

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜLKEMİZDE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN
ÇEŞİTLERİNE AİT YAPRAKLARIN OLEUROPEİN
MİKTARLARININ BELİRLENMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI, *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN VE
ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Muhammed TÜRKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2025-ANTALYA

Muhammed TÜRKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ÜLKEMİZDE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN
ÇEŞİTLERİNE AİT YAPRAKLARIN OLEUROPEİN
MİKTARLARININ BELİRLENMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI, *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN VE
ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Muhammed TÜRKMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2023-6460 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Anabilim Dalı
.....Programında tezi olarak kabul
edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı Soyadı)
(Üniversite)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve
...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Muhammed TÜRKMEN

İmza

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasından, sonuçların değerlendirilmesine kadar geçen tüm süreçte, akademik rehberliği, yapıcı eleştirileri ve titiz bilimsel yaklaşımıyla yolumu aydınlatan değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Disiplinli çalışma anlayışı, araştırma sürecine kazandırdığı sistematik bakış açısı ve her zaman teşvik edici tutumuyla bu çalışmanın şekillenmesinde büyük rol oynamıştır. Akademik gelişimimde ilham verici bir figür olan hocama, tüm destekleri ve katkıları için şükran borçluyum. Lisans eğitimim süresince sadece bir akademisyen değil, aynı zamanda bir ilham kaynağı olan değerli hocam Doç. Dr. Öğr. Üyesi Hülya KAMARLI ALTUN'a ve Dr. Hatice Gözde HOSTA YAVUZ'a, bilimsel merakımı besleyen, araştırma yetkinliğimi geliştirmemde katkı sağlayan ve akademik yolculuğumda bana her zaman ışık tutan destekleri için en içten teşekkürlerimi sunarım. Bugün bu noktaya ulaşmamda emekleri ve inançları ile daima yanımda oldukları için kendilerine minnettarım. Bilimsel yaklaşımı, yol göstericiliği, değerli bilgi ve tecrübeleriyle tez sürecinin her aşamasında bana rehberlik eden; analiz süreçlerinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve karşılaşılan her sorunun çözümünde birlikte düşünerek çözüm yolları arayan sevgili çalışma arkadaşım Mariem BOUALI'ye gönülden teşekkür ederim. Akademik gelişimime sunduğu katkılar ve her zaman gösterdiği destekleyici tutumu için kendisine minnettarım. Araştırmanın deneysel kısmında kullanılan zeytin yapraklarının temininde verdikleri destek için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve bu süreçte kıymetli katkılarıyla bana yardımcı olan Dr. Murat ÖZALTAŞ'a teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiren, sabır ve anlayışlarıyla daima yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen Başak ERCAN'a, Dr. Hamza Mawlood AL BAYATI'ya, Kübra UYANIKER'e, Oya TEMİZ'e, Cabir ATLI'ya, Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoteknoloji ve Tarımsal Biyoteknoloji bölümlerinde görev yapan tüm değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma, motivasyonumu artıran tüm dostlarıma teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Türkiye’de yaygın yetiştirilen zeytin çeşitlerine ait yapraklardaki oleuropein (OLP) ve toplam fenolik madde (TPC) miktarları belirlenerek OLP için verimli bir ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemi geliştirilmiş ve ardından elde edilen materyalin antioksidan ve antidiyabetik etkileri değerlendirilmiştir.

Yöntem: OLP ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve işlem parametreleri Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile optimize edilmiştir. Elde edilen ekstrakt, lipofilik bileşiklerin uzaklaştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve silika jel kolon kromatografisi adımlarıyla saflaştırılmıştır. OLP miktarı Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) ile, TPC düzeyi Folin-Ciocalteu yöntemiyle, antioksidan aktiviteler DPPH• ve ABTS•⁺ analizleriyle, antidiyabetik etkileri ise α -amilaz ve α -glukosidaz enzim inhibisyon testleriyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tez kapsamında incelenen zeytin yaprağı çeşitlerinden OLP içeriği en yüksek olan çeşit Hamza Çelebi, TPC içeriği en yüksek olan ise Çilli çeşidi olarak belirlenmiştir. OLP düzeyi yüksek olarak belirlenen çeşitten UAE yöntemi ile OLP ekstraksiyonunda en yüksek verim için koşullar %87 etanol, 60°C ve 37 dakika olarak belirlenmiş olup OLP verimi %4,87 olarak hesaplanmıştır. Bu çeşitte gerçekleştirilen saflaştırma işlemleri sonucunda ise %68,29 saflıkta ve %74,37 geri kazanımla OLP izole edilmiştir. Saflaştırılan materyalin DPPH ve ABTS aktiviteleri sırasıyla 107,99±0,93 ve 124,37±1,45 mg TE/g iken, ekstraktta bu değerler 56,21±1,28 ve 43,23±1,23 mg TE/g olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstrakt (%4,87 OLP) ve saflaştırılan materyalin (%68,29 OLP) α -glukosidaz enzimine karşı konsantrasyona bağlı olarak inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmada, 2000 ppm konsantrasyonunda akarboz %79,38, saflaştırılan materyal %56,55 ve ekstrakt %58,65 oranında inhibisyon sağlamıştır.

Sonuç: Elde edilen bulgular; zeytin yaprağı ekstraktı ve saflaştırılan materyalin yaygın kullanılan bir antidiyabetik ajan olan akarboz ile karşılaştırıldığında α -glukosidaz enzimi üzerindeki etkileri bakımından inhibitör bir aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: oleuropein, ultrasonik, saflaştırma, antidiyabetik, antioksidan

ABSTRACT

Objective: In this study, the amounts of oleuropein (OLP) and total phenolic content (TPC) in the leaves of olive varieties commonly cultivated in Turkey were determined. An efficient extraction and purification method for OLP was developed, and the antioxidant and antidiabetic effects of the obtained material were subsequently evaluated.

Method: OLP extraction was performed using the ultrasonic-assisted extraction (UAE) method, and the process parameters were optimized using the Response Surface Methodology (RSM). The resulting extract was purified through the removal of lipophilic compounds, liquid-liquid extraction, and silica gel column chromatography. The OLP content was quantified using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), TPC was determined by the Folin-Ciocalteu method, antioxidant activities were assessed by DPPH• and ABTS•⁻ assays, and antidiabetic effects were evaluated using α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition tests.

Results: Among the olive leaf varieties examined in this thesis, the Hamza Çelebi variety had the highest OLP content, while the Çilli variety had the highest TPC content. For the variety with high OLP levels, the optimal UAE conditions for maximum yield were determined as 87% ethanol, 60°C, and 37 minutes, resulting in an OLP yield of 4,87%. Following purification steps, OLP was isolated with 68,29% purity and a 74,37% recovery rate. The DPPH and ABTS activities of the purified material were 107,99±0,93 and 124,37±1,45 mg TE/g, respectively, while those of the extract were 56,21±1,28 and 43,23±1,23 mg TE/g. Both the extract (4,87% OLP) and the purified material (68,29% OLP) exhibited concentration-dependent inhibitory effects on α -glucosidase enzyme. In a comparative analysis, 2000 ppm of acarbose showed 79,38% inhibition, whereas the purified material and extract showed 56,55% and 58,65% inhibition, respectively.

Conclusion: The findings revealed that both olive leaf extract and the purified material exhibited inhibitory activity on the α -glucosidase enzyme, comparable to acarbose, a commonly used antidiabetic agent.

Keywords: oleuropein, ultrasonic, purification, antidiabetic, antioxidant

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beslenmenin Sağlık Üzerindeki Rolü	3
2.2. Diabetes Mellitus	3
2.3. Diyabetin Sınıflandırılması	5
2.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	6
2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	6
2.3.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus	6
2.3.4. Diğer Spesifik Tipler	6
2.4. Diyabet Taraması ve Risk Faktörleri	7
2.5. Diyabetin Komplikasyonları	9
2.5.1. Akut Komplikasyonlar	9
2.5.2. Kronik Komplikasyonlar	9
2.6. Diyabet Tedavi Stratejileri	10
2.6.1. Medikal Tedavi	11
2.6.2. Yaşam Tarzı Değişiklikleri	12
2.6.3. Alternatif Tedavi Yaklaşımları	12
2.7. Zeytin ve Önemi	13
2.8. Zeytin Yaprağındaki Biyoaktif Bileşikler	15
	iii

2.9.	Zeytin Yaprağının Ana Fenolik Bileşiği: Oleuropein	17
2.9.1.	Oleuropeinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	17
2.9.2.	Oleuropeinin Biyosentezi	18
2.9.3.	Oleuropein Emilim, Metabolizma ve Biyoyararlanımı	20
2.9.4.	Oleuropeinin Sağlık Üzerindeki Etkileri	20
2.9.5.	Oleuropein ve Antidiyabetik Aktivite	21
2.10.	Oleuropein Ekstraksiyon Teknikleri	26
2.10.1.	Konvansiyonel Ekstraksiyon Teknikleri	27
2.10.2.	Modern Ekstraksiyon Teknikleri	28
2.11.	Oleuropein Saflaştırma Teknikleri	32
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1.	Bitkisel Materyal	34
3.2.	Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	36
3.3.	Nem Analizi	38
3.4.	Renk Analizi	38
3.5.	Ekstraksiyon Prosedürü	38
3.5.1.	Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyonu	38
3.5.2.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	39
3.5.3.	Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu	39
3.6.	Oleuropein Miktar Tayini	41
3.7.	Geçerli Kılma (Validasyon) Parametreleri	42
3.7.1.	Doğrusallık	42
3.7.2.	Tespit limiti	43
3.7.3.	Tayin limiti	43
3.7.4.	Kesinlik	43
3.7.5.	Doğruluk	43
3.7.6.	Spesifiklik	44
3.8.	Toplam Fenolik Madde Analizi	44
3.9.	Oleuropein Saflaştırılma İşlemleri	44
3.9.1.	Başlangıç Materyalinin Hazırlanması	44
3.9.2.	Lipofilik Bileşenlerin Uzaklaştırılması	44

3.9.3.	Su ile Ekstraksiyon	45
3.9.4.	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	46
3.9.5.	Kolon Kromatografisi	47
3.10.	Antioksidan Analizler	48
3.10.1.	Kasyon Radikali Giderme Aktivitesi Analizi (ABTS ^{•+})	48
3.10.2.	Serbest radikali giderme aktivitesi (DPPH [•])	49
3.11.	Oleuropeinin Antidiyabetik Etkisinin Belirlenmesi	49
3.11.1.	<i>α</i> -Glukosidaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi	49
3.11.2.	<i>α</i> -Amilaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi	54
3.12.	İstatistiksel Analiz	55
4.	BULGULAR	56
4.1.	Numunelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	56
4.1.1.	Nem Analizi Sonuçları	56
4.1.2.	Renk Analizi Sonuçları	57
4.2.	UPLC Validasyon Parametreleri	58
4.3.	Oleuropein Ekstraksiyon Sonuçları	61
4.4.	Oleuropein Miktar Tayini Sonuçları	65
4.4.1.	Farklı Zeytin Çeşidi Yapraklarındaki Oleuropein İçeriği	65
4.4.2.	Mevsimsel Değişimin Oleuropein İçeriğine Etkisi	67
4.4.3.	Yaprakların Lokalizasyonlarına Göre Oleuropeinin Değişimi	68
4.5.	Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları	69
4.6.	Oleuropeinin Saflaştırılması	72
4.7.	Antioksidan Aktivite Sonuçları	74
4.7.1.	ABTS ^{•+} Kasyon Radikali Giderme Aktivitesi Sonuçları	74
4.7.2.	DPPH [•] Serbest Radikali Giderme Aktivitesi Sonuçları	75
4.8.	Oleuropeinin Antidiyabetik Etkisinin Belirlenmesi	75
4.8.1.	<i>α</i> -Glukosidaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi	75
4.8.2.	<i>α</i> -Amilaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi	77
5.	TARTIŞMA	78
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	91

