukozid, hesperidin, apigenin 7-glukozid ve luteolin olarak tespit edilmiştir. *Olea europaea* L. cv. Domat kùltivarının sonuçları incelendiğinde ise en fazla bulunan fenolik bileşiklerin 3-hidroksitirozol, oleuropein, luteolin, luteolin 7-glukozid, verbaskozid, hesperidin, *p*-kumarik asit olduğu tespit edilmiştir. Diğer kùltivarlarda olduğu gibi Gemlik kùltivarının sonuçlarına baktığımızda oleuropein, verbaskozid, luteolin 7-glukozid, 3-hidroksitirozol, pinosüinol, 4-hidroksibenzoik asit ve apigeninin en fazla bulunan fenolik bileşikler olduğu görölmektedir. Kiraz kùltivarının fenolik bileşik değerleri incelendiğinde ise oleuropein, verbaskozid, 3-hidroksitirozol, luteolin 7-glukozid, hesperidin, apigenin 7-glukozid ve luteolinin baskın fenolik bileşikler olduğu bulunmuştur. Bu dört kùltivarın verileri kendi içerisinde karşılaştırıldığında ise Gemlik kùltivarına ait oleuropein miktarının en yüksek konsantrasyonda tespit edilen fenolik bileşik olduğu görölmektedir (9819,171 ± 9,82 µg/g).

Oleuropeinin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir [87]. Vücutta çeşitli rahatsızlıklara neden olan serbest radikalleri nötralize ettiği de araştırmalarda bulunmuştur. Ayrıca oleuropeinin, Alzheimer hastalığında etiyolojik bir faktör olan amiloid peptit A- β ile kovalent olmayan bir kompleks oluşturduğu öne sürülmüştür [88]. Verbaskozid'nin analjezik, antikanser, nöroprotektif, iyileştirici ve antihipertansif etkileri olduğu tespit edilmiştir [89]. Çalışmamız sonucunda en yüksek miktarda tespit edilen bileşiklerden biri olan hidroksitirozol yeşil çaydan on kat, koenzim Q10' dan ise iki kat daha fazla antioksidan özelliğe sahip olduğu ayrıca oleuropein kadar da antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir [90]. Hidroksitirozol hakkında yapılan çalışmalarda bu bileşiğin antioksidan, antiinflamatuvar, antiaterojenik veya antiplatelet özellikleri tespit edilmiştir [91]. Flavonoidlerin önemli bileşenlerinden biri olan luteolin'in güçlü bir serbest radikal temizleyici olduğundan antiinflamatuvar ve antialerjik etkiler de dahil olmak üzere birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. Anti-mutajenik, antitümör, antikoagülan ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel etkilere sahiptir [92]. Apigenin birçok hastalığa karşı tedavi edici özelliğe sahiptir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antitümör, antialerjik, nöroprotektif, antimikrobiyal gibi birçok biyolojik faydası olduğu bilinmektedir. Apigenin'in antitümör etkileri, antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Apoptozu inhibe ederek kanser oluşumunu önlemede de etkilidir [93]. Diğer bir bileşik olan tirozolün ise, LDL oksidasyonunu önleyici, serbest nitrojen ve oksijen radikallerini temizleme gibi özelliklere sahip olduğu literatürde belirtilmiştir [94]. Bir diğer bileşik olan rutin hidratın ise antioksidan, antikanserojenik, sitoprotektif, antiplatelet, antitrombik, vazoprotektif ve kardiyoprotektif aktiviteler dâhil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca rutinin nöroprotektif bir ajan olduğu ve kalp, beyin ve iskelet kasında iskemik reperfüzyon hasarını iyileştirdiği bulunmuştur [89, 12]. Ferulik asit kanserlerin ve metabolik bozuklukların tedavisi ve önlenmesine yönelik terapötiklerin geliştirilmesi için aktif bileşenlerdendir [90]. Ayrıca ferulik asit, ROS (reaktif oksijen türleri) ile mücadelede çok etkili bir bileşiktir [91]. Aynı zamanda *in vitro* etkili bir antioksidan da olan kuersetinin, fizyolojik aralıkta olan 0.25 mmol/L konsantrasyonlarının LDL peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu nedenle kuersetin, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine katkıda bulunabilir [92, 93]. Yapılan çalışmalar kuersetinin kanseri önleme ve tedavisindeki etkisini ortaya koymaktadır [94]. *P*-kumarik asit ile ilgili çalışmalar incelendiğinde antioksidan özellikte olduğu, lipid peroksidasyonunu yüksek oranda inhibe ettiği, sıçanlarda LDL oksidasyon seviyesini

düşürdüğü ve akut enflamasyona neden olan, endotoksin lipopolisakkarit ile uyarılmış aktiviteyi inhibe ettiği ortaya konmuştur [95]. Kafeik asit, immünomodülatör, sitostatik, antibakteriyel, antifungal, antiproliferatif, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan ve serbest radikal bloke edici özelliklere sahiptir [96]. Vanilik asit, yılan zehiri aktivitesinin engellenmesi, karsinojenez, apoptoz ve enflamasyon gibi çeşitli farmakolojik aktivitelerle ilişkilendirilmiştir. Çeşitli çalışmalar, vanilik asidin bağışıklık veya enflamatuvar yanıtların yönetiminde etkinliğine dair kanıtlar sağlamıştır [97, 98].

2018 yılında Güneydoğu Tunus bölgesine ait 21 farklı zeytin kültivarı ile yapılan bir çalışmada %80'lik metanol ekstralarında kantitatif ve kalitatif fenolik bileşik analizi sonucunda oleuropein (110,38-4741,62 mg/kg), hidroksitirosol (5,40–290,19 mg/kg), apigenin 7 glukozit (9,44–2475,53 mg/kg), tirozol (2,10–174,62 mg/kg) dahil olmak üzere 12 ana fenolik bileşiğin varlığı tespit edilmiştir. Oleuropein en yüksek konsantrasyonu Fougi çeşidinde (4741,62 mg/kg) gösterirken, en düşük seviye ise Zarrazi çeşidinde (110,38 mg/kg) kaydedilmiştir. Bununla birlikte, Zalmati Zarzis yüksek konsantrasyonlarda tirozol, vanilik ve kafeik asit ve vanilin içerirken, genel olarak rutin ve luteolin 7- glukozid tespit edilen iki ana flavonoid olarak bildirilmiştir [95]. 2021 yılında Domat kültivarının fenolik bileşikleri LC-MS/MS ile araştırılmış; flavonol kuersetin, izorhamnetin, luteolin, beş fenolik asit (klorojenik, protokatekuik, 2,5-dihidroksibenzoik, kafeik ve gallik asit) ve ayrıca glikozitler oleuropein, verbaskozid ve rutin zeytin yaprağı ekstraktında daha yüksek miktarda belirlenmiştir [96]. 2021 yılında yapılan başka çalışmada zeytin yaprağı etanolik ekstraktının bileşimi LC-MS ile belirlenmiş ve aralarında luteolin ve rutinin baskın bileşikler olduğu ve önemli bir ursolik asit içeriğine sahip triterpenik asitlerin bulunduğu ortaya çıkarılmıştır [73]. Kiritsakis ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada Yunanistan bölgesine ait olan koroneiki, megaritiki ve kalamon kültivarlarının zeytin yaprağı fenolik bileşimini LC/MS kullanılarak belirlemişlerdir. Koroneiki ve kalamon çeşitleri için zeytin yaprağının % 60 metanol içeren ekstraktlarında belirlenen on ana bileşeni sekologanosid, dimetiloleuropein, oleuropein diglukozid, luteolin 7-glukozid, rutin, oleuropein, oleuroside, kuersetin, ligstrosid ve verbaskozid olarak belirlemişlerdir. Megaritiki kültivarı için ise ilgili bileşikler sekologanosid, dimetiloleuropein, oleuropein diglukozid, luteolin 7-glukozid, oleuropein, oleuroside, kuersetin ve ligstrosiddir. Her üç kültivarda da oleuropeinin ana fenolik bileşeni temsil ettiği rapor edilmiştir [97]. Tunus bölgesinde yetişen Chemlali kültivarıyla yapılan çalışmada zeytin yaprağı özü bileşimini incelemek için LC-MS/MS analizi

kullanılmıştır. Analiz sonucunda oleuropeinin, zeytin yapraklarındaki ana fenolik bileşik olduğu, içeriğinin yaprakların hasat zamanına bağlı olarak %17 ile %23 arasında değiştiğini belirlenmişlerdir. Ayrıca kloroformik zeytin yaprağı ekstraktında bulunan diğer maddeler arasında gallik asit, hidroksitirosol, kafeik asit, rutin, verbaskozid, luteolin 7-glukozid, oleuropein heksosid I, isoverbaskozid, apigenin 7-glukozid, 60-O-[(2E)-2,6-dimetil-8-hidroksi-2-oktenoiloksi]-sekologanosid ve jaspolyoside III de bulunduğu belirtilmiştir [98]. Kuzeybatı Yunanistan bölgesinde toplanan ve metanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşik dağılımı LC-MS ile belirlenmiş ve diğer çalışmalarda olduğu gibi ana bileşiğin oleuropein olduğu ayrıca analiz sonucunda diğer bileşiklerin hidroksitirosol, hidroksitirosol asetat ve flavonoidler luteolin, luteolin-7-glukozid ve luteolin-4-glukozid olduğu rapor edilmiştir [99]. Sifaoui ve arkadaşları Tunus bölgesine ait Swebea Elgia kùltürü ile yaptıkları çalışmada, fenolik bileşiklerin tayini için en iyi ekstraksiyon metodunun %12,7 su, %14,8 etanol ve %72,5 metanol olduğunu belirtmişlerdir. LC-MS analizi sonucunda oleuropein ve luteolin-7-glukozid, gallik asit rutinin ana bileşik olduğunu ortaya çıkarmışlardır [76].