KAYNAKLAR

93

ÖZGEÇMİŞ

111



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Dişabet Risk Faktörleri	8
Tablo 2.2.	Glukoz Toleransına Dayalı Dişabet Tanı Kriterleri	9
Tablo 3.1.	Çalışmada Kullanılan Zeytin Yaprğı Çeşitleri	34
Tablo 3.2.	Deneylerde Kullanılan Cihazlar	36
Tablo 3.3.	Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	37
Tablo 3.4.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Yüzey Yanıt Metodu Tasarımı	40
Tablo 3.5.	Oleuropein Analizi İçin UPLC Analitik Koşulları	42
Tablo 4.1.	Zeytin Yaprğı Renk Parametreleri (L^* , a^* , b^*) Analiz Sonuçları	57
Tablo 4.2.	Oleuropeine Ait Doğruluk (Geri Kazanım) Verileri	60
Tablo 4.3.	Yüzey Yanıt Metodu Tasarımına Göre Ultrasonik Ekstraksiyon Koşulları ve Oleuropein Verimleri (mg/g)	62
Tablo 4.4.	Yüzey Yanıt Metoduna Göre Varyans Analizi ve Model Uygunluğu İstatistikleri	63
Tablo 4.5.	Oleuropein Verimini Maksimize Eden Optimum Koşullar ve Tahmin Edilen Formül	65
Tablo 4.6.	Oleuropein Saflaştırma Adımlarında Ekstrakt Miktarı, Oleuropein İçeriğı ve Kayıp Oranları	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	2021 Yılında Avrupa Kıtası'nda 20-79 Yaş Arası Bireylerde Diyabet Prevalansı (%) (IDF ATLAS, 2021)	5
Şekil 2.2.	Zeytin Yaprağında Bulunan Biyoaktif Bileşiklerin Sınıflandırılması	16
Şekil 2.3.	Oleuropeinin Kimyasal Yapısı	17
Şekil 2.4.	Oleuropeinin Biyosentez Mekanizması (Ahamad ve ark., 2019)	19
Şekil 2.5.	Oleuropeinin Antidiyabetik Etki Mekanizması	25
Şekil 3.1.	Zeytin Yapraklarının Toplandığı T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Arazisi	35
Şekil 3.2.	Zeytin Yaprağı Örneklerine Uygulanan Numune Hazırlama İşlemleri	35
Şekil 3.3.	Çalışmada Kullanılan Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyonu Sistemi	39
Şekil 3.4.	Yüzey Yanıt Metoduyla Gerçekleştirilen Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Denemelerine Ait Ekstraktların Görünümü	41
Şekil 3.5.	Başlangıç Materyalinden Lipofilik Bileşenlerin Uzaklaştırılması Ait Görsel	45
Şekil 3.6.	Zeytin Yaprağı Ekstraktının Klorofilden Arındırılması İşlemi	45
Şekil 3.7.	Filtrasyon Sonrası Elde Edilen Sulu Ekstraktın Görünümü	46
Şekil 3.8.	Zeytin Yaprağı Ekstraktına Uygulanan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon İşlemi	47
Şekil 3.9.	Oleuropeinin Saflaştırılmasında Kullanılan Kolon Kromatografisi İşlemi	48
Şekil 3.10.	Zeytin Yaprağı Ekstraktı ve Saflaştırılan Materyalin DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Değerlendirmesi	49

Şekil 3.11.	α -Glukosidaz İnhibisyon Testi Ön Denemelerine Ait Bir Görsel	51
Şekil 3.12.	α -Glukosidaz İnhibisyon Testi Kapsamında, 8000 ppm Düzeyindeki Test Örnekleri, Akarboz ve İlgili Blank Gruplarına Ait Mikroplaka Yerleşim Düzeni	53
Şekil 3.13.	Zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılan materyal ve oleuropein analitik standardına ait α -amilaz inhibisyonuna yönelik ön denemelere ilişkin görsel	55
Şekil 4.1.	Farklı Zeytin Çeşitlerine Ait Yaprakların Nem İçerikleri (%)	56
Şekil 4.2.	Oleuropein Standart Çözeltilisine Ait Kromatogram (50 ppm)	58
Şekil 4.3.	3,125- 200 ppm Aralığında Oleuropein Analitik Standardına Ait Kalibrasyon Grafiği	59
Şekil 4.4.	Zeytin Yaprağı Ekstraktı Kromatogramı (a); Oleuropein Standardı Eklenmiş Ekstraktın Kromatogramı (b)	61
Şekil 4.5.	Çalışmada Elde Edilen Üç Boyutlu Yüzeyi Yanıt Grafikleri	64
Şekil 4.6.	Kış Döneminde Hasat Edilen Farklı Zeytin Çeşitlerine Ait Yaprakların Ortalama Oleuropein Miktarları (mg/g)	66
Şekil 4.7.	Hamza Çelebi Zeytin Çeşidinde Mevsimsel Değişimin Oleuropein İçeriğine Etkisi	68
Şekil 4.8.	Zeytin Yapraklarının Ağaçtaki Lokalizasyonlarına Göre Oleuropein Miktarındaki Değişimleri	68
Şekil 4.9.	Gallik Asit ile Oluşturulan Toplam Fenolik Madde Kalibrasyon Eğrisi	69
Şekil 4.10.	Kış Mevsiminde Hasat Edilen Zeytin Çeşitlerine Ait Yapraklarda Ortalama Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg/GAE)	70

Şekil 4.11.	Hamza Çelebi Çeşidine Ait Zeytin Yapraklarında Mevsimsel Değişimin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi	71
Şekil 4.12.	Kolon Kromatografisinden Elde Edilen Fraksiyonların Oleuropein İçeriği (ppm)	73
Şekil 4.13.	ABTS ^{•+} Aktivitesi için Oluşturulan Troloks Kalibrasyon Eğrisi	74
Şekil 4.14.	DPPH [•] Aktivitesi için Oluşturulan Troloks Kalibrasyon Eğrisi	75
Şekil 4.15.	Test Örneklerinin Farklı Konsantrasyonlardaki α -Glukosidaz İnhibisyonu (%)	76
Şekil 4.16.	Test Örneklerinin Farklı Konsantrasyonlardaki α -Amilaz İnhibisyonu (%)	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
α	: Alfa
β	: Beta
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
DM	: Diabetes Mellitus
DNSA	: 3,5-dinitrosalisilik asit
g	: Gram
HA	: Ham Absorbans
kg	: Kilogram
kg/m²	: Kilogram/metre kare
kHz	: Kilohertz
L	: Litre
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
MAE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
ME	: Maserasyon Ekstraksiyonu
mg	: Miligram
mg/dl	: Miligram/desilitre
mg/g	: Miligram/gram
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
mM	: Milimolar

MPa	: Megapascal
ppm	: Parts per million
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
m	: Metre
NA	: Net Absorbans
nm	: Nanometre
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
OLP	: Oleuropein
ÖB	: Örnek Blank
pNPG	: p-nitrofenil- α -D-glukopiranozit
R²	: Korelasyon Katsayısı
RSD	: Bağlı Standart Sapma
RSM	: Yanıt Yüzey Yöntemi
SE	: Soxhlet Ekstraksiyonu
SFE	: Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu
SFE-CO₂	: Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyonu
SB	: Substrat Blank
SD	: Standart Sapma
TB	: Tampon Blank
TPC	: Toplam Fenolik Madde
UAE	: Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon
UPLC	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

Tezde ondalık ayracı olarak virgül (,) kullanılmıştır.

1. GİRİŞ

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.), Akdeniz havzasında binlerce yıldır yetiştirilen, ekonomik ve kültürel açıdan büyük öneme sahip bir bitkidir (Filardo ve ark., 2024; Kyriakoudi ve ark., 2024). Türkiye, dünya genelinde önemli zeytin üreticilerinden biri olmasına rağmen, üretim sürecinde ortaya çıkan zeytin yaprağı, büyük oranda atık olarak değerlendirilmekte, genellikle hayvan yemi ya da yakıt olarak kullanılmaktadır (Mir-Cerdà ve ark., 2024; Kabbash ve ark., 2021). Oysa zeytin yaprağı, oleuropein (OLP) başta olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşenler içermesi nedeniyle, farmasötik ve fonksiyonel gıda alanlarında değerlendirilebilecek yüksek katma değerli bir yan üründür.

OLP, antioksidan, anti-inflamatuar ve özellikle potansiyel antidiyabetik etkileri ile öne çıkan fenolik bir bileşiktir. Ancak bu etkilerin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, Türkiye’de yetişen farklı zeytin çeşitlerine ait yaprakların OLP içerikleri hakkında kapsamlı bilimsel veriler yetersizdir. Zeytin yaprağından OLP’nin verimli bir şekilde ekstrakte edilmesi ve saflaştırılması hem akademik hem de endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, OLP’nin saflaştırılmasına yönelik çalışmalar sınırlı olup, saflaştırma süreçlerinin optimizasyonu yeteri kadar aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de yaygın yetiştiriciliği yapılan zeytin çeşitlerine ait yapraklardaki OLP ve toplam fenolik madde (TPC) miktarını belirlemek, OLP için verimli bir ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemi geliştirerek elde edilen bileşiğin antioksidan ve antidiyabetik etkilerini değerlendirmektir. Bu doğrultuda, ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) gibi yenilikçi tekniklerin OLP verimi üzerindeki etkisi incelenmiş; ardından farklı saflaştırma süreçleri optimize edilerek yüksek saflıkta OLP elde edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen materyalin α -amilaz ve α -glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileriyle antidiyabetik etkisi; DPPH[•] ve ABTS^{•+} testleriyle antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca, mevsimsel değişimin yapraklardaki OLP ve TPC içerikleri üzerinde etkisi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, bunun yanı sıra, zeytin yapraklarının renk gibi fiziksel özellikleri ile OLP miktarı arasındaki ilişki ilk kez

kapsamlı bir şekilde incelenerek, yaprak renginin OLP düzeyine dair dolaylı bir gösterge olup olamayacağı araştırılmıştır.

Hipotezler

- **Hipotez 1:** Farklı zeytin çeşitlerine ait yaprakların OLP ve TPC içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır.
- **Hipotez 2:** Farklı zeytin çeşitlerinin yapraklarındaki OLP ve TPC içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif korelasyon vardır.
- **Hipotez 3:** Farklı zeytin çeşitlerinin yapraklarındaki OLP içeriği ve yaprak rengi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır.
- **Hipotez 4:** Aynı zeytin ağacından kış ve yaz mevsimlerinde toplanan yaprakların OLP miktarı ve TPC miktarı mevsimsel değişimlere bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir.
- **Hipotez 5:** Zeytin ağaçlarının farklı lokalizasyonlarından (bazal, orta ve apikal dallarından) elde edilen yapraklar, OLP miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir.
- **Hipotez 6:** Ultrasonik ekstraksiyonda kullanılan etanol oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi gibi parametreler, ekstraksiyon verimliliğini istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilemektedir.
- **Hipotez 7:** Farklı saflaştırma süreçlerinin birleşimi ile OLP en az %30 saflıkta elde edilebilir.
- **Hipotez 8:** Zeytin yaprakları antioksidan kapasiteye sahiptir ve yüksek saflıktaki OLP de bu özeliği gösterir.
- **Hipotez 9:** OLP, in vitro koşullarda α -amilaz enzimini inhibe ederek potansiyel antidiyabetik etki göstermektedir.
- **Hipotez 10:** OLP, in vitro koşullarda α -glukosidaz enzimini inhibe ederek potansiyel antidiyabetik etki göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beslenmenin Sağlık Üzerindeki Rolü

Beslenme, canlı bir organizmanın büyümesi, gelişmesi, yaşamını sürdürmesi ve sağlıklı bir yaşam sürmesi için temel bir gerekliliktir (Nakamura, 2022). Yeterli ve dengeli beslenme, enerjinin ana kaynağı olan makro besinlere (esansiyel yağ asitleri, karbonhidratlar, esansiyel amino asitler vb.) ve hemen hemen tüm gelişimsel ve metabolik süreçler için ihtiyaç duyulan mikro besinleri (vitaminler, mineraller vb.) sağlamakla kalmaz; aynı zamanda birçok fizyolojik sistemin düzenli çalışmasına katkı sağlar (Kiani ve ark., 2022).

Kronik hastalıklar, bulaşıcı olmayan, genellikle uzun süreli, yavaş ilerleyen ve genetik yatkınlık ya da sağlıklı yaşam tarzlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan hastalıklardır. Son yıllarda, küresel düzeyde beslenme alışkanlıkları dünyadaki hemen hemen her ülkede değişime uğramıştır. Özellikle aşırı enerji alımı, dengesiz makro ve mikro besin ögesi tüketimi, doymuş yağ ve rafine karbonhidrat içeriği yüksek diyetler; obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanser türlerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Mozaffarian, 2016; Balwan ve Kour, 2021).

Yaşam süresi beklentisi son iki yüzyılda artış gösterse de mevcut projeksiyonlar; alt solunum yolu enfeksiyonları, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diyabet gibi kronik hastalıkların artışına bağlı olarak gelecek nesillerin yaşam süresinde bir düşüş yaşanabileceğini göstermektedir (Anderson ve Durstine, 2019).

2.2. Diabetes Mellitus

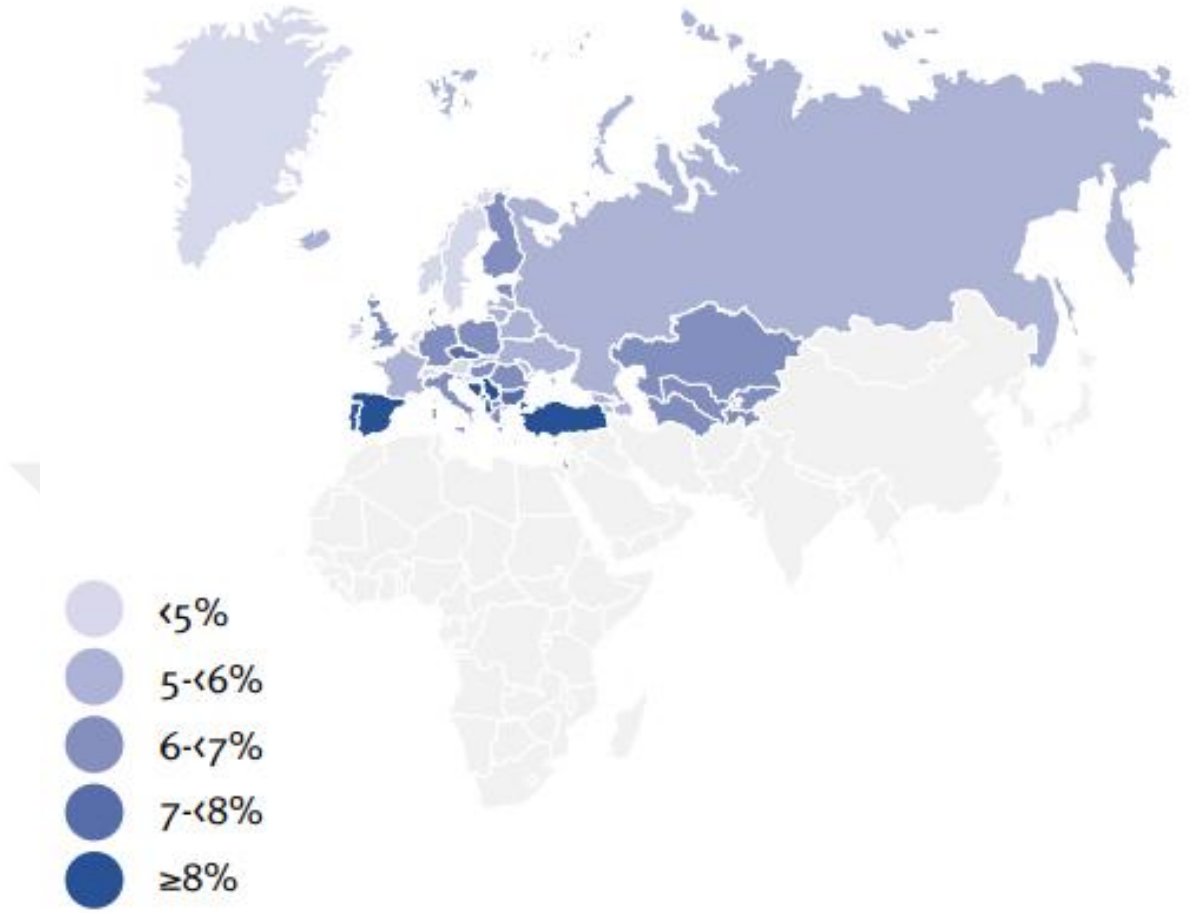
Diyabet, yüzyıllardır bilinen bir hastalıktır. Aretaeus, hastalığı “et ve uzuvların idrara erimesi” olarak tanımlamıştır. Milattan önce 5. yüzyılda ise Hint hekimleri, poliüri hastalarında idrarın tatlı ve bal benzeri tadına dikkat çekmiş ve bu durumu “bal idrarı” anlamına gelen *madhu meha* olarak adlandırmışlardır; bu idrar, karıncaları ve diğer böcekleri çekmiştir. Milattan sonra 5. yüzyıla kadar diyabet tanımları, biri yaşlı ve şişman kişilerde, diğeri ise kısa sürede hayatta kalan ince kişilerde olmak üzere iki formdan

bahsetmiştir. Ancak “*mellitus*” (Latince “bal” anlamında) terimi 17. yüzyılda tanımlamaya eklenmiştir (WHO, 2019).

Diabetes mellitus (DM), insülin salgılanmasındaki, insülin etkisindeki veya her ikisindeki kusurlardan kaynaklanan hiperglisemi, bozulmuş glukoz toleransı, insülin direnci ve hiperlipidemi ile karakterize bir metabolik hastalıktır (Egan ve Dinneen, 2019; Hadrich ve ark., 2015). Diyabetteki karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli, insülinin hedef dokulardaki yetersiz etkisidir (ADA, 2014a).

Günümüzde birçok ülke hızla yayılan küresel bir diyabet "salgınının" eşiğindedir (Darenskaya ve ark., 2021). Bu hastalık, düşük ve orta gelirli ülkelerin kırsal bölgeleri dahil olmak üzere, dünyanın tüm bölgelerinde ve her popülasyonda görülmektedir. Hastalığın neden olduğu yüksek kan glukozu, her yıl neredeyse 4 milyon ölüme yol açmaktadır (WHO, 2019). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), 2021 yılında dünya genelinde 536,6 milyon yetişkin (20–79 yaş) diyabet hastası olduğunu ve bunun dünya nüfusunun %10,5'ini oluşturduğunu bildirmiştir. 2045 yılına gelindiğinde ise diyabetli birey sayısının 783,2 milyona ulaşması ve genel prevalansın %12,2'ye yükselmesi öngörülmektedir. Bu veriler, dünya genelinde diyabetin giderek artan bir halk sağlığı sorunu haline geleceğini göstermektedir (IDF ATLAS, 2021).

Çin, Hindistan, Pakistan ve ABD, 2021 yılında dünya çapındaki diyabetli nüfusun yarısından fazlasına ev sahipliği yapmaktadır. Bu ülkelerin, 2045 yılına gelindiğinde de ilk dört sıradaki yerini koruyacağı öngörülmektedir. Türkiye ise 2045 yılında, 13,4 milyon diyabetli birey ile listeye onuncu sıradan girecek ve ilk on ülke arasına dahil olacaktır (IDF ATLAS, 2021). Şekil 2.1’de 2021 yılında, Avrupa Kıtasında 20-79 yaş aralığında yaşa göre ayarlanmış karşılaştırmalı diyabet prevalansı gösterilmektedir.



Şekil 2.1. 2021 Yılında Avrupa Kıtası'nda 20-79 Yaş Arası Bireylerde Diyabet Prevalansı (%) (IDF ATLAS, 2021)

Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından 2009 yılında yayımlanan Diyabet Atlası'na göre, Türkiye'de diyabet prevalansı %7,4 olarak belirlenmiş ve o dönemde yaklaşık 3,5 milyon olan diyabetli birey sayısının 2030 yılına kadar 6 milyonu aşacağı öngörülmüştür. 10. Diyabet Atlası'nda ise 2021 yılı itibarıyla Türkiye'de 20-79 yaş aralığındaki erişkin nüfusta diyabetin kaba prevalansının %15,9, dünya nüfusuna göre standardize edilmiş karşılaştırmalı prevalansın ise %14,5 olduğu ve diyabetli birey sayısının 9 milyonu geçtiği bildirilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2023). Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TSBA) 2017 yılı verilerine göre ise 20 yaş üstü nüfusta diyabet prevalansı %13,6 olarak belirlenmiştir. Bu yaş grubunda, %15,5 ile en yüksek diyabet prevalansına sahip bölge Batı Karadeniz'dir (TBSA, 2019).

2.3. Diyabetin Sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Derneği'ne göre DM 4 tipte sınıflandırmaktadır (ADA, 2014b).

2.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 DM, pankreasta bulunan ve insülin üreten beta hücrelerinin kaybı sonucu ortaya çıkan, insülin eksikliğine bağlı olarak artan kan glukoz seviyeleri ile karakterize edilen kronik bir otoimmün hastalıktır. Çocukluk çağında en sık görülen endokrin ve metabolik hastalıklardan biridir. Hastaların büyük çoğunluğunda, β -hücre kaybı tip 1 DM ile ilişkili otoimmünitenin bir sonucudur (Katsarou ve ark., 2017). Tip 1 DM, çocukluk çağında sıklıkla görülmesine rağmen, başlangıç yetişkinlerde de görülebilir ve tip 1 diyabet ile yaşayan insanların %84'ü yetişkindir. (WHO, 2019).

2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 DM, β -hücre disfonksiyonu ve değişen derecelerde insülin direnci ile ilişkili kronik bir metabolik bozukluktur. İnsülin direnci; hipertansiyon, obezite ve polikistik over sendromu gibi diğer metabolik durumlarda da görülmekte olup bu durumlar tip 2 diyabetli bireylerde sıklıkla bir arada bulunabilmektedir (Egan ve Dinneen, 2019). Yağ dokusu, kas ve karaciğer gibi hedef organlarda azalmış insülin duyarlılığı, tip 2 DM'nin bir özelliğidir (Zheng ve ark., 2021).

Tip 2 DM, toplam diyabet vakalarının %90 ila %95'ini oluşturur ve en yüksek görülme oranları düşük ve orta gelirli ülkelerde rapor edilmektedir. Bu kişilerin çoğu aşırı kilolu veya obezdir ve bu durum insülin direncinin başlıca nedenidir (WHO, 2019).

2.3.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel DM, diyabet öyküsü olmayan hamile kadınlarda görülmektedir. Gebelik boyunca yüksek kan şekeri seviyeleri ile seyreden bu diyabet tipi, anne ve yenidoğan için ciddi riskler taşımaktadır (Chigurupati ve ark., 2021; ADA, 2014b). Gestasyonel diyabetin patogenezinde, plasenta tarafından salgılanan hormonların (plasental prolaktin, östrojen, progesteron) insüline karşı antagonistik etki gösterdiği öne sürülmektedir (Zhang ve ark., 2021).