4.2 Antioksidan Kapasite Sonuçları

Çalışmamızda kullanılan *Olea europaea* L. cv. Uslu, *O. europaea* L. cv. Domat, *O. europaea* L. cv. Gemlik ve *O. europaea* L. cv. Kiraz kùltürlerine ait zeytin yapraklarının su, metanol ve etanol ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri DPPH ve ABTS ile araştırılmıştır. Her numunenin IC₅₀ değerleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir ve numuneler pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit (0,1 mg/mL) ile karşılaştırılmıştır. Tablo 3.2'deki DPPH ve ABTS verilerine bakıldığında, gallik asit için DPPH IC₅₀ sonucu $1,60 \pm 0,00$ µg/mL ve ABTS IC₅₀ sonucu $0,970 \pm 0,001$ µg/mL olarak tespit edilmiştir. *O. europaea* L. cv. Uslu kùltürüne ait örneklerin DPPH verileri 0.16 – 0.21 µg/µL arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise su ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır (0.16 ± 0.01 µg/µL). *O. europaea* L. cv. Uslu kùltürüne ait örneklerin ABTS verileri 0.029 – 0.063 µg/µL arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise etanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır (0.029 ± 0.003 µg/µL). *O. europaea* L. cv. Domat kùltürüne ait örneklerin DPPH verileri 0.16 – 0.21 µg/µL arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise etanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır (0.16 ± 0.02 µg/µL). *O. europaea* L. cv. Domat kùltürüne ait örneklerin ABTS verileri 0.023 – 0.079 µg/µL arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise etanol ile hazırlanan zeytin yaprağı

ekstraktında saptanmıştır ($0.029 \pm 0.002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). *O. europaea* L. cv. Gemlik kùltivarına ait örneklerin DPPH verileri $0.19 - 0.24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise metanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır ($0.19 \pm 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). *O. europaea* L. cv. Gemlik kùltivarına ait örneklerin ABTS verileri $0.039 - 0.073 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise metanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır ($0.039 \pm 0.002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). *O. europaea* L. cv. Kiraz kùltivarına ait örneklerin DPPH verileri $0.14 - 0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise su ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır ($0.14 \pm 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). *O. europaea* L. cv. Kiraz kùltivarına ait örneklerin ABTS verileri $0.028 - 0.040 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite ise etanol ile hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktında saptanmıştır ($0.028 \pm 0.002 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Literatùre bakıldığında 2019 yılında Effasi ve arkadaşlarının dört farklı zeytin kùltivarının (Chemlali, Sayali, Neb jmel, Meski) %80'lik metanol ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan kapasitesini DPPH yöntemi kullanarak araştırmışlar ve IC_{50} değerlerini belirlemişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre en düşük antioksidan kapasiteyi Sayali ($63.52 \pm 0,47 \mu\text{L}$) kùltivarında, en yüksek antioksidan kapasite ise Meski kùltivarında tespit edilmiştir ($41.56 \pm 0.41 \mu\text{L}$) [100]. Rafiee ve arkadaşları İran bölgesine ait Cronaiky ve Roghani cinsi zeytin yapraklarının %80 metanol, aseton ve su ile hazırladıkları ekstaktların antioksidan kapasitelerini DPPH yöntemi ile araştırmışlardır. Her iki kùltivarda da en iyi sonuçları metanol ile hazırlanan ekstraktlardan elde etmişlerdir. (Cronaiky: $86.81 \pm 043 \mu\text{L}$ Roghani $90.05 \pm 0.28 \mu\text{L}$) En düşük sonuçlar ise yine her iki türde de aseton ile hazırlanan ekstraktlardan elde edilmiştir (Cronaiky: $168 \pm 0.11 \mu\text{L}$ Roghani $165 \pm 0.5 \mu\text{L}$) [101]. Suudi Arabistan bölgesine ait Koroneiki kùltivarına ait zeytin yapraklarının %80' lik metanol ile hazırlanan ekstraktlarının DPPH ile araştırılan antioksidan kapasitesinin IC_{50} değeri $36,88 \text{ mg/ml}$ olarak tespit edilmiştir [102]. 2015 yılında DoleceAgogia, Mission, Moriolo, Maurino, Carotina, Leccino, Gemlik ve Uslu kùltivarlarının DPPH yöntemi ile yapılan antioksidan kapasite sonuçlarının IC_{50} değerleri, $22.46 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Leccino), $23.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Gemlik), $29.64 \mu\text{g}/ \text{mL}$ (DolecaAgogia), $46.34 \mu\text{g}/ \text{mL}$ (Moriolo), $82.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Mission), $115.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Uslu), $196 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Frantio) ve $198 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Carotina) olarak tespit edilmiştir [103]. Brezilya bölgesine ait olan Arbequina, Koroneiki ve Arbosana kùltivarlarının etanol ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri ABTS metodu ile araştırılmış ve $0.12 \text{ kg TEAC kg}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir [104]. Abaza ve

arkadaşlarının yaptıkları çalışma da ise farklı çözücüler kullanarak hazırladıkları ekstraktların antioksidan kapasitelerini ABTS yöntemi ile araştırmış ve 0,014 – 0,025 kg TEAC kg⁻¹ olarak tespit etmişlerdir [105]. 2021 yılında yapılan başka bir çalışmada ise üç farklı çözücü kullanarak hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri ABTS ve DPPH yöntemleri ile araştırılmış ve sonuç olarak su ile hazırlanan ekstraktların ABTS IC₅₀ değerleri 0.557 ± 0.005 mg/ml, metanol ile hazırlanan ekstraktların 0.820 ± 0.006 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Fakat etil asetat ile hazırlanan ekstraktların ABTS değeri tespit edilememiştir. Su ile hazırlanan ekstraktların DPPH IC₅₀ değerleri 1.082 ± 0.004 mg/ml, metanol ile hazırlanan ekstraktların 0.723 ± 0.002 mg/ml, etil asetat ile hazırlanan ekstraktların 1.420 ± 0.007 mg/ml olarak tespit edilmiştir [106].

Çalışmamızdaki antioksidan aktivite sonuçları birbirleri ile kıyaslandığında DPPH testinde *Olea europaea* L. cv. Uslu ve *O. europaea* L. cv. Kiraz kültürlerinde en iyi sonuçlar su ile hazırlanan ekstraktlarda; *O. europaea* L. cv. Domat kültüründe en iyi sonuç etanol ile hazırlanan ekstraktta; son olarak *O. europaea* L. cv. Gemlik kültüründe ise metanol ile hazırlanan ekstraktta tespit edilmiştir. ABTS testinde en iyi sonuçlar ise *O. europaea* L. cv. Uslu, *O. europaea* L. cv. Domat ve *O. europaea* L. cv. Kiraz kültürlerinde etanol ile hazırlanan ekstraktlarda, *O. europaea* L. cv. Gemlik kültüründe ise metanol ile hazırlanan ekstraktta tespit edilmiştir. Genel olarak kıyaslandığında ise en yüksek DPPH değeri su ile hazırlanan *O. europaea* L. cv. Kiraz kültüründe (0,14 ± 0,01 µg/µL), ABTS testinde ise etanol ile hazırlanan *O. europaea* L. cv. Domat kültürü (0,023 ± 0,002 µg/µL) ekstraktında belirlenmiştir. Genel olarak antioksidan aktivite sonuçlarına bakıldığında değerlerin birbirlerine oldukça yakın oldukları görülmektedir. Yani çalıştığımız kültürlerde antioksidan kapasitenin oldukça güçlü olduğu söylenilebilir. Sonuçlar literatür ile kıyaslandığında çalışmamızda kullandığımız *O. europaea* türüne ait kültürlerin antioksidan kapasite değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Diğer karşılaştırılan kültürlerle arasındaki farkın coğrafi şartlar, çözücü farkı, edafik faktörler ve yaprakların toplanma zamanından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bu yüksek antioksidan aktiviteler, yüksek miktarda toplam fenolik içerikleri ve flavonoidler gibi bazı biyoaktif bileşiklerin varlığı ve özellikle iyi bilinen bir antioksidan türevi olan oleuropein nedeniyle olabilir. İlginç bir şekilde, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, diğer fenolik bileşiklerin de zeytin yapraklarının antioksidan aktivitesine dahil olabileceğini göstermiştir. Örneğin, daha önce *O. europaea*'da tanımlanan rutin yüksek

kolesterol diyetiyle beslenen farelerde oksidatif stresin neden olduğu zayıflatılmış hepatotoksisiteyi azalttığını tespit edilmiştir. Ayrıca, daha önce yapılan bir çalışma, luteolin'in oksidatif stresi azaltarak diyabetin neden olduğu kardiyak disfonksiyonun ilerlemesine karşı koruyucu etkiler sağlayabileceğini öne sürülmüştür. Hidroksitirosol ve oleuropeinin *in vivo* antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [107]. Bu nedenle, antioksidan aktivitenin ekstraksiyon kurutma yöntemlerine ve çeşitlere bağlı olduğu ve test edilen bitkilerde kimyasal bileşimden etkilendiği sonucuna varabiliriz [108]. Fenoller, oleuropeitler ve flavonoidlerin, fenolik hidroksil gruplarının redoks özellikleri ve kimyasal yapılarındaki yapısal ilişkiler nedeniyle serbest radikallere karşı önemli antioksidan aktivite gösterdikleri kanıtlanmıştır. Diğer araştırmalar, polifenollerin, nötrofillerin oksidatif patlama aktivitesini azaltmanın yanı sıra artan düzenleyici T hücresi ve splenosit üretimiyle sonuçlanan insan bağışıklık sistemini modüle etme yeteneğini göstermiştir [109].

4.3 Sitotoksikite Testi Sonuçları

Bitki ekstraktları günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak güvenli bir şekilde kullanılacakları toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi için sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesine ihtiyaç vardır [110]. Bu sebeple çalışmamızda *O. europaea* L. cv. Uslu, *O. europaea* L. cv. Domat, *O. europaea* L. cv. Gemlik ve *O. europaea* L. cv. Kiraz kültürlerinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının konsantrasyona ve süreye bağlı olarak sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTS testi ile belirlenmiştir.

4.3.1 MTS Testi Sonuçları

O. europaea L. cv. Uslu kültürüne ait MTS testi sonuçları Şekil 3.1' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre Şekil 3.1 (a)' da *O. europaea* L. cv. Uslu kültürüne ait yaprakların etanol ile hazırlanan ekstraktlarının 0.1mg/L ve 0.25 mg/L dozları 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlandı. ($p < 0.05$). 48 Saatlik inkübasyon sonrasında ise 0.1 mg/L doz negatif kontrole göre anlamlı bir absorban yükseliğine sebep olurken 50 ve 100 mg/L dozlarda negatif kontrole kıyasla absorbansta önemli bir düşüş gözlemlendi ($p < 0.05$). Şekil 3.1 (b) sonuçlarına göre Uslu kültürünün metanol ile hazırlanan ekstraktlarında 0.1, 0.25, 0.5, ve 1 mg/L 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta önemli bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). 48 Saatlik inkübasyon sonrasında ise 50 ve 100 mg/L dozlarda

negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$). Şekil 3.1 (c) sonuçlarına göre *O. europaea* L. cv. Uslu kültivarına ait yaprakların su ile hazırlanan ekstraktlarının 0.25 mg/L dozu 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlanmıştır. 50 mg/L dozda ise negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$). 48 Saatlik inkübasyon sonuçları incelendiğinde neredeyse tüm dozlar birbirlerine yakın absorbans değerleri gösterirken sadece 50 mg/L dozda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$).

O. europaea L. cv. Domat kültivarına ait MTS testi sonuçları Şekil 3.2' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre Şekil 3.1 (a)' da *O. europaea* L. cv. Domat kültivarına ait yaprakların etanol ile hazırlanan ekstraktlarının 0.1mg/L ve 0.25 mg/L dozları 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlanmıştır. ($p<0.05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 100 mg/L dozda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$). Şekil 3.2 (b) incelendiğinde 0.1, 0.25, 0.5 mg/L dozları 24 saat inkübasyon sonrasında negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir absorbans artışına sebep olmuştur ($p<0.05$). 100 mg/L dozu ise 48 saat inkübasyon süresi sonrasında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüşüne sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Şekil 3.2 (c) sonuçlarına göre *O. europaea* L. cv. Domat kültivarına ait yaprakların su ile hazırlanan ekstraktlarının 0.25 mg/L dozu 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlandığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

100 mg/L dozu ise 48 saat inkübasyon süresi sonrasında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans düşüşüne sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) ve diğer dozlarda birbirlerine yakın absorbans değerleri tespit edilmiştir.