2.3.4. Diğer Spesifik Tipler

Tip 1 ve tip 2 DM dışında, belirli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan diğer spesifik diyabet türlerini de bulunmaktadır. Diğer spesifik türler arasında; β -hücre fonksiyonundaki genetik defektler (MODY alt tipleri) ve insülin reseptör defektleri yer almaktadır. Sadece

genetik defektler değil pankreas hastalıklarına bağlı diyabet (pankreatit, kistik fibrozis, pankreatektomi), endokrin bozukluklarla ilişkili diyabet (Cushing sendromu, akromegali, feokromositoma, glukagonoma, hipertiroidizm), glukokortikoidler, tiazid diüretikleri, vacor, pentamidin, nikotinik asit ve dilantin gibi ilaç veya kimyasallara bağlı diyabet görülebilmektedir. Ayrıca, viral enfeksiyonlara bağlı diyabet tipleri arasında konjenital kızamıkçık ve sitomegalovirüs enfeksiyonları bulunurken, genetik sendromlarla ilişkili diyabetler arasında Down sendromu, Turner sendromu, Klinefelter sendromu ve Prader-Willi sendromu bulunmaktadır. Bu spesifik diyabet türleri, tip 1 ve tip 2 DM'den farklı mekanizmalarla ortaya çıkmaktadır (ADA, 2014a).

2.4. Diyabet Taraması ve Risk Faktörleri

Herhangi bir risk faktörü bulunmayan 35 yaş üstü bireylerde periyodik bir şekilde diyabet taraması yapılması önerilmektedir. Bununla birlikte, beden kitle indeksi (BKİ) 25 kg/m^2 ve üzerinde olan bireyler ile diyabet açısından risk faktörleri taşıyan kişilerde, yaş sınırı olmaksızın taramaya başlanabilir. Diyabet tespit edilmese dahi testlerin üç yılda bir tekrarlanması gerekmektedir. Tip 2 DM risk faktörleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir. Otuz beş yaş üzerinde olup BKİ $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ olan ve Tablo 2.1'de belirtilen risk faktörlerinden en az birine sahip bireyler diyabet açısından yüksek risk grubunda kabul edilmektedir. Tip 1 DM için rutin tarama yapılması önerilmemektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2023).

Diyabet için dört tanı testi önerilmektedir. Bunlar arasında açlık plazma glukozu, 75 g oral glukoz tolerans testinden (OGTT) 2 saat sonra plazma glukozu, HbA1c ve diyabet belirtileri ile semptomlarının varlığında rastgele kan glukozu ölçülerek tanı konur.

- **Açlık Plazma Glukozu Ölçümü:** Diyabet tanısı için 8 saatlik açlık sonrası plazma glukozu $\geq 126 \text{ mg/dl}$ (7.0 mmol/L) olmalıdır.
- **2 Saatlik Plazma Glukozu Ölçümü (OGTT Sonrası):** 75 g OGTT sonrası 2 saat sonrası plazma glukozu $\geq 200 \text{ mg/dl}$ (11.1 mmol/L) olmalıdır.
- **HbA1c Ölçümü:** HbA1c $\geq 6.5\%$ olmalıdır.
- **Rastgele Kan Glukozu Ölçümü:** Diyabet belirtileri ve semptomları varlığında rastgele kan glukozu $\geq 200 \text{ mg/dl}$ (11.1 mmol/L) olmalıdır.

Bu değerlerden herhangi biri diyabet tanısını destekler. Semptomsuz kişilerde yüksek değerler tespit edilirse, tanıyı doğrulamak için mümkün olan en kısa sürede, tercihen aynı testle tekrar test yapılması önerilir (WHO, 2019).

Tablo 2.1. Diyabet Risk Faktörleri

Ailede diyabet öyküsü
Hipertansiyon
HDL-kolesterol <35 mg/dl ve trigliserit >250 mg/dl
Kardiyovasküler hastalık
Polikistik over sendromu
Gestasyonel diyabet öyküsü
Makrozomik doğurma öyküsü
İnsülin direnci ile ilişkili durumlar
Şizofreni
Bazı ilaçların kullanımı
Fiziksel inaktivite
Solid organ transplantasyonu öyküsü

Diyabet tanısı için kullanılan bu sınır değerlerin yanı sıra glukoz metabolizmasında henüz diyabet seviyelerine ulaşmamış bozulmalar da klinik açıdan önem taşımaktadır.

Prediabetes, kan glukoz düzeylerinin normal aralık ile diyabet sınırları arasında yer aldığı, ancak henüz diyabet tanısı koymak için yeterli olmadığı bir durumdur. Bu süreç, glukoz seviyelerinin gri bir bölgede bulunduğu geçiş dönemi olarak kabul edilir. Prediabetes, bozulmuş açlık glukozu ve bozulmuş glukoz toleransı olmak üzere iki ana durumu içerir. Bozulmuş açlık glukozunda açlık kan şekeri 100-125 mg/dl arasında seyrederken, bozulmuş glukoz toleransında oral glukoz tolerans testinden 2 saat sonraki kan şekeri 140-199 mg/dl arasındadır. Epidemiyolojik verilere göre, tip 2 DM teşhisi konmadan 5 yıl önce yetişkinlerin yaklaşık %60'ında bu bozukluklardan en az biri görülmektedir (Marcovecchio, 2017). Tablo 2.2' de glikoz tolerans kategorileri gösterilmektedir. (ADA, 2014b).

Tablo 2.2. Glukoz Toleransına Dayalı Diyabet Tanı Kriterleri

Test Parametresi	Normal Glukoz Toleransı	Prediyabet	Diyabet
Açlık Plazma Glukozu	<100 mg/dl	100–125 mg/dl	≥126 mg/dl
OGTT	<140 mg/dl	140–199 mg/dl	≥200 mg/dl
HbA1c	≤ %5,6	%5,7–6,4	≥ %6,5
Rasgele Plazma Glukozu	–	–	≥200 mg/dl (diyabet semptomları ile birlikte)

2.5. Diyabetin Komplikasyonları

DM, sadece metabolik bir bozukluk değil, aynı zamanda birçok akut ve kronik komplikasyonla seyreden sistemik bir hastalıktır. Bu komplikasyonlar, diyabetik hastalarda önde gelen mortalite ve morbidite nedenleridir (Zheng ve ark., 2021). Kronik hiperglisemi, diyabetin hem akut hem de kronik seyrinde önemli rol oynayarak, hastaların prognozunu olumsuz etkileyen komplikasyonların temelini oluşturur (Marcovecchio, 2017). Hiperglisemi yönetimi için mevcut strateji, kan glukozu seviyelerini mümkün olduğunca uzun süre normal aralıkta tutmaya çalışmaktır (Ceriello ve Prattichizzo, 2021). DM komplikasyonlarına yönelik mevcut yaklaşımlar ise var olan patolojiyi tamamen tersine çevirememekte ancak komplikasyonların önlenmesi ve etkin yönetimi üzerine odaklanmaktadır (Cole ve Florez, 2020).

2.5.1. Akut Komplikasyonlar

DM'nin en yaygın akut komplikasyonları, diyabetik ketoasidoz ve hiperozmolar hiperglisemidir. Her iki durum da göreceli veya mutlak insülin eksikliği ile birlikte düzenleyici hormonların (glukagon, büyüme hormonu, kortizol, katekolaminler) artışıyla meydana gelir (Marcovecchio, 2017). Erken tanı ve uygun müdahale ile ölüm oranı düşürülmesine rağmen özellikle çocuklarda beyin ödemi gelişebilir (Dhatariya ve ark., 2020).

2.5.2. Kronik Komplikasyonlar

DM'deki uzun süreli hiperglisemi, birçok organ ve sistem üzerinde geri dönüşü mümkün olmayan kronik komplikasyonlara neden olabilir. Kronik komplikasyonlar, mikrovasküler (retinopati, nefropati ve nöropati) ve makrovasküler (kardiyovasküler bozukluklar,

periferik vasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar) komplikasyonlar olarak ayrılır (Darenskaya ve ark., 2021; Cole ve Florez, 2020; Deshmukh ve ark., 2015).

DM'deki nöropati, özellikle alt ekstremiteleri innerve eden periferik sinirler için sinir hasarının önde gelen sebebidir. Bu sinir hasarı, aşırı ağrı ve yaşam kalitesinin azalmasına ek olarak diyabet olmayan bireylere kıyasla alt ekstremitte amputasyonu riskini 15 kat arttırmaktadır (Cole ve Florez, 2020). Diyabetli hastalarda böbreğin yapısal ve işlevsel anormallikleri diyabetik nefropati olarak adlandırılmakta olup tip 1 ve tip 2 diyabetli hastaların yaklaşık %40'ında gelişmektedir. Nefropati, idrarda albümin atılımı, diyabetik glomerüler lezyonlar ve glomerüler filtrasyon hızının kaybı ile karakterizedir (Liu ve ark., 2022). Diyabetik retinopati ise hipergliseminin retinadaki kan damarlarındaki ilerleyici hasarına bağlı kanamaya ve körlüğe yol açabilen bir durumdur (Cole ve Florez, 2020).

Diyabetin uzun dönemli komplikasyonlarından biri de büyük damarları etkileyen makrovasküler komplikasyonlardır. Makrovasküler komplikasyonların patolojik mekanizması, arter duvarlarının daralmasına yol açan ateroskleroz süreci ile ilişkilidir. Makrovasküler komplikasyonlar arasında koroner arterlerde plak birikimine yol açarak kalp krizi ve kalp yetmezliği riskini artıran koroner arter hastalığı, beyin damarlarının tıkanması veya kanaması sonucu gelişen serebrovasküler hastalıklar, alt ekstremitelerdeki damarları etkileyerek dolaşım bozukluklarına yol açan periferik arter hastalığı bulunmaktadır (Fowler, 2011).

2.6. Diyabet Tedavi Stratejileri

DM'de tedavinin amacı, mikro ve makrovasküler komplikasyonların başlamasını ve ilerlemesini önleyerek, diyabetli bireylere, diyabeti olmayanlarla benzer yaşam kalitesi sunmaktır (Saisho, 2018). Diyabet yönetimi; hastaların düzenli medikal takibi, planlı fiziksel aktivite, uygun farmakolojik tedavi, kan şekeri düzeylerinin izlenmesi ve bireyselleştirilmiş beslenme programlarının uygulanmasını içeren çok yönlü bir süreçtir (Khursheed ve ark., 2019). DM'de ilk müdahale yaşam tarzı değişikliklerine odaklanmaktadır (Marín-Peñalver ve ark., 2016).

2.6.1. Medikal Tedavi

Diyabet tedavisinde kullanılan algoritmalar, diyabet komplikasyonlarının gelişmesini veya ilerlemesini azaltmak için iyi glisemik kontrole olan ihtiyacı vurgulamaktadır (Marín-Peñalver ve ark., 2016). Kan şekerinin normal seviyede tutulması, antidiyabetik ilaçlar ve insülin enjeksiyonu ile mümkündür (Purwanta ve ark., 2017).

İnsülin Tedavisi

Biyosentetik insülin ve insülin analogları, hem tip 1 DM hem de tip 2 DM tedavisinin omurgasını oluşturur (Toledano ve ark., 2016). İnsülin, tip 1 DM'li tüm hastalarda birincil tedavi yöntemidir, ancak tip 2 DM durumunda birincil tedavi olarak kabul edilmez, genellikle oral antidiyabetik ajanlar etkili sonuçlar üretmediğinde insülin tedavisine başvurulur. Tip 2 diyabetli bireylerde insülin tedavisi, hedef HbA1c seviyelerine ulaşmada yetersiz kalan durumlarda komplikasyon riskini azaltmak amacıyla uygulanır (Abiola ve ark., 2016).

Oral Antidiyabetik Ajanlar

Kan şekerini düşüren bazı ajanları içeren farmakolojik tedavi, glisemik kontrolün sürdürülmesi için hayati öneme sahiptir (Seino ve ark., 2015). Bu ilaçlar arasında biguanidler, meglitinidler, sülfonilüreler, dipeptidil peptidaz 4, tiazolidindionlar, sodyum-glikoz ko-taşıyıcı inhibitörleri ve alfa glukosidaz inhibitörleri yer alır (Khursheed ve ark., 2019). Bu ilaçlar arasında metformin, kontrendikasyon bulunmaması durumunda tip 2 diyabetin tedavisinde birinci basamağında yer alan ilaçtır (Inzucchi ve ark., 2015).

Diğer yandan alfa glukosidaz inhibitörleri benzersiz etki mekanizmasından dolayı diğer antidiyabetikler ajanlardan ayrılır. Bu ajanlar, kompleks karbonhidratların monosakkaritlere dönüşümünü erteleyerek postprandiyal glukoz artışını önler. Böylece, özellikle yemek sonrası glisemik kontrolün sağlanmasında etkili olurlar. Akarboz, miglitol ve vogliboz mevcut olan üç alfa glukosidaz inhibitörüdür. Bu ilaçlar arasında akarboz, hiperglisemi tedavisinde 20 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır. (Marín-Peñalver ve ark., 2016; Khursheed ve ark., 2019; Scheen, 1998).

2.6.2. Yaşam Tarzı Değişiklikleri

Yaşam tarzı değişiklikleri ve bireyselleştirilmiş beslenme planları, diyabet yönetiminin temelini oluşturur. Enerji dengesi ise beslenme ve fiziksel aktivite gibi önemli iki parametreden etkilenir. Bu iki parametre diyabet tedavisinin yapı taşı olarak kabul edilir. Birçok randomize kontrollü çalışma, kişiselleştirilmiş beslenme planının, özellikle karbonhidrat sayımının, tüm hastalarda kritik rol oynadığını, HbA1c'yi düşürmede etkili olduğunu göstermiştir (Marín-Peñalver ve ark., 2016).

2.6.3. Alternatif Tedavi Yaklaşımları

Eski zamanlarda insanlar bitkileri, kalp hastalıkları, kanser ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için geleneksel tıpta kullanmışlardır. Hindistan ve Çin'de diyabetin kontrolü için kullanılan geleneksel bitkilerin köklü bir geçmişi vardır. Günümüzde diyabetin tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlar ise kusma, migren, şişkinlik ve baygınlık gibi çeşitli yan etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu bağlamda bitkisel ilaçların daha az yan etkiye sahip olması nedeniyle sentetik ilaçlara iyi bir alternatif olabilirler (Verma ve ark., 2018).

Sentetik bileşiklerin aksine, doğal ürünler çok farklı yapısal çeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle, yeni ilaç geliştirme için öncü bileşiklerin keşfinde önemli bir rol üstlenmektedir (Singh ve ark., 2018). Doğa, birçok sağlık sorununa çözüm bulmanın başlıca kaynağıdır. Günümüzde, 1981 yılından bu yana onaylanan ilaçların yaklaşık %71'i doğrudan ya da dolaylı olarak doğal ürünlerden elde edilmiştir. Bitkiler, tarih boyunca insan hastalıklarının tedavisinde ve yönetiminde önemli bir rol oynamış; birçok geleneksel kültür, bu alanda kapsamlı bir bilgi birikimi geliştirmiştir (Adeniyi ve ark., 2018).

Etnobotanik verilerine göre antidiyabetik etki için 800 farklı bitki kullanılmakta olup bu bitkilerden klinik olarak sadece 450 tıbbi bitkinin antidiyabetik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu 450 bitkiden 109'unun etki mekanizması bilimsel olarak aydınlatılmıştır (Verma ve ark., 2018; Singh ve ark., 2018). Çeşitli klinik çalışmalar, bazı bitki ekstraktlarının antidiyabetik aktivite gösterdiğini ve pankreas β - hücrelerinin etkisini geri kazandırdığını doğrulamıştır (Verma ve ark., 2018). Ayrıca bu doğal bileşiklerin, diyabetin patofizyolojisinde rol alan çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde de etkili olduğu belirtilmiştir (Singh ve ark., 2018).

Antidiyabetik özellikleriyle öne çıkan bazı bitki türleri arasında *Tulbaghia alliacea*, *Tulbaghia violacea*, *Aloe ferox*, *Vinca major* ve *Sutherlandia frutescens* bulunmaktadır. *S. Frutescens* gibi bitkiler, insülin hassasiyetini artırmakta, glikoz emilimini baskılamakta ve lipit birikimini azaltmaktadır (Odeyemi ve Bradley, 2018). *Salacia oblonga* Wall. bitkisinin kök ve kabuklarından izole edilen salasinol ve kotalanol gibi aktif bileşiklerin, α -glukosidaz enzimini inhibe ederek tip 2 DM tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Singh ve ark., 2018). Diğer yandan *Allium sativum* 10 ml/kg dozunda hipoglisemik etki gösterirken, *Aloe vera*'nın 150 mg/kg dozundaki sulu ekstraktı, kan şekeri seviyesini anlamlı şekilde düşürmüştür. *Catharanthus roseus*'un yaprak ve dallarından elde edilen metanolik ekstraktın 500 mg/kg dozunun glukoz seviyesini düşürdüğü, *Momordica charantia*'nın ise içerdiği lectin aracılığıyla insülin benzeri bir etki göstererek 200 mg/kg dozda hipoglisemik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Verma ve ark., 2018). Doğal bileşikler, tedavi edici özelliği göz önüne alındığında, bu bileşikler içinde önemli bir yere sahip olan zeytin yaprağı, geleneksel tıpta ateş, sıtma, hipertansiyon, diyabet, kanser, romatizma, aritmi, solunum ve idrar yolu enfeksiyonları gibi pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Martiny ve ark., 2022; Hassan ve ark., 2024; Zhang ve ark., 2022; Kabbash ve ark., 2021).

2.7. Zeytin ve Önemi

Zeytin ağaçları (*Olea europaea* L.), *Oleaceae* familyasına ait her mevsim yeşil ağaçlardır. *Olea* cinsi 30 türden oluşmasına rağmen, *Olea europaea* en popüler olanıdır ve bu cinsin yenilebilir meyve taşıyan tek türüdür (Kabbash ve ark., 2021; Martiny ve ark., 2022). Yetiştirilmesinin kökeni, tarih öncesi çağlara dayanır ve dünyada en eski yetiştirilen ağaçlardan biridir. Genellikle zeytin ağaçları, zeytinyağı ve sofralık zeytin üretimi için yetiştirilir. Bu ağaç, %98 üretim payı ile Akdeniz havzasında daha sonra Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Avustralya'da yetiştirilmektedir (Filardo ve ark., 2024; Topuz ve Bayram, 2022; Kyriakoudi ve ark., 2024). Zeytin üretimi açısından önde gelen 10 ülke ise İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Fas, Suriye, Mısır, Portekiz ve Cezayir'dir (Kabbash ve ark., 2021). Türkiye'de ise zeytin ve zeytinyağı üretimi çoğunlukla Ege ve Marmara bölgelerinde yapılır. Üretimin yapıldığı başlıca şehirler Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Manisa ve Çanakkale'dir (Uzel, 2018).

Tarım ve gıda endüstrisi, besin üretiminden kaynaklanan yılda yaklaşık 1,3–1,6 milyar ton gibi büyük miktarda atık üretmektedir. Bu önemli miktardaki atık, ciddi ekonomik ve çevresel sorunlara yol açmaktadır. Bu atıkların tamamına yakını, aktif bileşenlerin geri kazanımı için geri dönüştürülebilir özelliktedir (Mir-Cerdà ve ark., 2024). Yan ürünlerin değerlendirilmesi için birçok girişimde bulunulmuştur. Özellikle, ilk başta yeterince değerlendirilmeyen ve görmezden gelinen birçok yan ürün, giderek değerli bileşenlere dönüştürülmektedir. Bu bileşenlerden bazıları ticarileştirilerek besinlerde veya fonksiyonel gıdalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tenore ve ark., 2020). Bu kapsamda, zeytin yaprakları, tarım ve gıda endüstrisinin önemli yan ürünlerinden biri olarak öne çıkmaktadır (Siamandoura ve Tzia, 2023).

Zeytin ağaçlarının budama işlemleri sonucunda hektar başına 1 ile 11 ton arasında atık biyokütle üretilmekte (Kyriakoudi ve ark., 2024) ve bu da ağaç başına yaklaşık 25 kg atık yaprak olarak birikmektedir. Bunun yanı sıra, zeytinyağı üretimi için toplanan zeytinlerin biyokütlesinin yaklaşık %10'u zeytin yapraklarından oluşmaktadır. Bu yan ürünün bir kısmı hayvan yem olarak kullanılırken, bir kısmı da tarlalara saçılarak bertaraf edilmektedir. Ancak büyük bir bölümü, budama sonucu toplanan fazladan dallarla birlikte biyoenerji elde etmek amacıyla yakılmaktadır. Bu süreç, CO₂ emisyonları veya yangın gibi önemli çevresel etkilere yol açmaktadır (Martín-García ve ark., 2022; Lama-Muñoz ve ark., 2019).

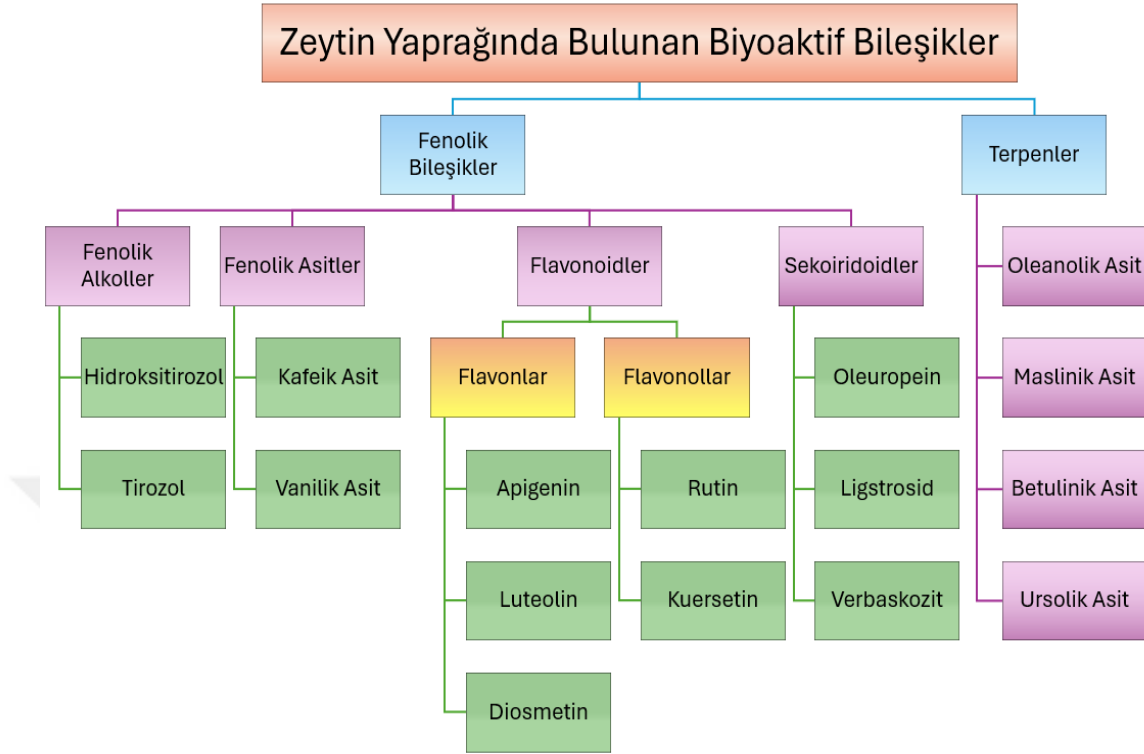
Çevresel sorunlara daha fazla odaklanması ve zeytin yapraklarının ucuz bir hammadde olması nedeniyle bu atıklar, besin takviyelerinin üretimi için ön plana çıkmaktadır (Lama-Muñoz ve ark., 2020; Hassan ve ark., 2024). Polifenoller, flavonoidler, lignanlar ve yağ asitleri açısından zengin olan bu yapraklar, yüksek katma değerli fenolik bileşiklerin elde edilmesi için önemli bir hammadde kaynağıdır (Carrara ve ark., 2023; Kabbash ve ark., 2021). Çevresel sorunlara yönelik artan farkındalık ve tüketicilerin sürdürülebilir üretim yöntemlerine olan talebi, yan ürünlerin yönetimi için stratejiler geliştirilmesinde önemli itici güç haline gelmektedir (Carrara ve ark., 2023). Birçok araştırma, bu atıkları etkin bir şekilde yönetilmesini ve diğer faaliyetlerde yeniden kullanılarak çevresel kirlilik yükünün en aza indirilmesini amaçlamaktadır (Castillo-Luna ve ark., 2023). Atık yaprakların değerli biyoaktif bileşikler kaynağı olarak değerlendirilmesi ise tarım ve gıda

sektörlerinde sürdürülebilir üretimi destekleyen ve kaynak tüketimini azaltmayı hedefleyen döngüsel ve yeşil ekonomiye geçişle uyumlu bir yaklaşımdır (Kyriakoudi ve ark., 2024).