O. europaea L. cv. Gemlik kültivarına ait MTS testi sonuçları Şekil 3.3' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre Şekil 3.3 (a)' da *O. europaea* L. cv. Gemlik kültivarına ait yaprakların etanol ile hazırlanan ekstraktlarının 1 mg/L dozları 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlanmıştır ($p<0.05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorbans artışı gözlenmemesine rağmen negatif kontrol ile yaklaşık aynı absorbans değerleri elde edilmiştir. Şekil 3.3 (b) sonuçlarına göre Gemlik kültivarının metanol ile hazırlanan ekstraktlarında 1 mg/L dozda 24 saat inkübasyon sonrasında negatif kontrole

göre istatistiksel olarak anlamlı bir absorban artışına sebep olmuştur ($p<0.05$). 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 25, 50 ve 100 mg/L dozlarda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorban düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$). Şekil 3.3 (c) sonuçlarına göre *O. europaea* L. cv. Gemlik kùltivarına ait yaprakların su ile hazırlanan ekstraktlarının 0.1, 0.25 ve 1 mg/L dozu 24 saatlik inkübasyondan sonra negatif kontrole kıyasla absorbansta istatistiksel olarak anlamlı bir artışla sonuçlandığı tespit edilmiştir. ($p<0.05$). 48 saatlik inkübasyon sonuçları incelendiğinde neredeyse tüm dozlar birbirlerine yakın absorban değerleri gösterdiği saptanmıştır.

O. europaea L. cv. Kiraz kùltivarına ait MTS testi sonuçları Şekil 3.4' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre Şekil 3.4 (a)' da *O. europaea* L. cv. Kiraz kùltivarına ait yaprakların etanol ile hazırlanan ekstraktlarının 24 saat inkübasyon sonrasında negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorban artışı gözlenmemesine rağmen negatif kontrol ile yaklaşık aynı absorban değerleri elde edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 1 mg/L doz negatif kontrole göre anlamlı bir absorban yüksekliğine sebep olmuştur ($p<0.05$). Şekil 3.4 (b) sonuçlarına göre Kiraz kùltivarının metanol ile hazırlanan ekstraktlarında 24 saatlik inkübasyonun ardından negatif kontrole göre absorbansta anlamlı bir artış görülmesi de negatif kontrol ile yaklaşık olarak aynı absorban değerleri elde edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 50 ve 100 mg/L dozlarda negatif kontrole kıyasla anlamlı bir absorban düşüklüğü saptanmıştır ($p<0.05$). Şekil 3.4 (c) sonuçlarına göre *O. europaea* L. cv. Kiraz kùltivarına ait yaprakların su ile hazırlanan ekstraktlarının 1 mg/L dozu 24 saat inkübasyon sonrasında negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir absorban yüksekliğine sebep olurken 48 saatlik inkübasyon sonuçları incelendiğinde neredeyse tüm dozlar birbirlerine yakın absorban değerleri göstermiştir ($p<0.05$).

O. europaea kùltivarlarının yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının 0-100 mg/L doz aralığında lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTS testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel veriler incelendiğinde tüm ekstraktların özellikle (0.1-25 mg/L) konsantrasyonlarının lenfosit hücrelerinin canlılığını desteklediği ve tanımlanan doz aralığında sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Diğer taraftan inkübasyon süresinin ve konsantrasyonların (50-100 mg/L) arttırılmasının ekstraktın hücre canlılığı üzerindeki etkisini azalttığı da bulunmuştur. Bu sistotoksik etkinin ise ekstraktlardaki verbaskozid konsantrasyonlarının yüksek olmasına atfedilebilir. Yüksek

konsantrasyonlardaki verbazkozidin sağlıklı hücrelerin mebran yapısını bozarak hücre canlılığını azalttığı literatürde de belirtilmiştir [111].

Literatürdeki ilgili çalışmalar incelendiğinde; 2016 yılında yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstresi ve epirubisin ile kombinasyonunun sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığı ATP testi kullanılarak MDA-MB- 231 ve MCF-7 hücre hatlarında ölçülmüştür. Apoptozis, poli-(ADP-riboz) polimeraz (PARP) kırılması ve apoptozis ilişkili genlerin ifadeleri kullanılarak saptanmıştır. Sonuç olarak hem zeytin yaprağı ekstresi hem epirubisin doza bağlı olarak her iki hücre hattında da sitotoksik etkiye neden olmuştur. Ekstre, MDA-MB-231 hücre hattında epirubisinin sitotoksik etkisini daha da arttırmıştır. Ancak buna karşın, MCF-7 hücre hattında epirubisinin sitotoksik etkisini bozmuştur. Doğrulayıcı bir sonuç olarak, MCF-7 hücrelerinde epirubisin uygulamasıyla artan FASLG ve HRK ifadeleri, epirubisin ekstre ile kombinasyon halinde kullanıldığında düşmüştür [112]. 2021 yılında yapılan bir başka çalışmada ise zeytin yaprağının etanolik yaprak ekstraktlarının kardiyotoksisite ve Wistar sıçanlarında doksorubisin (DOX) tarafından indüklenen oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyler sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının karaciğer kanseri hücre hattında DOX'un sitotoksitesini güçlendirdi ve kardiyotoksitesine karşı korumada rol oynayabileceği, bu nedenle, doksorubisinin karaciğer kanserini tedavi eden yardımcı bir faktör olabileceği ortaya konmuştur [113].

Mädälina Borugă ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada LC-MS ile zeytin yaprağı etanolik ekstraktının bileşimi belirlenmiş, A375 insan melanom hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksitesite, MTT testi (canlı hücre sayısı), Annexin V-FITC vasıtasıyla belirlemişlerdir. Ekstrakt, aralarında luteolin ve rutin baskın bileşikler ve önemli bir ursolik asit içeriğine sahip triterpenik asitler olduğu bir dizi polifenol içerdiği tespit edilmiştir. Test edilen en yüksek konsantrasyonda, 100 µg/mL'de, insan melanom hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki olduğu, büyüyen kılcal damarların gelişimini etkilediği, daralmış kılcal damarları indüklediği, ancak HET-CAM üzerinde hiçbir toksisite belirtisi kaydedilmediği belirtilmiştir [73]. 2011 yılında yapılan çalışmada zeytin yaprağı özlerinin A549 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etki MTT testi ile araştırılmıştır. Test sonucunda zeytin yaprağı özleri belirli dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. A549 hücreleri üzerinde uygulanan dozların 24 saatlik muameleleri sonucunda 750µg/ml'lik doz düşük miktarda sitotoksik gösterirken aynı miktarda dozun 48 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 50'den daha fazla azalttığı, 1000 µg/ml'lik dozda ise 24 saatten itibaren hücre canlılığının belirgin biçimde azalmaya başladığı tespit edilmiştir

[114]. Mădălina Borugă ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada LC-MS ile zeytin yaprağı etanolik ekstraktının bileşimi belirlenmiş, A375 insan melanom hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksosite, MTT testi (canlı hücre sayısı), Annexin V-FITC vasıtasıyla belirlemişlerdir. Ekstrakt, aralarında luteolin ve rutin baskın bileşikler ve önemli bir ursolik asit içeriğine sahip triterpenik asitler olduğu bir dizi polifenol içerdiği tespit edilmiştir. Test edilen en yüksek konsantrasyonda, 100 µg/mL'de, insan melanom hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki olduğu, büyüyen kılcal damarların gelişimini etkilediği, daralmış kılcal damarları indüklediği, ancak HET-CAM üzerinde hiçbir toksisite belirtisi kaydedilmediği belirtilmiştir [73].

4.4 Genotoksisite Test Sonuçları

Günümüzde şifalı bitkiler etnobotanik olarak yaygın kullanıldığından ve yeni ilaçların geliştirilmesi için bir kaynak olduğu için, hem güvenlik hem de ekonomik kaygılar açısından mutajenik potansiyellerini doğrulamak amacıyla bitki özlerinin/maddelerinin klinik öncesi değerlendirmesi sırasında genotoksitenin değerlendirilmesi son derece önemlidir [115]. Bu sebeple çalışmamızda *O. europaea* cv. Uslu, *O. europaea* cv. Domat, *O. europaea* cv. Gemlik ve *O. europaea* cv. Kiraz kültürlerinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının genotoksik potansiyelleri *in vitro* genotoksisite testi ile araştırılmıştır.

4.4.1 Mikronükleus Testi Sonuçları

Çalışmamızda elde edilen mikronükleus test sonuçlarına bakıldığında negatif kontrolün %MN oranı $10,37 \pm 0,21$, H₂O₂'nin (6,5 µg/ml) %MN oranı $25,39 \pm 0,34$ olarak bulunmuştur. H₂O₂ için %MN'deki artış, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı belirlenmiştir. ($p < 0,05$) Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin H₂O₂ dozu ile birleştirilen 50 mg/L metanol, su, ve etanol özleri ile elde edilen % MN'deki azalma, pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. ($p < 0,05$). Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan metanol, su ve etanol ekstraktlarının mikronükleus sonuçları Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, 50 mg/L'lik bir dozun H₂O₂'nin (6,5 µg/mL) genotoksik etkilerini gidermesindeki potansiyeli araştırılmıştır. *Olea europaea* cv. Uslu kültürünün yaprak kısımlarının su ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı $11,6 \pm 0,47$ olarak tespit edilmiştir. Bu dozdaki artış, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı $13,26 \pm 0,06$ olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN

oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 83.25 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Uslu kültivarının yaprak kısımlarının etanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 13.68 ± 0.50 olarak tespit edilmiştir. Bu dozdaki artış, negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 16.92 ± 0.53 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 55.9 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Uslu kültivarının yaprak kısımlarının metanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 12.82 ± 0.93 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 18.05 ± 0.67 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 55.06 inhibisyon değerini vermiştir. Sonuçlara göre en iyi % inhibisyon değeri *Olea europaea* cv. Uslu kültivarının yaprak kısımlarının su ekstraktında elde edilmiştir. (%83.25)

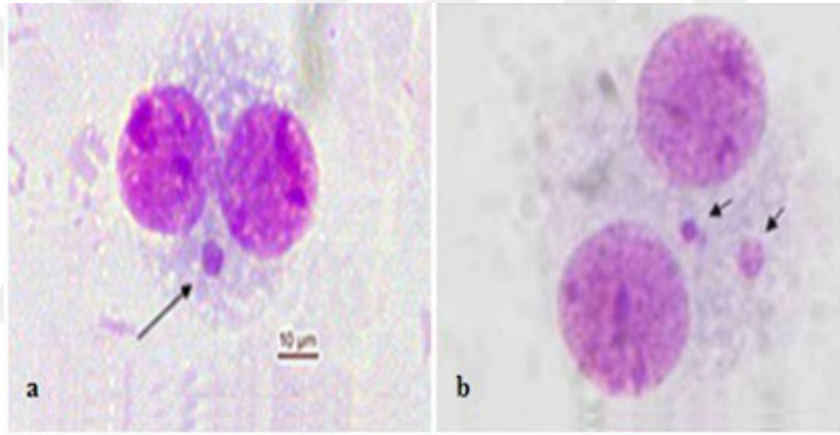
Olea europaea cv. Domat kültivarının yaprak kısımlarının su ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 12.44 ± 0.30 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 14.83 ± 0.11 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 72.21 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Domat kültivarının yaprak kısımlarının etanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 13.79 ± 0.53 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 16.31 ± 0.20 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 61,68 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Domat kültivarının yaprak kısımlarının metanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 14.73 ± 0.52 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 17.56 ± 0.34 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 54.78 inhibisyon değerini vermiştir. Sonuçlara göre en iyi % inhibisyon değeri *Olea europaea* L. cv. Domat kültürünün yaprak kısımlarının su ekstraktında elde edilmiştir. (%72.21)