İnsanlık tarihi boyunca yaygın olarak zeytin yaprakları, geleneksel tıpta hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılmış ayrıca hayvan yemi olarak da değerlendirilmiştir (Hassan ve ark., 2024; Anwar ve ark., 2022). Geleneksel tıpta zeytin yaprakları, ateşin düşürülmesi, sıtma, hipertansiyon, diyabet, kanser, romatizma, aritmi, solunum ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde ön plana çıkmıştır (Martiny ve ark., 2022; Hassan ve ark., 2024; Zhang ve ark., 2022; Kabbash ve ark., 2021). Ayrıca hayvan yemlerinde kullanılan zeytin yapraklarının hayvanların et ve süt yağı kalitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Kabbash ve ark., 2021).

2.8. Zeytin Yaprakındaki Biyoaktif Bileşikler

Günümüzde zeytin yaprakları, biyoaktif bileşiklerin önemli bir kaynağı olarak ön plana çıkmaktadır (Zun-Qiu ve ark., 2015). Bu bileşiklerin çeşitli biyolojik aktiviteleri, sağlık üzerindeki olumlu etki göstermektedir. Şekil 2.2’de zeytin yaprakında en bol bulunan biyoaktif bileşiklerin sınıflandırılması gösterilmektedir. Bu bileşikler arasında OLP, verbaskozit ve ligstrosid gibi sekoiridoidler ile fenolik alkoller (hidroksitirozol ve tirozol) bulunmaktadır (Kyriakoudi ve ark., 2024; Irakli ve ark., 2018; Şahin ve ark., 2011). Ayrıca kafeik asit ve vanilik asit gibi fenolik asitler de önemli bileşikler arasında yer alır. Flavonoid sınıfında ise apigenin, luteolin, diosmetin gibi flavonollar ile rutin ve kuersetin gibi flavonollar yer almaktadır (Kyriakoudi ve ark., 2024; Siamandoura ve Tzia, 2023). Bunun yanı sıra terpenler sınıfında oleanolik asit, maslinik asit, betulinik asit ve ursolik asit gibi bileşikler de mevcuttur (Kabbash ve ark., 2023).



Şekil 2.2. Zeytin Yaprığında Bulunan Biyoaktif Bileşiklerin Sınıflandırılması

Zeytin yaprakları, yüksek fenolik bileşik içeriği nedeniyle gıda, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde dikkat çeken bir bitkisel kaynak olarak öne çıkmaktadır (Siamandoura ve Tzia, 2023). Bu biyolojik açıdan aktif bileşenlerin varlığı, zeytin yaprağı ekstraktlarının nutrasötik içecekler, sıvı preparatlar, kurutulmuş yaprak formları ve tabletler gibi çeşitli ticari ürünlerde kullanımını mümkün kılmıştır (Gonzalez-Ortega ve ark., 2023; Kabbash ve ark., 2023). Ayrıca zeytin yaprağı, et ürünleri ile zeytin, ayçiçeği ve soya yağlarında doğal antioksidan ajan olarak kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2022).

Ekstraktlarında bulunan bileşiklerle ilişkili sayısız sağlık faydası göz önüne alındığında, bilimsel topluluğun zeytin ağacı yapraklarının ucuz, sürdürülebilir ve bol miktarda biyoaktif bileşik kaynağı olarak değerlendirilmesine olan ilgisi son yıllarda artmıştır (Kyriakoudi ve ark., 2024). Günümüzde yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar, zeytin yaprağı ekstraktının çok yönlü biyolojik etkilerini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, ekstraktın antimikrobiyal (Ghomari ve ark., 2019), antioksidan (Luo ve ark., 2019), antidiyabetik (Jemai ve ark., 2009), antikanser (Magyari-Pavel ve ark., 2024), anti-inflamatuar (Fayez ve ark., 2023), kardiyovasküler hasarı azaltıcı (Poudyal ve ark., 2010) ve nöroprotektif (Gallego ve ark., 2021) özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Zeytin

yaprağı ekstraktının bu sağlık faydaları, temel olarak çeşitli fenolik bileşiklerin, özellikle de OLP bileşiğinin varlığından kaynaklanmaktadır (Khalil ve ark., 2023).

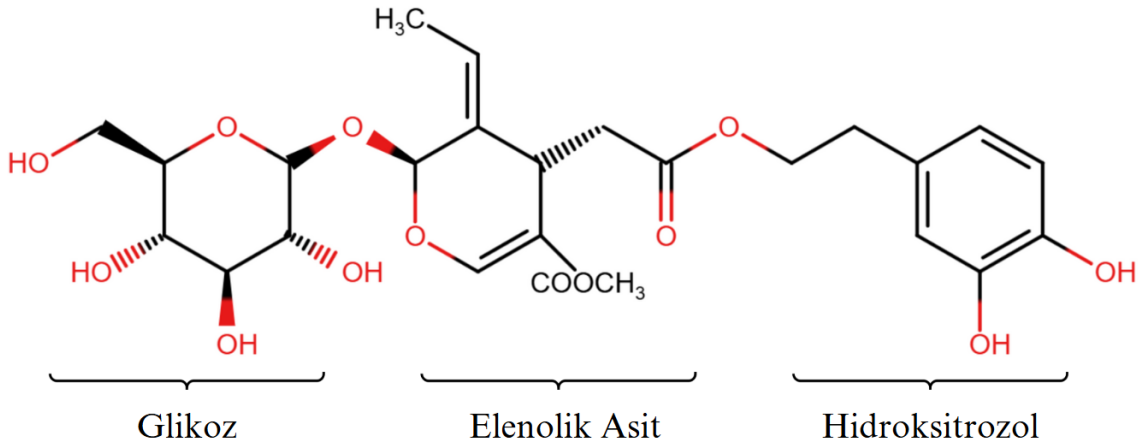
2.9. Zeytin Yaprağının Ana Fenolik Bileşiği: Oleuropein

OLP bileşiği en yüksek miktarda zeytin yapraklarında bulunmakla birlikte aynı zamanda *Jasminum grandiflorum* (Hussein ve ark., 2021), *Osmanthus fragrans* (Liao ve ark., 2021), *Syringa pubescens* (Wu ve ark., 2021), *Syringa Vulgaris* L. (Hanganu ve ark., 2021), *Phillyrea latifolia* L. (Agati ve ark., 2011), *Fraxinus Americana* L., *Fraxinus excelsior* L., (Sanz ve ark.,2012), *Syringa josikaea* ve *Ligustrum ovalifolium* (Omar, 2010) gibi bitkilerde de bulunmaktadır.

Zeytin yapraklarındaki OLP içeriği, zeytin meyvesi ve yağındakinden daha yüksektir. Yapraklardaki OLP içeriği kuru ağırlığın %14'üne kadar ulaşırken, zeytinyağında %0,005 ile %0,12 arasında değişmektedir. OLP, yapraktaki toplam fenolik bileşiklerin %20-60'ını temsil eden başlıca fenolik bileşiktir (Martínez-Navarro ve ark., 2021; Zun-Qiu ve ark., 2015; Li ve ark., 2011; Siamandoura ve Tzia, 2023; Kabbash ve ark., 2021).

2.9.1. Oleuropeinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

OLP, ilk kez 1908'de tespit edilmiş, kimyasal yapısı ise 1960'ta tanımlanmıştır (Khalil ve ark., 2023). Şekil 2.3.'te OLP'nin kimyasal yapısı sunulmuştur.

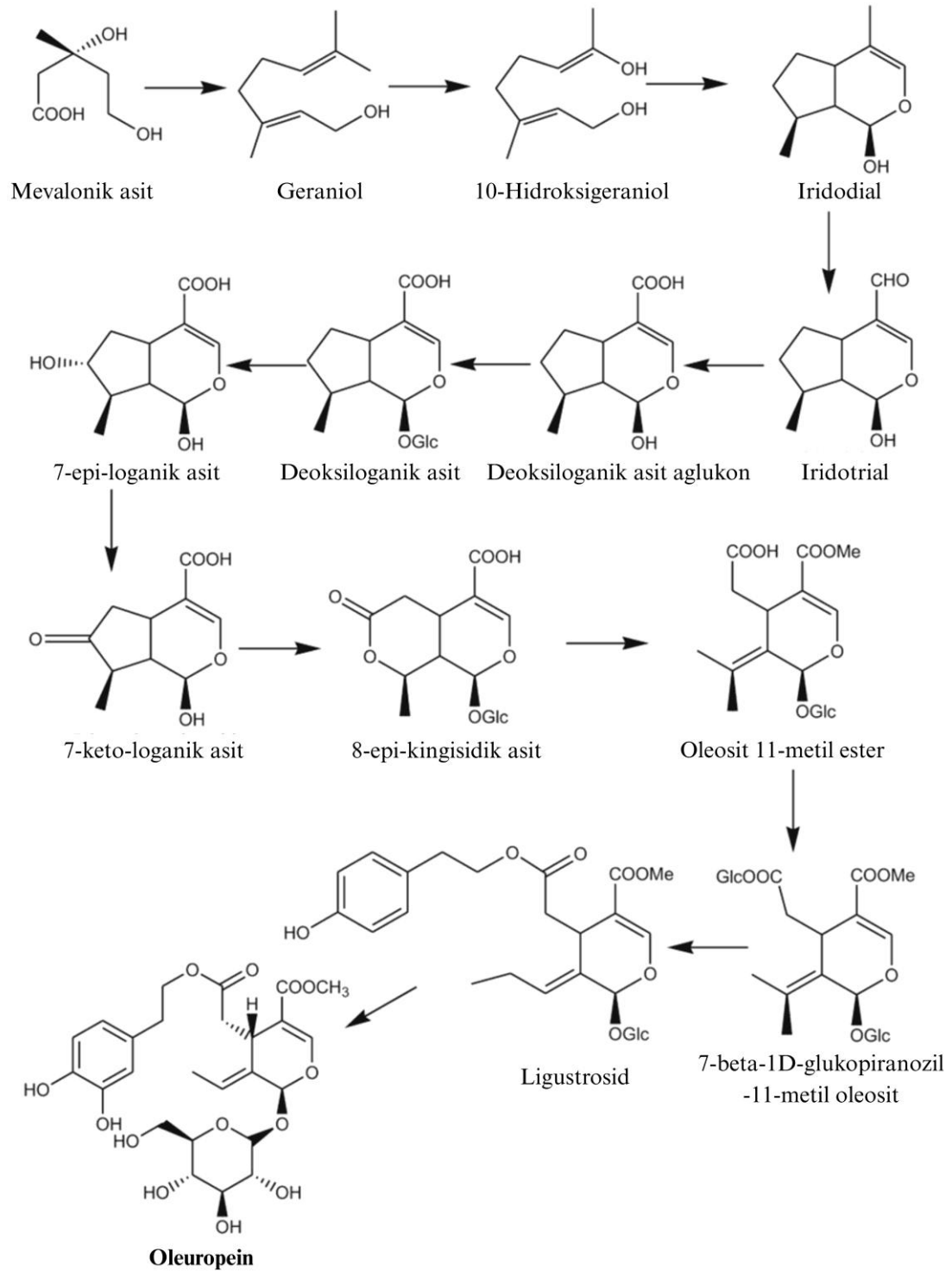


Şekil 2.3. Oleuropeinin Kimyasal Yapısı

OLP molekülü, yapısal olarak üç ana alt birimden oluşur: Elenolik asit molekülü ile hidroksitirozolün ester bağı ve bir glikoz molekülünün glikozidik bağla eklenmesiyle oluşan bir sekoiridoid glikozittir (Martínez-Navarro ve ark., 2021). OLP, genellikle aglikon formunda bulunur ve olgunlaşmamış meyvelere acı tadını veren bir bileşiktir (Hassan ve ark., 2024; Carrara ve ark., 2023).

2.9.2. Oleuropeinin Biyosentezi

Damtoft ve arkadaşları 1992 yılında OLP biyosentezi için bir yol önermişlerdir. OLP biyosentezi mevalonik asit yolunu takip eder. Mevalonik asit yolundaki dallanma, geraniol, 10-hidroksigeranoil, 10-hidroksinerol ve iridoidal biyosentezine yol açar. İridoidalardan loganin sentezlenir ve daha sonra deoksiloganik asit, 7-epiloganik asit ve loganik asit, ligustroside dahil edilir. Ligustroside, 7-ketologanik asit aracılığıyla OLP'nin doğrudan öncüsü olarak kabul edilir. Deoksiloganik asit, 7-epiloganik asit, 7-ketologanik asit, 8-epikingizidik asit, oleosid 11-metil ester, 7-β-1-D-glukopiranozil 11-metil oleosid ve ligustrosidden OLP'ye olası bir biyosentetik yol izlenir. Şekil 2.4'te OLP'nin biyosentezi sunulmuştur (Ahamad ve ark., 2019).



Şekil 2.4. Oleuropeinin Biyosentez Mekanizması (Ahamad ve ark., 2019)

2.9.3. Oleuropein Emilim, Metabolizma ve Biyoyararlanımı

OLP mideye ulaştığında, ortamın pH'ı ve midedeki kalma süresine bağlı olarak farklı metabolitlerin oluşumuyla asit hidrolizine uğrar. Asit katalizli hidroliz, glikoz ve aglikon kısmının serbest bırakılmasıyla β -glikozidik bağına parçalar; bu kısımdan iki dialdehit oluşur. Bu dialdehitler kararsızdır ve transpoze sekoteroid olarak bilinen metabolite dönüşürler. Bu metabolit, stabil bir lipofilik bileşiktir. Ancak aşırı ve uzun süreli asidik koşullar altında, iki ester grubunun parçalanmasıyla hidroksitirozol parçasını kaybeder. Kısacası enzimatik hidroliz yönteminde, OLP, β -glukosidaz enzimi tarafından glikoz ve OLP aglikonuna parçalanır. Ardından, esteraz enziminin etkisiyle hidroksitirozol ve elenolik asit oluşur (Carrera-González ve ark., 2013; Hassan ve ark., 2024).

Mideden hidrolize edilmemiş OLP bağırsaklarda emilir. OLP için birkaç emilim yolu önerilmiştir. Hücre zarından enerji harcamadan kendiliğinden geçerek pasif difüzyon yoluyla, bağırsak hücreleri arasındaki boşluklardan geçerek paraselüler taşımayla veya glukoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücrelere taşınarak emilebilir (Vissers ve ark., 2002). Ayrıca kalın bağırsak mikrobiyotası ince bağırsaklardan emilmeyen veya gastrozestizan kapsüller halinde verilen OLP'nin fermente edilmesine yardımcı olur ve OLP, bağırsak mikrobiyotası tarafından hidroksitirozole dönüştürülür (Mosele ve ark., 2014; Carrera-González ve ark., 2013). İnsanlarda uygulanan ligistrozid-aglikon, hidroksitirozol, tirozol ve OLP-aglikon emiliminin %55-66 olduğu tespit edilirken OLP emilimi ve metabolizmasına ait hala kesin sonuçlar mevcut değildir (Vissers ve ark., 2002).

2.9.4. Oleuropeinin Sağlık Üzerindeki Etkileri

Zeytin yaprağı, yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli bir bitkisel kaynaktır. Abdallah ve arkadaşları (2022) tarafından yürütülen bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktı uygulanan farelerde nöroenflamasyonun azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Olmez ve arkadaşları (2015) ile Yoon ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan fare modeli çalışmalarında; toplam ve düşük yoğunluklu lipoprotein, serum trigliserit, karaciğer lipit düzeyleri ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerinde anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.

Oral yolla OLP açısından zengin ekstraktlar verilen 232 hipertansif hastayı kapsayan bir çalışma, düşük yoğunluklu lipoprotein, trigliserit, sistolik ve diyastolik kan basıncında anlamlı bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur (Covas ve ark., 2006). Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, OLP'nin trombosit agregasyonunu inhibe ederek kardiyoprotektif ve antihipertansif etkiler gösterdiğini bildirmiştir (Agrawal ve ark., 2017). COVID-19 hastalarında yapılan bir klinik çalışmada ise %30 OLP içeren zeytin yaprağı ekstraktı kapsüllerinin solunum hızı, nabız, vücut sıcaklığı ve oksijen saturasyonunu iyileştirdiği; eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein düzeyi ve hastanede kalış süresini azalttığı görülmüştür (Ahmadpour ve ark., 2023).

Fare modelinde OLP, nöronal apoptoz ve enfarktüs hacminin azaltılması yoluyla reperfüzyon hasarına ve serebral iskemiğe karşı nöroprotektif potansiyel göstermiştir (Yu ve ark., 2016). Benzer şekilde anestezi uygulanmadan önce OLP ile ön tedavi edilen tavşanlarda, inflamatuvar hücre sayısının azaldığını gözlemlenmiş ve bu durum mast hücre aktivasyonunun engellenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Şimsek ve ark., 2018). Kardiyotoksik sıçanlarda OLP intravenöz uygulanması, laktat dehidrogenaz, alanin aminotransferaz, kreatin fosfokinaz-MB ve kreatin fosfokinaz düzeylerinde azalmaya yol açmıştır (Andreadou ve ark., 2007). Tavşanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, OLP uygulamasının miyokardiyal hasarı azalttığı, kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürdüğü, ayrıca süperoksit dismutaz içeriğini artırdığı gözlemlenmiştir (Andreadou ve ark., 2006).

Ayrıca OLP, atopik dermatit gibi cilt rahatsızlıklarına karşı da etkinlik göstermiştir (Huang ve ark., 2022). Karaciğer, akciğer, kolon, serviks, nöroblastoma, meme, prostat, tiroid ve pankreas kanseri gibi farklı kanser hücre hatlarına karşı potansiyel antikanser özelliklerinin olduğunu bildirmiştir (Imran ve ark., 2018; Liu ve ark., 2019). Bunun yanı sıra OLP'nin antimikrobiyal etkileri de mevcuttur (Lee ve Lee, 2010; Zorić ve Kosalec, 2022).

2.9.5. Oleuropein ve Antidiyabetik Aktivite

OLP, zeytin yaprağı ve zeytinyağında bol bulunan bir polifenolik bileşiktir ve son yıllarda diyabet üzerindeki yararlı etkileriyle dikkat çekmektedir (Da Porto ve ark., 2021).

Zheng ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada tip 2 ileri evre diyabetik farelere 15 hafta OLP (200 mg/kg/gün) verilmesinin glukoz toleransını iyileştirdiği, açlık kan şekerini anlamlı oranda düşürdüğü ve insülin direnci indeksini azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca tedavi edilen diyabetik farelerde insülin sinyal iletiminde kilit rol oynayan protein kinaz B aktivasyonu artmış, aynı zamanda OLP uygulamasıyla pankreas adacık hasarının gerilediği bulunmuştur.

Bock ve arkadaşlarının (2013) orta yaşlı kilolu erkeklerde yaptıkları randomize çapraz tasarımlı bir çalışmada 12 hafta süreyle zeytin yaprağı takviyesi (günlük 51,12 mg OLP ve 9.67 mg hidroksitirozol) insülin duyarlılığını %15 oranında artırmıştır. Aynı çalışmada OLP yönünden zengin ekstraktın pankreatik β -hücre yanıtını da %28 oranında artırdığı raporlanmıştır.

OLP'nin iskelet kasındaki glukoz alımını artırmadaki rolü, C2C12 kas hücreleri üzerinde ve diyetle obezite oluşturulmuş farelerde gösterilmiştir. OLP, insülin yokluğunda dahi glukoz taşıyıcı tip 4'ün kas hücre zarına taşınmaya teşvik ederek hücre içine glukoz alımını artırmıştır. Bu etki, insülin sinyalinin alt basamaklarından protein kinaz B'dan bağımsız olarak siklik adenosin fosfat ile aktive edilen protein kinaz aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşmiş ve OLP'nin palmitat nedeniyle gelişen insülin direncini hücrelerde önlediği gözlemlenmiştir. Yüksek yağlı diyetle insülin direnci oluşturulmuş farelerin kas dokusunda da benzer şekilde OLP takviyesi glukoz taşıyıcı tip 4'ün hücre zarına translokasyonunu artırmış ve kaslarda insülin etkisini güçlendirmiştir (Fujiwara ve ark., 2017).

OLP'nin bağırsaklardaki glukoz emilimine etkisini araştıran başka bir çalışmada, OLP bakımından zengin zeytin yaprağı ekstraktının disakkaridaz enzimlerini ve bağırsak glukoz taşıyıcılarını inhibe ettiğini ortaya koymuştur. OLP, laboratuvar ortamında insan α -glukozidaz enzimlerini baskılamış ve Caco-2 ince barsak hücre kültürlerinde glukoz taşınmasını azaltmıştır. Ayrıca glukoz taşıyıcı tip 2 eksprese eden *Xenopus* oositlerinde glukoz taşınmasını engellediği gösterilmiştir. Klinik olarak, sağlıklı gönüllülerle yürütülen çapraz kontrollü deneylerde OLP çözeltisi, 25 g sakkaroz yüklemesi sonrası postprandiyal kan şekeri yükselişini belirgin şekilde azaltmıştır. Bu etki, OLP'nin ince bağırsakta şeker sindirimini ve emilimini yavaşlatarak yemek sonrası glisemiye

hafifletebildiğini göstermektedir. Nitekim in vitro gözlemler de OLP maruziyeti altında bağırsak epitelinde glukoz taşıyıcı tip 2 aracılı glukoz taşınmasının azaldığını desteklemektedir (Kerimi ve ark., 2019).