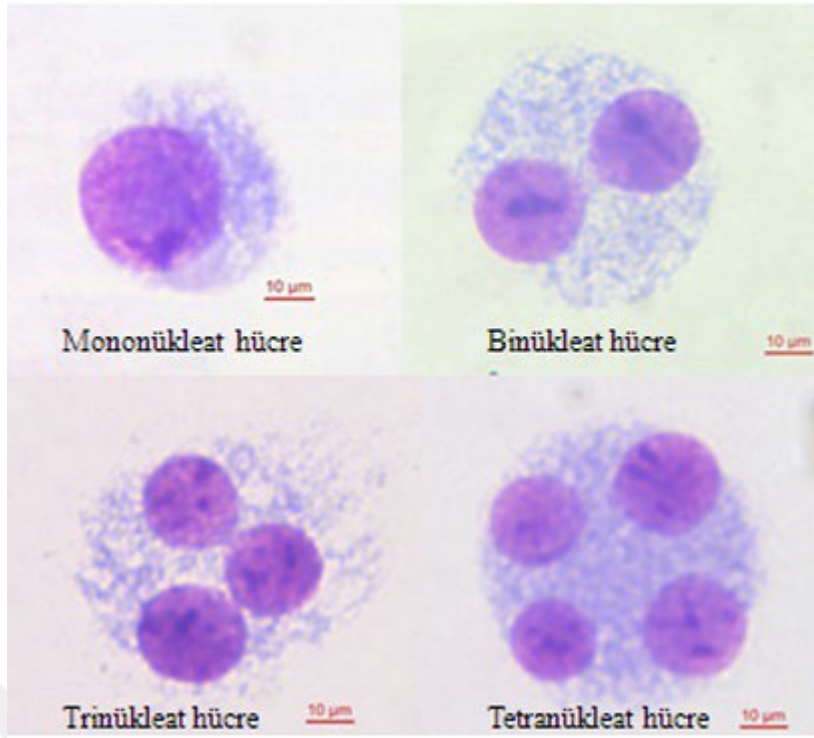
Olea europaea cv. Gemlik kültürünün yaprak kısımlarının su ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 12.17 ± 0.24 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 13.65 ± 0.43 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 80.71 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* L. cv. Gemlik kültürünün yaprak kısımlarının etanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 11.67 ± 0.36 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 13.21 ± 0.72 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 76.4 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Gemlik kültürünün yaprak kısımlarının metanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 13.38 ± 0.30 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 14.21 ± 0.41 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 72.24 inhibisyon değerini vermiştir. Sonuçlara göre en iyi % inhibisyon değeri *Olea europaea* L. cv. Gemlik kültürünün yaprak kısımlarının su ekstraktında elde edilmiştir. (%80.71)

Olea europaea cv. Kiraz kültürünün yaprak kısımlarının su ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 11.21 ± 0.39 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 12.97 ± 0.49 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozu % 86.29 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* cv. Kiraz kültürünün yaprak kısımlarının etanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 12.08 ± 1.30 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla

kombinasyonunun % MN oranı 11.95 ± 0.21 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 50 mg/L dozu % 92.34 inhibisyon değerini vermiştir. *Olea europaea* L. cv. Kiraz kùltivarının yaprak kùsùmlarının metanol ekstraktının 50 mg/L dozunun % MN oranı 11.72 ± 0.49 olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında bu dozdaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 50 mg/L dozunun H₂O₂ dozuyla kombinasyonunun % MN oranı 11.75 ± 0.82 olarak bulunmuştur ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında % MN oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 50 mg/L dozu % 85.97 inhibisyon değerini vermiştir. Sonuçlara göre en iyi % inhibisyon değeri *Olea europaea* L. cv. Kiraz kùltivarının yaprak kùsùmlarının etanol ekstraktında elde edilmiştir. (%92.34)



Şekil 4.1: a- Bir MN, b- İki MN içeren binükleat hücreler [54]



Şekil 4.2: Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler [54]

LC-MS/MS sonuçlarına bakıldığında kültürlerin önemli oranda yüksek oleuropein konsantrasyonuna sahip olduğu görülmektedir. Oleuropeinin, immün düzenleyici eylemleri desteklemenin yanı sıra kansere ve kalp hastalığına karşı koruyucu özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır. Oleuropein, kültürde insan tümör hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını inhibe eder. oleuropeinin kanser hücrelerini geri dönüşümsüz bir şekilde motiliteyi, replikasyonu ve invazivliği inhibe ettiğini ve bu etkilerin normal hücrelerde tedavi kaldırıldığında geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir [109].

Literatüre bakıldığında 2014 yılında yapılan bir çalışmada kuru zeytin yaprağı ekstresinin insan lökositlerinde adrenalin kaynaklı DNA hasarına karşı etkisini comet testi kullanarak araştırmışlardır. 6 sağlıklı denekten alınan periferik kan lökositleri, iki farklı protokol, ön tedavi ve tedavi sonrası olmak üzere 37 ° C'de 30 dakika süreyle üç nihai kuru zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu (0.125, 0.5 ve 1 mg / mL) ile *in vitro* olarak uygulanmıştır ve kuru zeytin yaprağı ekstresinin adrenalin tarafından indüklenen DNA lezyonlarının oluşumunu hafifletme kabiliyeti değerlendirilmiştir. Yalnızca adrenaline maruz kalan hücrelere kıyasla, kuru zeytin yaprağı ekstresinin, her üç konsantrasyonda ve her iki deney protokolünde DNA hasarında önemli bir azalma ($p < 0.001$) gösterdiği

belirlenmiştir. Pearson korelasyon analizi, kuru zeytin yaprağı ekstresinin konsantrasyonu ile lökosit DNA hasarı arasında anlamlı bir pozitif ilişki ortaya çıkarmıştır ($p < 0.05$) [116]. Topalovic ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada ise standartlaştırılmış bir kuru zeytin yaprağı ekstraktının insan tam kan hücrelerinde 17β -estradiol ve dietilstilbestrol tarafından indüklenen DNA hasarı üzerindeki antigenotoksik potansiyeli *in vitro* olarak comet testi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak kuru zeytin yaprağı ekstraktı, test edilen konsantrasyonlarda (0.125, 0.5 ve 1 mg/mL) tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere iki deneysel protokol altında östrojen kaynaklı DNA hasarı olan hücre sayısını azaltmada etkili olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak kuru zeytin yaprağı ekstraktının koruyucu potansiyelinin, radikal süpürme etkisinden ve hücrelerin antioksidan kapasitesini artırmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [67]. 2020 yılında yapılan bir çalışmada iki romatoid artrit hastası grubunda periferik kan lenfositlerindeki sitogenetik değişiklikleri kromozom aberasyon ve mikronükleus testi ile değerlendirmişlerdir. Kuru zeytin yaprağı ile tedaviden önce her iki grupta da yüksek frekansta kromozom aberasyon ve mikronükleus tespit edilmiştir. Tedaviden sonra her iki frekansta da azalma olmasına rağmen başlangıca göre anlamlı bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak romatoid artrit hastalığında sadece zeytin yaprağı ekstresinin yeterli olamayacağı rapor edilmiştir [117]. Zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin (Ag-NP) genotoksik etki üzerindeki olası etkilerini incelemek amacıyla iki aylık toplam otuz albino fare üzerinde (beş tedavi grubu) yapılan bir çalışma da ise kromozom aberasyon testi kullanılmıştır. Araştırma sonucunda kontrol ve ham zeytin yaprağı ekstraktı grupları ile karşılaştırıldığında tüm Ag-NP gruplarında kromozomal aberasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($p < 0.05$) gözlemlendiği ayrıca Ag-NP'lerin oral yoldan verilmesi farelerde genotoksik hasara neden olabileceği; hem çevre hem de insan sağlığı için bir risk teşkil ihtimalini ortaya çıkarmıştır [118]. Turkez ve arkadaşları (2012) zeytin yaprağı ekstresinin sıçanlarda permetrinin indüklediği genotoksik ve oksidatif hasarı modüle etmeyi amaçlamışlardır. Kullanılan hayvanları genel olarak dört (A, B, C ve D) deneysel gruba ayırmışlardır. Grup A sıçanları, kontrol hayvanları olarak görev yapmış ve intraperitoneal olarak damıtılmış su, Grup B ve C sıçanlarına sırasıyla intraperitoneal permetrin (60 mg kg^{-1} canlı ağırlık) ve zeytin yaprağı ekstresi (500 mg kg^{-1} canlı ağırlık) enjeksiyonları, Grup D sıçanları permetrin (60 mg kg^{-1} canlı ağırlık) artı zeytin yaprağı ekstresi (500 mg kg^{-1} canlı ağırlık) enjeksiyonları 21 gün boyunca uygulanmıştır. Genotoksik hasar, mikronükleus ve kromozomal aberasyon deneyleri ile değerlendirilmiştir ve sonuç olarak zeytin yaprağı özütünün yararlı etkilere sahip olduğu ve

permetrin toksisitesini antagonize edebildiği sonucuna varılmıştır [69]. Soni ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada ise sulu zeytin özlerinin kullanımının güvenliğini ve özellikle de hidroksitirozolün toksisitesini belirlemeyi amaçlamışlardır. Fareler üzerinde *in vivo* mikronükleus test sonuçlarına göre farelerin 29 gün boyunca 5000 mg/kg/gün'e kadar doz seviyelerinde hidroksitirozole oral maruziyeti, kemik iliğinde polikromatik eritrositlerde artışına neden olmadığı tespit edilmiştir [119]. Polikromatik eritrosit sayısındaki artış kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu meydana gelen sitogenetik hasarın bir göstergesidir [54].

4.4.2 *In vivo* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Sonuçları

Somatik hücrelerdeki mutasyonlar kanserin başlamasında ve karsinejenik sürecin diğer aşamalarında köklü rol oynarlar. Bu anormal hücresel sürecin indüksiyonunu belirlemek için en sık kullanılan tekniklerden birisi SMART testidir. Sineklerin somatik hücrelerinde indüklenmiş genetik değişikliklerin ve heterozigotluk kaybının tespitine dayanan bu prosedür ökaryotik hücrelerde basit ve karmaşık maddelerin genotoksitesini ve antigenotoksitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir prosedürdür [120] [59]. Çalışmamızda *Olea europaea* Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerine ait su, metanol ve etanol ekstraktlarının SMART testi sonuçları Tablo 3.4-Tablo 3.7' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre kanat başına en yüksek tek ve çift nokta frekansların bütün kültürlerde H₂O₂ uygulamalarında gözleendiği ayrıca bu artışların istatistiksel anlamda anlamlı olduğu tespit edilmiştir. ($p < 0.05$). Büyük tek noktalar çok nadir görülse de burada da en yüksek frekans değeri yine tüm kültürlerde H₂O₂ uygulamalarında gözlenmiştir. Uslu kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktları incelendiğinde kanat başına küçük tek nokta frekansları, H₂O₂ uygulanan örneklere göre sırasıyla 4.44, 5.71 ve 4.00 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,05$). Domat kültürüne ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının küçük tek nokta frekanslarına bakıldığında H₂O₂ uygulanan örneklere kıyasla sırasıyla 4.44, 10.00 ve 13.30 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,05$). Çalışmada kullanılan Gemlik kültürünün su, etanol ve metanol ekstraktlarının küçük tek nokta frekansları incelendiğinde H₂O₂ uygulanan örneklere kıyasla sırasıyla 6.66, 6.66 ve 10.00 kat, kiraz kültüründe ise bu oranın 5.00, 4.44 ve 6.66 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,05$) Tüm verilere bakıldığında *Olea europaea* Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerine ait su, metanol ve etanol ekstraktlarının *Drosophila melanogaster* kanadında somatik mutasyonları anlamlı bir şekilde önlediği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda oksijen-radikal mekanizmalarına, gen mutasyonuna, kromozomal aberasyona ve DNA tek sarmal kırılmaları yoluyla DNA' da hasarı oluşturduğu bildirildiği için H₂O₂, SMART testinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalıştığımız kültürlerde özellikle Domatta oleuropein, 3-hidroksitirozol, luteolin, luteolin 7-glukozid ve verbazkozid fenolik bileşenlerinin yoğunluğu göze çarpmaktadır. Oleuropein, düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂ tarafından üretilen DNA hasarlarını azaltmaktadır. Oleuropein gibi antioksidan kapasitesi yüksek olan moleküllerin, kanserojenlerin etkilerini bloke etmek, kanserojenlerin detoksifikasyonunda görevli olan bazı enzimlerin seviyesini arttırmak (glutatson s transferaz), DNA onarımının uyarılması gibi mekanizmalarla fonksiyonları açıklanabilir [66]. Hidroksitirozolün, özellikle düşük H₂O₂ konsantrasyonlarının indüklemiş olduğu zararı önemli ölçüde azalttığı literatürde de bildirilmiştir. Hidroksitirozolün farklı hücre tiplerinde DNA oksidatif hasarı önlediğini, hidroksil radikallerini etkili bir şekilde temizlediği de bilinmektedir. Bir polifenolik birleşik olan verbezkozidin lipid peroksidasyonunu önlediği, hidroksil radikallerini etkisiz hale getirdiği ve bunlara bağlı olarak da H₂O₂ tarafından indüklenen genomik DNA hasarlarının giderilmesinde rol aldığı literatürde bildirilmektedir [111]. Luteolinin kromozom değişikliklerini inhibe ettiği, antitömörojenik, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda luteolin antiproliferatif etkilerinin olduğu da bildirilmektedir. Ayrıca oleuropein ve luteolin *in vitro* kaspas aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Bu sürecin genellikle hücre programlı bir ölüme yol açmak için gerekli olduğu düşünülür. Bu sisteinproteaz ailesi apoptoz geçiren hücrelerde gözlenen tipik morfolojik değişikliklere yol açan hücre iskeleti gibi anahtar hücre proteinlerinin bölünmesinden sorumludur [66].

Literatüre bakıldığında Anter ve arkadaşları (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarındaki temel biyoaktif fenoller ve miktarları belirlenmiş ve bunların genotoksik / antijenotoksik, sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. *Drosophila melanogaster*'in kanat imajinal disklerinde somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), genel zeytin yaprağı ekstraktlarının ve farklı konsantrasyonlarda oleuropein ve luteolin'in ayrı bileşenlerinin olası genotoksitesini test etmek için gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraktlar H₂O₂ ye karşı antigenotoksik aktivite ile birlikte, DNA koruması açısından oleuropein ve luteolin'in güvenliğini ortaya çıkarmıştır [66]. 2009 yılında ticari olarak satılan Yunanistan bölgesine ait zeytinyağında yapılan çalışmada ise yenilebilir zeytinyağının *D. melanogaster*'in herhangi bir mutant leke artışı

gözlemlenmediğinin ve bu sonuçların günlük diyetin bir parçası olarak zeytinyağının doğal özelliklerine olan ilginin devam etmesi beklediklerini rapor etmişlerdir [121]. Literatürdeki başka türlerle yapılan çalışmalara bakıldığında Patenkovic ve arkadaşları Lamiaceae familyasına ait olan, *Salvia officinalis* (adaçayı) üzerinde yaptıkları bir çalışmada metil metansülfonatin neden olduğu mutasyonların sıklığını azaltmada açık bir antimutajenik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [63]. Asteraceae familyası üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise *Artemisia herba-alba* bitkisinin etanolik ekstraktlarının metil metansülfonatin ile birlikte uygulanmasının önemli bir antimutajenik bir etki gösterdiğini ve %84 oranında inhisyon gerçekleştirdiği belirtilmiştir [122]. Batista ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada ise Chrysobalanaceae familyasından olan *Licania rijida* bitkisinin yaprak kısımlarından hazırlanan sulu ekstraktlarının 5, 10 ve 20 mg/mL dozlarında negatif (saf su ile işlenmiş) ve pozitif (doksorubisin ile işlenmiş) kontrolleri ile karşılaştırıldığında neden olduğu hiçbir genotoksik/mutajenik etki olmadığını göstermişlerdir [123].

4.4.3 In vivo Toksikite Sonuçları

4.4.3.1 Olea europaea Uslu Kültivarına Ait In vivo Toksikite Sonuçları

Olea europaea Uslu kültürünün metanol, su ve etanol ekstraktlarının (50 mg/L) *D. melanogaster'* a karşı toksisitesi hayatta kalma, puparasyon ve eklosyon oranları hesaplanarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre H₂O₂ yaşama ve eklosyon oranını (%) önemli ölçüde azaltmıştır. Su ve etanol ekstraktları % puparasyon değerini değiştirmezken metanol ekstraktı larva aşamasına zarar vererek % puparasyon değerini düşürmüştür. % hayatta kalma verilerine bakıldığında hem etanol hem de metanol ekstraktları anlamlı bir düşüşe sebep olurken (p<0.05) su ekstraktında anlamlı bir düşüş gözlemlenmemiştir. Ayrıca su ve metanol ekstraktları pupanın sineğe dönüşme aşamasında zarar verip % eklosyon değerini düşürmüştür.

4.4.3.2 Olea europaea Domat Kültivarına Ait In vivo Toksikite Sonuçları

Olea europaea Domat kültürünün metanol, su ve etanol ekstraktlarının (50 mg/L) *D. melanogaster'* a karşı toksisitesi hayatta kalma, puparasyon ve eklosyon oranları hesaplanarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 3.12, 3.13ve 3.14'de verilmiştir. Etanol ve metanol ekstraktları negatif kontrole kıyasla % puparasyon değerinde anlamlı bir artışı sağlamıştır. (p<0.05) % hayatta kalma verileri incelendiğinde her 3 ekstrakt anlamlı bir

değişikliğe yol açmazken H₂O₂ anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. Ayrıca su, etanol ve metanol ekstaktları ile H₂O₂ pupanın sineğe dönüşme aşamasında zarar verip % eklosyon değerini önemli derecede düşürmüştür. (p<0.05)

4.4.3.3 *Olea europaea* Gemlik Kültivarına Ait *In vivo* Toksikite Sonuçları

Olea europaea Gemlik kültürünün kültürünün metanol, su ve etanol ekstraktlarının (50 mg/L) *D. melanogaster'* a karşı toksisitesi hayatta kalma, puparasyon ve eklosyon oranları hesaplanarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 3.15, 3.16ve 3.17'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre H₂O₂ hayatta kalma ve eklosyon oranını önemli ölçüde azaltmıştır. (p<0.05) Puparasyon değerleri incelendiğinde su ekstraktı larva aşamasına zarar vererek değeri düşürürken etanol ve metanol ekstraktlarında negatif kontrole göre anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Hayatta kalma verileri incelendiğinde su ekstarktı larvaların sineğe dönüşmesine zarar vererek hayatta kalma oranını anlamlı bir şekilde düşürmüştür. (p<0.05) Ayrıca etanol ve metanol ekstaktları pupanın sineğe dönüşme aşamasında zarar verip % eklosyon oranında anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. (p<0.05)

4.4.3.4 *Olea europaea* Kiraz Kültivarına Ait *In vivo* Toksikite Sonuçları

Olea europaea Kiraz kültürünün kültürünün metanol, su ve etanol ekstraktlarının (50 mg/L) *D. melanogaster'* a karşı toksisitesi hayatta kalma, puparasyon ve eklosyon oranları hesaplanarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 3.18, 3.19 ve 3.20'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre H₂O₂, hayatta kalma ve eklosyon oranlarında önemli bir düşüşe sebep olmuştur. (p<0.05) Puparasyon değerleri incelendiğinde metanol ekstraktı larva aşamasına zarar vererek değeri düşürürken su ve metanol ekstraktlarında negatif kontrole göre anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Her 3 ekstrakt hayatta kalma oranında anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Ayrıca su ve etanol ekstaktları pupanın sineğe dönüşme aşamasında zarar verip % eklosyon oranında anlamlı bir düşüşe neden olmuştur. (p<0.05)

Tüm kültürlerin sonuçları karşılaştırıldığında birbirinden farklı sonuçların ortaya çıktığı bunun nedeninin farklı ekstraktlar ve kültürler besiyerinin kokusunu ya da tadını etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Çünkü *Drosophila*'nın toksik maddeleri tespit etmek için koku ve tat alma duyusunu hassas bir şekilde kullanabildiği bilinmektedir [124]. Uslu kültürünün etanol, Gemlik kültürünün su ve Kiraz kültürünün metanol ekstraktları eklosyon sürecini etkilemediği ve dolayısıyla *Drosophila* üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Literatüre bakıldığında 2020 yılında yapılan bir çalışmada su ile hazırlanan *Hibiscus sabdariffa* ekstraktlarının belirli doz aralıklarında negatif kontrole göre *D. Melanogaster* 'ın mortalite ve eklosyon oranlarında anlamlı bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir [125]. Benil ve arkadaşları Yaptıkları bir başka çalışmada ise *Boerhavia diffusa* biktisinin su ile hazırlanan ekstraktlarının *Drosophila*'da tolüenden dolayı oluşan gelişimsel ve üreme toksisitesini engellediğini belirtmişlerdir [126].



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Oleaceae familyasından olan *Olea europaea*'nın özellikle Ege ve Marmara bölgesinde yayılış gösteren Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan etanol, su ve metanol ekstraktlarının biyolojik, sitotoksik ve genotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlara göre;

- *O. europaea* kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan ekstraktlarının fenolik madde içerikleri LC-MS/MS ile incelenmiş; bütün kültürlerde oleuropein, verbaskozid, 3-hidroksitirozol, luteolin 7-glukozid bileşiklerinin ana bileşik oldukları bulunmuştur.
- *O. europaea* kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS testleri ile araştırılmıştır. DPPH analizi sonucunda en iyi antioksidan aktivite su ile hazırlanan Kiraz kültüründe ($0,14 \pm 0,01$); ABTS analizi sonucunda en iyi antioksidan aktivite etanol ile hazırlanan Domat kültüründe tespit edilmiştir ($0,023 \pm 0,002$).
- *O. europaea* kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının *in vivo* antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve sonuç olarak bütün kültürlerde negatif kontrole göre anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Bu da bitki örneklerinin sağlıklı *Drosophila melanogaster*'in normal antioksidan mekanizmalarına zarar vermediğini göstermektedir.
- *O. europaea* kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının 0-100 mg/L doz aralığında lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTS testi kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel veriler incelendiğinde tüm ekstraktların özellikle (0.1-25 mg/L) konsantrasyonlarının lenfosit hücrelerinin canlılığını desteklediği ve tanımlanan doz aralığında sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Diğer taraftan inkübasyon süresinin ve konsantrasyonların (50-100 mg/L) artırılmasının ekstraktın hücre canlılığı üzerindeki etkisini azalttığı da bulunmuştur.
- *O. europaea* kültürlerinin yaprak kısımlarından hazırlanan su, etanol ve metanol ekstraktlarının 50 mg/L dozlarının genotoksik aktiviteleri mikronükleus, *In vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve *in vivo* toksisite testleri ile araştırılmıştır. Mikronükleus verileri incelendiğinde negatif kontrole kıyasla bitki +

hidrojen peroksit örneklerinin oluşturduğu en düşük mikronükleus değerlerini Uslu kültüründe Metanol (50 mg/L + H₂O₂), Domat kültüründe Su (50 mg/L + H₂O₂), Gemlik kültüründe Etanol-(50 mg/L + H₂O₂) ve Kiraz kültüründe Metanol (50 mg/L + H₂O₂) olarak tespit edilmiştir. Lenfosit hücreleri üzerinde hidrojen peroksitin oluşturduğu genotoksik hasarı inhibe oranları ise Uslu kültüründe Su (%83,25), Domat kültüründe Su (%72,21), Gemlik kültüründe Su (%80,71) ve Kiraz Kültüründe ise etanol ile hazırlanan ekstrakta (%92,34) olarak tespit edilmiştir. SMART testi verileri incelendiğinde tüm kültürlerde kanat başına küçük tek nokta frekansları, H₂O₂ uygulanan örneklere göre en az 4.44 kat daha az belirlenmiştir. Tüm sonuçlara bakıldığında *O.europaea* Uslu, Domat, Gemlik ve Kiraz kültürlerine ait su, metanol ve etanol ekstraktlarının *Drosophila melanogaster* kanadında somatik mutasyonları anlamlı bir şekilde önlediği tespit edilmiştir.

- *In vivo* toksisite sonuçları incelendiğinde farklı kültürlerin ve farklı çözücülerin % puparasyon, % hayatta kalma ve % eklosyon değerlerinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Fakat Uslu kültürünün etanol, Gemlik kültürünün su ve Kiraz kültürünün metanol ekstraktları eklosyon sürecini etkilemediği ve dolayısıyla *Drosophila* üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, *O.europaea* kültürlerinin yaprak kısımları belirlenen doz ve çözücülerde genotoksik etki göstermemiş ve hidrojen peroksitin neden olduğu genotoksik zararı önemli ölçüde engellemiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, *O.europaea'* nin ikincil metabolitlerinin, oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların tedavisinde tıbbi olarak faydalanılmasını ayrıca aktif bileşiklerin çalışılması ve izole edilmesiyle *In vivo* çalışmalara genişletilebileceğine inanılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. D. Evans, M. Dizdaroglu, and M. S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance*, vol. 567, no. 1. 2004. doi: 10.1016/j.mrrev.2003.11.001.
- [2] G. B. Döner, “Yıllara Göre Diyaliz Hastalarında Damar Endotel Disfonksiyonu Yapan Serbest Radikallerin Ve Antioksidan Sistemin İncelenmesi,” *T.C. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2019.
- [3] B. Yılmaz Kardas, M. E. Diken, H. Bayhan, M. Acar, and S. Dogan, “Cytoprotective, antimutagenic/antirecombinogenic and antibacterial properties of *Lallemantia iberica* extracts,” *J. Sci. Food Agric.*, no. September, 2022, doi: 10.1002/jsfa.12257.
- [4] Ö. Vatan, “Bazı Bitkisel Doğal Bileşiklerin Olası Genotoksik/Antigenotoksik Etkilerinin İn Vitro Ve İn Vivo Genotoksite Test Yöntemleri İle Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması,” *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, 2012.
- [5] A. Čabarkapa *et al.*, “Unexpected effect of dry olive leaf extract on the level of DNA damage in lymphocytes of lead intoxicated workers, before and after CaNa2EDTA chelation therapy,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 106, pp. 616–623, 2017, doi: 10.1016/j.fct.2016.12.023.
- [6] E. Dirican, H. Turkez, and B. Toğar, “Modulatory effects of *Thymbra spicata* L. different extracts against the mercury induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro,” *Cytotechnology*, vol. 64, no. 2, pp. 181–186, 2012, doi: 10.1007/s10616-011-9406-1.
- [7] C. Sarikurkcu *et al.*, “Enzyme and biological activities of the water extracts from the plants *aesculus hippocastanum*, *olea europaea* and *hypericum perforatum* that are used as folk remedies in Turkey,” *Molecules*, vol. 25, no. 5, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/molecules25051202.
- [8] Ş. Değirmenci, “*Gypsophila Sphaerocephala* Türünün Fenolik Ve Esansiyel Yağ İçeriğinin Belirlenmesi, Antioksidan Ve Sitotoksik Aktivitesinin İncelenmesi,” *Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2019.
- [9] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy,

- “Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies.,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, pp. 230–242, 2005, doi: 10.1093/ajcn/81.1.230s.
- [10] D. Majumder *et al.*, “Metabolic profile and investigations on crude extract of *Olea europaea* L. leaves as a potential therapeutic agent against skin cancer,” *J. Funct. Foods*, vol. 58, no. November 2018, pp. 266–274, 2019, doi: 10.1016/j.jff.2019.05.005.
- [11] E. Wallander, “Phylogeny And Classification Of Oleaceae Based On Rps16 And TrnL-F Sequence Data,” vol. 87, no. 1827, pp. 1827–1841, 2000.
- [12] Funda Erşen Bak, “Türkiye’de Yetişen Oleaceae Familyası Taksonlarının Ekolojik Odun Anatomisi,” *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 2006.
- [13] J. G. De la Ossa *et al.*, “Waste autochthonous tuscan olive leaves (*Olea europaea* var. *olivastra seggianese*) as antioxidant source for biomedicine,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/ijms20235918.
- [14] H. Türkez and B. Toğar, “Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes,” *J. Toxicol. Sci.*, vol. 36, no. 5, pp. 531–537, 2011, doi: 10.2131/jts.36.531.
- [15] D. Žukovec Topalović *et al.*, “Dry olive leaf extract counteracts L-thyroxine-induced genotoxicity in human peripheral blood leukocytes in vitro,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/762192.
- [16] S. R. Hindi, “Antiviral Effects of *Olea europaea* Leaves Extract and Interferon-beta on Gene Expression of Newcastle Disease Virus,” *Adv. Anim. Vet. Sci. Antivir.*, vol. 5, no. 11, 2017.
- [17] O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, and J. A. Del Rio, “Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves,” *Food Chem.*, vol. 68, no. 4, pp. 457–462, 2000, doi: 10.1016/S0308-8146(99)00221-6.
- [18] H. Jemai, A. E. L. Feki, and S. Sayadi, “Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 19, pp. 8798–8804, 2009, doi: 10.1021/jf901280r.
- [19] *Zeytin Çeşit Kataloğu*. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 2015.
- [20] F. Al-Rimawi, “Development and validation of a simple reversed-phase HPLC-UV method for determination of oleuropein in olive leaves,” *J. Food Drug Anal.*, vol.

- 22, no. 3, pp. 285–289, 2014, doi: 10.1016/j.jfda.2013.10.002.
- [21] P. Özdemir, “Koyunlarda Zeytin Yaprağı Ekstraktının In Vitro ve In Vivo Besin Madde Sindirilebilirliği ile Rumen Fermentasyonu, Bazı Kan Parametreleri ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi,” Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2021.
- [22] H. S. Long, P. M. Tilney, and B. E. Van Wyk, “The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae),” *South African J. Bot.*, vol. 76, no. 2, pp. 324–331, 2010, doi: 10.1016/j.sajb.2009.12.005.
- [23] B. Baccouri, I. Rajhi, S. Theresa, Y. Najjar, S. N. Mohamed, and I. Willenberg, “The potential of wild olive leaves (*Olea europaea* L. subsp. *oleaster*) addition as a functional additive in olive oil production: the effects on bioactive and nutraceutical compounds using LC–ESI–QTOF/MS,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 248, no. 11, pp. 2809–2823, 2022, doi: 10.1007/s00217-022-04091-y.
- [24] B. Halliwell, “A Basis for Drug Selection?,” vol. 42, no. 4, pp. 569–605, 1991.
- [25] J. C. Fantone and P. A. Ward, “Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions,” *Am. J. Pathol.*, vol. 107, no. 3, pp. 397–418, 1982.
- [26] M. Lawson, K. Jomova, P. Poprac, K. Kuca, K. Musílek, and M. Valko, “Free radicals and antioxidants in human disease,” *Nutr. Antioxid. Ther. Treat. Perspect.*, pp. 283–305, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-67625-8_12.
- [27] B. Kocatürk, “Gama Işını Uygulanan Kuru Zeytin Yapraklarındaki Fenolik Madde İçeriğinin Ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi,” *Balıkesir Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2014.
- [28] B. P. A. L. Yu, “Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species,” vol. 74, no. 1, 2021.
- [29] O. I. Aruoma and B. Halliwell, “Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?,” *Biochem. J.*, vol. 241, no. 1, pp. 273–278, 1987, doi: 10.1042/bj2410273.
- [30] A. Benedek *et al.*, “Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats,” *Brain Res.*, vol. 1116, no. 1, pp. 159–165, 2006, doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.123.
- [31] O. Özcan, H. Erdal, G. Çakırca, and Z. Yönden, “Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA,” *J. Clin. Exp. Investig.*, vol. 6, no. 3, pp.

- 331–336, 2015, doi: 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545.
- [32] M. Silinsin, “Inula graveolens (L.) Desf. Bitki Türüne Ait Su Ve Etanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitelerinin Değişik In Vitro Metotlar İle Belirlenmesi,” *T.c. Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilim. Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2016.
- [33] M. Oğuz, “Geleneksel Yöntemle Üretilen Nar (Punica granatum L.) Ekşilerinin Fizikokimyasal Analizlerinin İlgili Mevzuata Uygunluğu Ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi,” *T.C. Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, vol. 4, no. 1, p. 6, 2021.
- [34] K. Doldolova, “Zerdeçaldan Antioksidanların Doğal Derin Ötektik Çözücüler Kullanılarak Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Modellenmesi,” *T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 2020.
- [35] X. Chen, L. Liang, and C. Han, “Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay,” *Lwt*, vol. 131, no. June, p. 109769, 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2020.109769.
- [36] S. Milardovic, D. Iveković, V. Rumenjak, and B. S. Grabarić, “Use of DPPH•|DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity,” *Electroanalysis*, vol. 17, no. 20, pp. 1847–1853, 2005, doi: 10.1002/elan.200503312.
- [37] S. B. Kedare and R. P. Singh, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [38] I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova, and R. P. Terekhov, “ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 3, 2020, doi: 10.3390/ijms21031131.
- [39] R. O. L. P. Rior, “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,” 2005.
- [40] G. Hasbal, “Sorbus Torminalis (L.) Crantz. (Akçaağaç Yapraklı Üvez)’In Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi,” *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı*, 2013.
- [41] O. Tokur and A. Aksoy, “In Vitro Sitotoksiste Testleri,” *Harran Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 6, no. 1, pp. 112–118, 2017, doi: 10.31196/huvfd.325794.

- [42] D. Anton, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, “Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 5517–5527, 2015, doi: 10.3390/ijms16035517.
- [43] K. F. Lei, M. H. Wu, P. Y. Liao, Y. M. Chen, and T. M. Pan, “Development of a micro-scale perfusion 3D cell culture biochip with an incorporated electrical impedance measurement scheme for the quantification of cell number in a 3D cell culture construct,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 12, no. 1–4, pp. 117–125, 2012, doi: 10.1007/s10404-011-0854-x.
- [44] L. J. McGaw, E. E. Elgorashi, and J. N. Eloff, *Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells*. Elsevier Inc., 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X.
- [45] P. Sowa, D. Marcinčáková, M. Milek, E. Sidor, J. Legáth, and M. Dzugaň, “Analysis of cytotoxicity of selected asteraceae plant extracts in real time, their antioxidant properties and polyphenolic profile,” *Molecules*, vol. 25, no. 23, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3390/molecules25235517.
- [46] K. T. Huang, Y. H. Chen, and A. M. Walker, “Inaccuracies in MTS assays: Major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids,” *Biotechniques*, vol. 37, no. 3, pp. 406–412, 2004, doi: 10.2144/04373st05.
- [47] Pınar Erkekoğlu and Terken Baydar, “Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri,” *Hacettepe Univ. J. Fac. Pharm.*, vol. 41, no. 1, pp. 45–63, 2021.
- [48] P. Wang, S. M. Henning, and D. Heber, “Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010202.
- [49] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [50] W. P. Roos and B. Kaina, “DNA damage-induced cell death by apoptosis,” *Trends Mol. Med.*, vol. 12, no. 9, pp. 440–450, 2006, doi: 10.1016/j.molmed.2006.07.007.
- [51] E. Zeiger, “History and rationale of genetic toxicity testing: An impersonal, and sometimes personal, view,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 44, no. 5, pp. 363–371, 2004, doi: 10.1002/em.20062.
- [52] K. Mortelmans and D. S. Rupa, “Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists,” *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 56, pp. 379–401, 2004, doi: 10.1016/S0065-2164(04)56012-4.
- [53] H. Bayhan, “Bazı Endemik Cirsium Türlerinin Hidrojen Peroksit (H₂O₂) İle

- İndüklenmiş Olan İnsan Lenfosit Hücrelerindeki Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Giderilmesindeki Potansiyelinin Araştırılması,” *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilim. Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2022.
- [54] Z. A. Şekeroğlu and V. Şekeroğlu, “Genetik Toksikite Testleri,” *Türk Bilim Araştırma Vakfı Derg.*, vol. 4, pp. 221–229, 2011.
- [55] P. Vanparys, F. Vermeiren, M. Sysmans, and R. Temmerman, “The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity,” *Mutat. Res. Lett.*, vol. 244, no. 2, pp. 95–103, 1990, doi: 10.1016/0165-7992(90)90056-P.
- [56] S. Demirel, “Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları.” *Genel Tıp Dergisi*, p. 12 (3), 2002.
- [57] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, and P. Van Hummelen, “The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 392, no. 1–2, pp. 19–30, 1997, doi: 10.1016/S0165-1218(97)00042-6.
- [58] V. Sekeroglu and Z. Atli Sekeroglu, “Micronucleus test for determining genotoxic damage,” *Turkish Bull. Hyg. Exp. Biol.*, vol. 68, no. 4, pp. 241–252, 2011, doi: 10.5505/turkhijyen.2011.06977.
- [59] K. P. Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, “Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen.*” pp. 88–153, 1984. doi: 10.1002/em.2860060206.
- [60] M. E. Heres-Pulido *et al.*, “Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*,” *Mutagenesis*, vol. 19, no. 3, pp. 187–193, 2004, doi: 10.1093/mutage/geh020.
- [61] W. F. Costa and J. C. Nepomuceno, “Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*,” *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 47, no. 1, pp. 18–24, 2006, doi: 10.1002/em.20160.
- [62] R. El Hamss, M. Analla, J. Campos-Sanchez, A. Alonso-Moraga, A. Muñoz-Serrano, and M. Idaomar, “A dose dependent anti-genotoxic effect of turmeric,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 446, no. 1, pp. 135–139, 1999, doi: 10.1016/S1383-5718(99)00140-0.
- [63] A. Patenkovic, M. Stamenkovic-Radak, T. Banjanac, and M. Andjelkovic,

- “Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, no. 1, pp. 180–183, 2009, doi: 10.1016/j.fct.2008.10.024.
- [64] G. M. Rubin *et al.*, “Comparative genomics of the eukaryotes,” *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5461, pp. 2204–2215, 2000, doi: 10.1126/science.287.5461.2204.
- [65] A. E. Clewell *et al.*, “A Comprehensive Toxicological Safety Assessment of an Extract of *Olea Europaea* L. Leaves (Bonolive™),” *Int. J. Toxicol.*, vol. 35, no. 2, pp. 208–221, 2016, doi: 10.1177/1091581815619764.
- [66] J. Anter *et al.*, “A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 723, no. 2, pp. 165–170, 2011, doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.005.
- [67] D. Topalović *et al.*, “Dry olive leaf extract attenuates DNA damage induced by estradiol and diethylstilbestrol in human peripheral blood cells in vitro,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 845, no. November 2018, p. 402993, 2019, doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.12.001.
- [68] L. Verschaeve *et al.*, “In vitro Toxicity and genotoxic activity of aqueous leaf extracts from four varieties of *Olea europea* (L),” *Pharmacogn. Mag.*, vol. 13, no. 49, pp. S63–S68, 2017, doi: 10.4103/0973-1296.203980.
- [69] H. Turkez, B. Ş. Togar, and E. Polat, “Olive leaf extract modulates permethrin induced genetic and oxidative damage in rats,” *Cytotechnology*, vol. 64, no. 4, pp. 459–464, 2012, doi: 10.1007/s10616-011-9424-z.
- [70] J. Makowska-Wąs *et al.*, “Identification of Predominant Phytochemical Compounds and Cytotoxic Activity of Wild Olive Leaves (*Olea europaea* L. ssp. *sylvestris*) Harvested in South Portugal,” *Chem. Biodivers.*, vol. 14, no. 3, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1002/cbdv.201600331.
- [71] A. Zaïri, S. Nour, A. Zarrouk, H. Haddad, A. khélifa, and L. Achour, “Phytochemical profile, cytotoxic, antioxidant, and allelopathic potentials of aqueous leaf extracts of *Olea europaea*,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 8, no. 9, pp. 4805–4813, 2020, doi: 10.1002/fsn3.1755.
- [72] J. Ruzzolini *et al.*, “Oleuropein, the main polyphenol of *Olea europaea* leaf extract, has an anti-cancer effect on human BRAF melanoma cells and potentiates the cytotoxicity of current chemotherapies,” *Nutrients*, vol. 10, no. 12, 2018, doi: 10.3390/nu10121950.
- [73] M. Borugă *et al.*, “Assessment of olive leaves extract – cytotoxicity in vitro and

- angiogenesis in ovo,” *Farmacia*, vol. 69, no. 1, pp. 38–43, 2021, doi: 10.31925/farmacia.2021.1.5.
- [74] G. Tamasi *et al.*, “Chemical characterization and antioxidant properties of products and by-products from *Olea europaea* L.,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 7, no. 9, pp. 2907–2920, 2019, doi: 10.1002/fsn3.1142.
- [75] Z. Bouallagui, J. Han, H. Isoda, and S. Sayadi, “Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 1, pp. 179–184, 2011, doi: 10.1016/j.fct.2010.10.014.
- [76] I. Sifaoui *et al.*, “Optimized Extraction of Antioxidants from Olive Leaves Using Augmented Simplex Centroid Design,” *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 9, pp. 1323–1333, 2016, doi: 10.1080/00032719.2015.1104320.
- [77] S. Celikler, O. Vatan, G. Yildiz, and R. Bilaloglu, “Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, no. 4, pp. 796–801, 2009, doi: 10.1016/j.fct.2009.01.010.
- [78] N. Genc, I. Yildiz, R. Chaoui, R. Erenler, C. Temiz, and M. Elmastas, “Biosynthesis, characterization and antioxidant activity of oleuropein-mediated silver nanoparticles,” *Inorg. Nano-Metal Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1080/24701556.2020.1792495.
- [79] H. Chung, T. Sztal, S. Pasricha, M. Sridhar, P. Batterham, and P. J. Daborn, “Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 14, pp. 5731–5736, 2009, doi: 10.1073/pnas.0812141106.
- [80] E. M. Alexander *et al.*, “The In vivo Antioxidant Protective Activity of *Mangifera indica* Cold Aqueous Leaf Extract in *Drosophila Melanogaster*,” *J. Adv. Biol. Biotechnol.*, vol. 22, no. 2, pp. 1–7, 2019, doi: 10.9734/jabb/2019/v22i230108.
- [81] B. Yilmaz, S. Doğan, and S. Çelikler Kasimoğullari, “Hemocompatibility, cytotoxicity, and genotoxicity of poly(methylmethacrylate)/nanohydroxyapatite nanocomposites synthesized by melt blending method,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 67, no. 6, pp. 351–360, 2018, doi: 10.1080/00914037.2017.1331349.
- [82] S. Kariya, N. Takahashi, M. Hirano, and S. Ueno, “Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 254, no. 1–2, pp. 83–89, 2003, doi:

10.1023/A:1027372519726.

- [83] E. E. Doğan, P. Tokcan, M. E. Diken, B. Yilmaz, B. K. Kizilduman, and P. Sabaz, “Synthesis, Characterization and Some Biological Properties of PVA/PVP/PN Hydrogel Nanocomposites: Antibacterial and Biocompatibility,” *Adv. Mater. Sci.*, vol. 19, no. 3, pp. 32–45, 2019, doi: 10.2478/adms-2019-0015.
- [84] F. Ari, E. Ulukaya, S. Oran, S. Celikler, S. Ozturk, and M. Z. Ozel, “Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes,” *Cytotechnology*, vol. 67, no. 3, pp. 531–543, 2015, doi: 10.1007/s10616-014-9713-4.
- [85] N. Akhtar *et al.*, “Insecticidal and genotoxic activities of some indigenous weed plant extracts in fruit fly, *Drosophila melanogaster*,” *Zeitschrift Fur Arznei-Gewurzpflanzen*, vol. 24, no. 1, pp. 10-16 WE-Science Citation Index Expanded (SCI-E, 2019.
- [86] A. Depetris-Chauvin, D. Galagovsky, C. Chevalier, G. Maniere, and Y. Grosjean, “Olfactory detection of a bacterial short-chain fatty acid acts as an orexigenic signal in *Drosophila melanogaster* larvae,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14589-1.
- [87] H. Shamshoum, F. Vlavcheski, and E. Tsiani, “Anticancer effects of oleuropein,” *BioFactors*, vol. 43, no. 4, pp. 517–528, 2017, doi: 10.1002/biof.1366.
- [88] S. H. Omar, “Oleuropein in olive and its pharmacological effects,” *Sci. Pharm.*, vol. 78, no. 2, pp. 133–154, 2010, doi: 10.3797/scipharm.0912-18.
- [89] X. H. Zhao, H. L. Yue, P. Li, X. Zeng, and G. Zhang, “Evaluation of the antitumor activity by CdTe QDs with verbascoside,” *Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1142/S1793292013500318.
- [90] L. Martínez, G. Ros, and G. Nieto, “Hydroxytyrosol: Health Benefits and Use as Functional Ingredient in Meat,” *Medicines*, vol. 5, no. 1, p. 13, 2018, doi: 10.3390/medicines5010013.
- [91] M. del C. Ramírez-Tortose, M. Pulido-Moran, S. Granados, J. J. Gaforio, and J. L. Quiles, “Hydroxytyrosol as a Component of the Mediterranean Diet and Its Role in Disease Prevention,” *Mediterr. Diet An Evidence-Based Approach*, pp. 205–215, 2015, doi: 10.1016/B978-0-12-407849-9.00020-8.
- [92] P. C. Lv, H. Q. Li, J. Y. Xue, L. Shi, and H. L. Zhu, “Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 2, pp. 908–914, 2009, doi: 10.1016/j.ejmech.2008.01.013.

- [93] B. BERK, “Dehidroepiandrosteron İle Polikistik Over Sendromu Oluşturulan Sıçanlarda Apigenin Ve Chrysin’in Potansiyel Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması,” Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2022.
- [94] C. Giovannini *et al.*, “Biochemical and Molecular Action of Nutrients Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells,” *J. Nutr.*, vol. 129, no. December 1998, pp. 1269–1277, 1999, [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/129/7/1269/4722563>
- [95] M. Ben Mohamed *et al.*, “The LC-MS/MS characterization of phenolic compounds in leaves allows classifying olive cultivars grown in South Tunisia,” *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 78, no. April, pp. 84–90, 2018, doi: 10.1016/j.bse.2018.04.005.
- [96] D. Danjolli-Hashani and Ş. Selen-Işbilir, “Effects of Extraction Period on Bioactive Compounds Extracted from *Olea Europaea* (var. Domat) Leaves by Ultrasound-Assisted Extraction,” *Acta Chim. Slov.*, vol. 69, no. 2, pp. 430–436, 2022, doi: 10.17344/acsi.2021.7332.
- [97] K. Kiritsakis, M. G. Kontominas, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Moustakas, and A. Kiritsakis, “Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars,” *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 87, no. 4, pp. 369–376, 2010, doi: 10.1007/s11746-009-1517-x.
- [98] S. Grabska-Zielińska, M. Gierszewska, E. Olewnik-Kruszkowska, and M. Bouaziz, “Polylactide films with the addition of olive leaf extract— physico-chemical characterization,” *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 24, 2021, doi: 10.3390/ma14247623.
- [99] V. Goulas *et al.*, “Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 53, no. 5, pp. 600–608, 2009, doi: 10.1002/mnfr.200800204.
- [100] H. Essafi, N. Trabelsi, C. Benincasa, A. Tamaalli, E. Perri, and M. Zarrouk, “Phytochemical profile, antioxidant and antiproliferative activities of olive leaf extracts from autochthonous Tunisian cultivars,” *Acta Aliment.*, vol. 48, no. 3, pp. 384–390, 2019, doi: 10.1556/066.2019.48.3.14.
- [101] Z. Rafiee, S. M. Jafari, M. Alami, and M. Khomeiri, “Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil,” *J. Agric. Sci. Technol.*, vol. 14, no. SUPPL., pp. 1497–1509, 2012.

- [102] M. Ezz El-Din Ibrahim, R. M. Alqurashi, and F. Y. Alfaraj, “Antioxidant Activity of Moringa oleifera and Olive Olea europaea L. Leaf Powders and Extracts on Quality and Oxidation Stability of Chicken Burgers,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 3, 2022, doi: 10.3390/antiox11030496.
- [103] A. Khaliq *et al.*, “Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves,” *J. Appl. Bot. Food Qual.*, vol. 88, no. 1, pp. 16–21, 2015, doi: 10.5073/JABFQ.2015.088.004.
- [104] J. M. Jaski, C. E. Barão, L. Morais Lião, V. da Silva Pinto, E. F. Zanoelo, and L. Cardozo-Filho, “ β -Cyclodextrin complexation of extracts of olive leaves obtained by pressurized liquid extraction,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 129, no. December 2018, pp. 662–672, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.045.
- [105] L. Abaza, N. Ben Youssef, H. Manai, F. Mahjoub Haddada, K. Methenni, and M. Zarrouk, “Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities,” *Grasas y Aceites*, vol. 62, no. 1, pp. 96–104, 2011, doi: 10.3989/gya.044710.
- [106] A. Lfitat *et al.*, “Comparative assessment of total phenolics content and in vitro antioxidant capacity variations of macerated leaf extracts of *Olea europaea* L. And *Argania spinosa* (L.) Skeels,” *Mater. Today Proc.*, vol. 45, pp. 7271–7277, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.990.
- [107] M. Cheurfa, H. H. Abdallah, R. Allem, A. Noui, C. M. N. Picot-Allain, and F. Mahomoodally, “Hypocholesterolaemic and antioxidant properties of *Olea europaea* L. leaves from Chlef province, Algeria using in vitro, in vivo and in silico approaches,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 123, no. September 2018, pp. 98–105, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2018.10.002.
- [108] T. Đorđević, M. Sarić-Krsmanović, and J. Gajić Umiljendić, “Phenolic Compounds and Allelopathic Potential of Fermented and Unfermented Wheat and Corn Straw Extracts,” *Chem. Biodivers.*, vol. 16, no. 2, 2019, doi: 10.1002/cbdv.201800420.
- [109] C. Antoniou and J. Hull, “The Anti-cancer Effect of *Olea europaea* L. Products: a Review,” *Curr. Nutr. Rep.*, pp. 99–124, 2021, doi: 10.1007/s13668-021-00350-8.
- [110] Q. Gazala, S. Ara, K. Ansari, I. Murtaza, and H. Qazi, “Cytotoxicological evaluation of semi-purified extracts of some dye yielding plants of the Kashmir Valley on Normal Intestinal Cell Line (IEC-6) by MTT assay,” *J. Phytopharm.*, vol. 7, no. 1, pp. 05–09, 2018, doi: 10.31254/phyto.2018.7102.
- [111] J. Anter *et al.*, “Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic

- effects of the olive oil by-product ‘alperujo’, hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 772, pp. 25–33, 2014, doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.07.002.
- [112] S. Korkmaz, M. Sarimahmut, M. Z. Ozel, and E. Ulukaya, “Oleuropein içeren zeytin yaprağı ekstresi hücre hattına bağlı olarak meme kanser hücrelerinde epirubisinin sitotoksik etkilerini değiştirir,” *Turkish J. Biochem.*, vol. 41, no. 6, pp. 385–392, 2016, doi: 10.1515/tjb-2016-0117.
- [113] A. A. Hamza, S. O. Hassanin, S. Hamza, A. Abdalla, and A. Amin, “Polyphenolic-enriched olive leaf extract attenuated doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress and inflammation,” *J. Basic Appl. Zool.*, vol. 82, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s41936-021-00251-w.
- [114] Hatice Genç, “*Olea europaea* L. Ve *Vitis vinifera* L. Ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi ve araürün formülasyonunun geliştirilmesi,” *Anadolu Üniversitesi , Fen Bilim. Enstitüsü, İleri Teknol. Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*, 2011.
- [115] G. Sponchiado *et al.*, “Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 178, pp. 289–296, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2015.10.026.
- [116] A. Čabarkapa *et al.*, “Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 28, no. 3, pp. 451–456, 2014, doi: 10.1016/j.tiv.2013.12.014.
- [117] B. S.-P. (2020). Pirković-Čabarkapa A., L. Živković, M. Zlatković-Švenda, S. Borozan, D. Topalović, D. Dekanski, M. Bruić, V. Bajić, M. Radak-Perović, “Cytogenetic Alterations In Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Methotrexate And Dry Olive Leaf Extract,” *Genetika*, vol. 52, no. 1, pp. 67–80, 2020, [Online]. Available: <https://doi.org/10.2298/GENSR2001067P>
- [118] E. H. Al-tae, “Effect Of Silver Nanoparticles Synthesized Using Leaves Extract Of Olive On Histopathological And Cytogenetic Effects In Albino Mic,” *Iraqi J. Agric. Sci.*, vol. 3, no. 5, pp. 103–111, 2015.
- [119] M. G. Soni, G. A. Burdock, M. S. Christian, C. M. Bitler, and R. Crea, “Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 44, no. 7, pp. 903–915, 2006, doi: 10.1016/j.fct.2006.01.008.

- [120] J. Anter *et al.*, “Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 703, no. 2, pp. 137–142, 2010, doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.012.
- [121] I. Kounatidis *et al.*, “Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (VOO) using the *drosophila* wing-spot test,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 17, pp. 7785–7789, 2009, doi: 10.1021/jf901528v.
- [122] S. Amkiss, A. Dalouh, and M. Idaomar, “Chemical composition, genotoxicity and antigenotoxicity study of *Artemisia herba-alba* using the eye and wing SMART assay of *Drosophila melanogaster*,” *Arab. J. Chem.*, vol. 14, no. 3, p. 102976, 2021, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.102976.
- [123] D. Batista *et al.*, “*Licania rigida* leaf extract: Protective effect on oxidative stress, associated with cytotoxic, mutagenic and preclinical aspects,” *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues*, vol. 85, no. 7, pp. 276–290, 2022, doi: 10.1080/15287394.2021.2002744.
- [124] S. Bahadorani and A. J. Hilliker, “Biological and Behavioral Effects of Heavy Metals in *Drosophila melanogaster* Adults and Larvae,” *J. Insect Behav.*, vol. 22, no. 5, pp. 399–411, 2009, doi: 10.1007/s10905-009-9181-4.
- [125] A. I. Alkhamis, R. A. Magaji, M. G. Magaji, and J. Ibrahim, “Preliminary mortality and eclosion : dose-determining factors of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* in *Drosophila melanogaster*,” vol. 8, no. July, pp. 59–61, 2020.
- [126] B. PB *et al.*, “Prophylactic efficacy of *Boerhavia diffusa* L. aqueous extract in toluene induced reproductive and developmental toxicity in *Drosophila melanogaster*,” *J. Infect. Public Health*, vol. 13, no. 2, pp. 177–185, 2020, doi: 10.1016/j.jiph.2019.07.020.



EKLER

EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı

Tarih ve Sayı: 26.02.2021-E.5193



BEYKENT ÜNİVERSİTESİ

YAZI İŞLERİ MÜDÜRLÜĞÜ

Sayı : E-61952817-044-5193
Konu : Etik Kurul Başvurusu İnceleme ve İzin
Hk.

İZMİR KAVRAM MESLEK YÜKSEKOKULU MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 19.01.2021 tarihli ve 221 sayılı yazı,

İlgi yazı doğrultusunda, Meslek Yüksekokulunuz, Tıbbi Dokümantasyon ve Sekreterlik Programı, öğretim elemanı Öğr. Gör. Berker KOCATÜRK'ün yönetiminde yürütülen, "Bazı Zeytin Kültivarlarının Antigenotoksik Etkilerinin Periferik Lenfosit Hücrelerinde Araştırılması", başlıklı doktora tez çalışmasında veri toplanabilmesi için etik kurul başvurusu uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz/rica ederim.

Prof.Dr. Ali Murat FERMAN
Rektör

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BE6P337EE Pin Kodu :59081

Belge Takip Adresi : <http://evrak.beykent.edu.tr/enVision-Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V~BEND337E7>

Adres: Beykent Üniversitesi Ayazağa-Maslak Yerleşkesi Ayazağa Mah. Hadımkoru Yolu Cad. No: 19
Sarıyer/İstanbul
Telefon: 444 1997 Faks: (0 212) 289 64 90
e-Posta: info@beykent.edu.tr Web: www.beykent.edu.tr
Kep Adresi: beykentuniv@hs01.kep.tr

Bilgi için: Uğurcan Çırlık
Unvanı: Yazı İşleri Memuru



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır. İN Evrak doğrulaması {VALURL} adresinden yapılabilir.

Şekil A.0.1 Etik Kurul Kararı