Alloksan ile diyabet oluşturulmuş tavşanlarda 16 hafta boyunca OLP (25 mg/kg/gün) verilmesi, kan glukoz düzeylerini düşürdüğünü, diyabette yükselen malondialdehit seviyelerini de belirgin biçimde azalttığını göstermiştir. Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olup OLP uygulamasıyla düşmesi, OLP'nin oksidatif stresi hafiflettiğini göstermektedir (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2007). Jemai ve arkadaşları (2009), zeytin yaprağı polifenollerinin hem antidiyabetik hem de antioksidan etkileri birlikte değerlendirdiği bir çalışmada diyabetik farelere 4 hafta boyunca OLP açısından zengin ekstrakt verilmesi hiperglisemiye anlamlı derecede bastırmış ve diyabet nedeniyle bozulan lipid profili ve antioksidan enzim aktivitelerini düzeltmiştir. Tedavi edilen diyabetik sıçanlarda karaciğer ve serum antioksidan sistem bileşenleri (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) OLP sayesinde yeniden dengelenmiş; lipid peroksidasyon ürünü TBARS düzeyleri azalmıştır. OLP ve hidrokortizolün diyabet patolojisine eşlik eden oksidatif stres yükünü azaltarak antidiyabetik etki gösterebileceğini vurgulamışlardır (Jemai ve Sayadi, 2009).

Streptozotosin ile insülin açıkları oluşturulan ve yüksek yağlı diyetle insülin direnci gelişen sıçanlarda OLP açısından zengin zeytin yaprağı ekstraktı verilmesi, proinflamatuar sitokinlerin (tümör nekroz faktörü-alfa, interlekin-6 ve interlekin-1 beta) ekspresyonunu baskılamıştır. Bu sayede OLP uygulanan diyabetik sıçanlarda inflamasyon kaynaklı insülin direncinin hafiflediği ve glukoz metabolizmasının iyileştiği sonucuna varılmıştır (Liu ve ark., 2014). Başka bir çalışmada OLP'nin interlekin-1 beta ile uyarılmış insan sinovyal hücrelerinde siklooksijenaz-2, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri üretimini baskıladığı, böylece inflamasyon ve oksidatif stresi aynı anda hafiflettiği gösterilmiştir (Castejón ve ark., 2017)

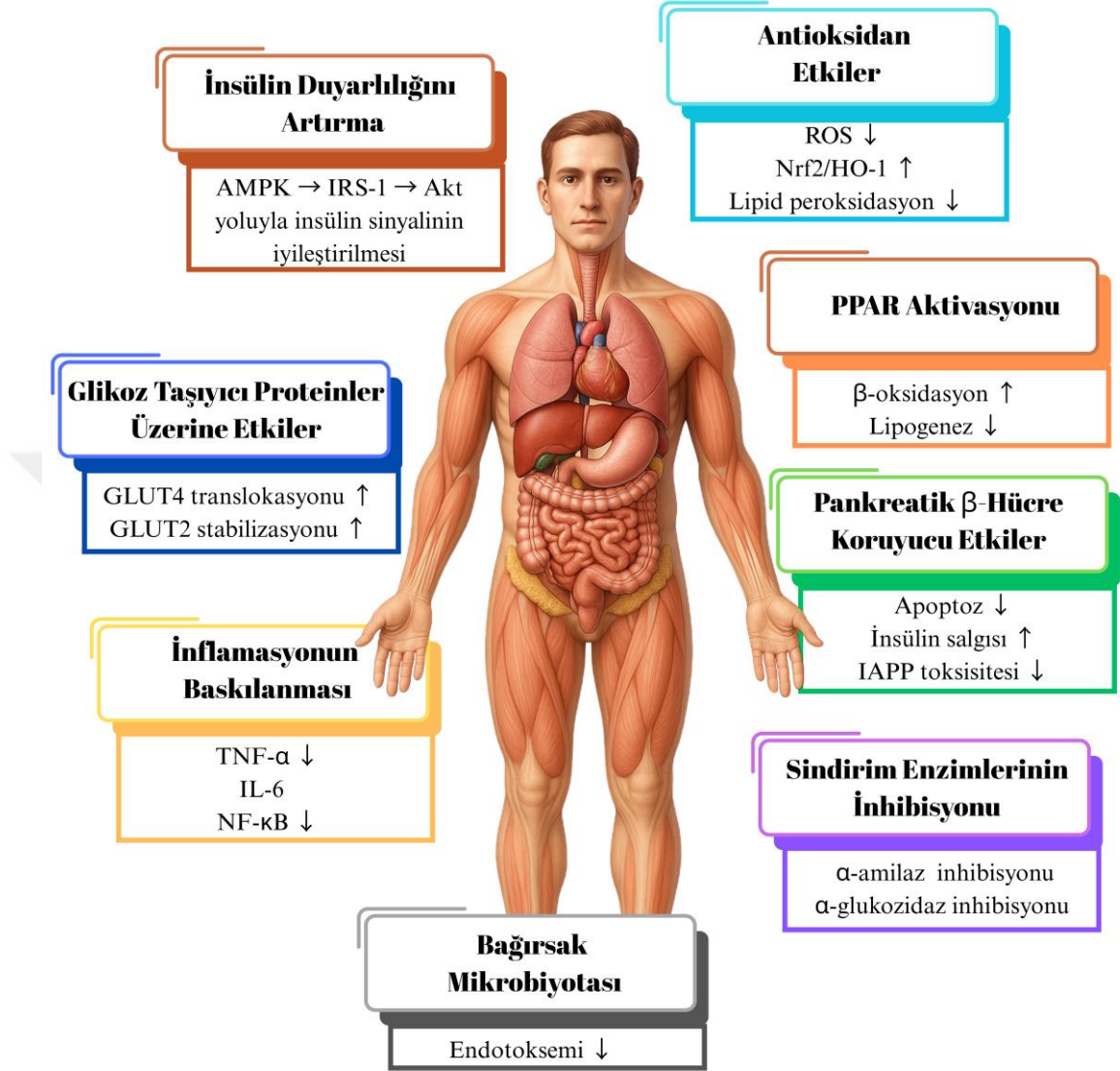
Primer hepatosit kültürlerinde ve farelerde OLP uygulaması, peroksizom proliferatör-aktif reseptör alfa'yı aktive ederek yağ asidi taşınması ve oksidasyonu ile ilişkili bir dizi genin ifade düzeylerini artırmıştır. Özellikle karaciğerde β -oksidasyon enzimleri ve apolipoprotein genlerinde artış saptanmış; dolaşımdaki serbest yağ asidi seviyeleri ve

karaciğer yağ birikiminin azaldığı raporlanmıştır. Bu sayede OLP, proliferatör-aktif reseptör alfa aktivasyonu üzerinden lipid metabolizmasını hızlandırarak insülin duyarlılığını dolaylı yoldan iyileştirebilir (Malliou ve ark., 2018).

OLP tedavisinin beyaz yağ dokusunda proliferatör-aktif reseptör gama ekspresyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini ve insülin duyarlılığını artıran adiponektin düzeylerini yükselttiğini göstermiştir. OLP'nin proliferatör-aktif reseptör gamayı baskılayarak yağ birikimini engellediği, bunun da obeziteyle ilişkili insülin direncini hafifletmeye katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Hadrach ve ark., 2016).

OLP verilen diyabetik farelerde, obezite ve diyabette azalma eğiliminde olan *Akkermansia* cinsi bakterilerin belirgin biçimde arttığı, buna karşın diyabetik disbiyozda aşırı çoğalabilen *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Parabacteroides* gibi bazı cinslerin anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır. Filum düzeyinde bakıldığında OLP tedavisiyle *Verrucomicrobia* ve *Deferribacteres* üyelerinin arttığı, *Bacteroidetes* oranının ise azaldığı rapor edilmiştir. Bağırsak mikrobiyotasındaki bu değişikliklerin, metabolik iyileşmeye katkı sağlayabilecek yönde olduğu belirtilmiştir. OLP'nin bağırsak bakterilerinin fermente kapasitesini ve metabolit profilini değiştirdiği, kısa zincirli yağ asidi üreten yararlı türleri artırarak glukoz homeostazına dolaylı katkı yapabileceği önerilmektedir (Zheng ve ark., 2021).

OLP uygulaması, doza bağımlı biçimde glukoz uyarılı insülin salgısını artırmış ve bu etkinin mitojen aktif edilmiş protein kinaz yolak aktivasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca OLP'nin, tip 2 diyabette amiloid birikimi sonucu β -hücre ölümüne katkı yapan adacık amiloid polipeptit toksisitesine karşı hücreleri koruduğu bulunmuştur. OLP varlığında INS-1 hücreleri, insan amiloid fibrillerinin sitotoksik etkilerinden büyük ölçüde korunarak canlı kalmıştır. OLP tedavisi uygulanan diyabetik farelerde pankreatik adacıkların histolojik organizasyonunun iyileştiği, β -hücre morfolojilerinin sağlıklı yapıya yakın seyrettiği bildirilmiştir. Bu iyileşme, OLP'nin hipergliseminin β -hücreler üzerindeki toksik etkilerini azalttığı ve adacık bütünlüğünü koruduğuna işaret etmektedir. Ayrıca OLP verilen diyabetik hayvanlarda dolaşımdaki insülin seviyelerinin dengelendiği ve pankreas insülin içeriğinin korunduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Oleuropeinin antidiyabetik etki mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Oleuropeinin Antidiyabetik Etki Mekanizması

2.10. Oleuropein Ekstraksiyon Teknikleri

Zeytin yapraklarının fenolik profili, zeytin çeşidi, çevresel koşullar (iklim, toprak özellikleri, coğrafi konum) ve hasat sonrası işleme süreçleri (kurutma, koruma yöntemleri) gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Coğrafi köken, rakım ve mevsim gibi unsurlar, yapraklardaki biyoaktif bileşenlerin miktarını ve kompozisyonunu doğrudan etkileyerek fenolik içerikte belirgin farklılıklara neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2022; Irakli ve ark., 2018). Yüksekliği 1200 m ve 800 m olan bölgelerden elde edilen örnekler karşılaştırıldığında, 800 m rakımdan toplanan zeytin yaprağı örneğinin daha yüksek OLP miktarına sahip olduğu bulunmuştur (Anwar ve ark., 2022). Ayrıca, ocak ayında toplanan zeytin yapraklarının, OLP içeriği bakımından yaz ayında toplanan yapraklara göre daha zengin olduğu gösterilmiştir (Zun-Qiu ve ark., 2015). Bunun yanında, yaprakların uygun koşullarda kurutulması, nem içeriğini azaltarak fenolik bileşenlerin korunmasına ve depolama sırasında kalitenin korunmasına katkı sağlamaktadır (Cör Andrejc ve ark., 2022). Bu bulgular, zeytin yapraklarından yüksek kaliteli fenolik ekstrakt elde edilmesi için yetiştirme ve işleme koşullarının önemini ortaya koymaktadır. Tüm bu parametrelere ek olarak bitkisel kaynaklardan biyolojik olarak aktif bileşiklerin ekstraksiyonu, doğal ürün araştırmalarının en kritik adımlarından biridir.

Ekstraksiyon verimliliği, numune matriksinin doğasına, ekstrakte edilecek analite ve analitin matriks içindeki konumuna bağlı olarak değişir (Xynos ve ark., 2012). Hedef analitlerin örnek matriksinden ekstraksiyonu, örnek hazırlama sürecinin en önemli adımlarından biridir. Bu yöntemler, analizlerin duyarlılığını ve seçiciliğini artırmayı amaçlar. İyi bir örnek hazırlama, matriksten karışan bileşiklerden arındırılmış ve yüksek konsantrasyona sahip hedef analitlerin elde edilmesini sağlar (Ismaili ve ark., 2016). Ekstraksiyon sürecinin verimliliği; bitki türü, ekstrakte edilecek bileşik, bileşiğin materyaldeki konumu, çözücü türü, ekstraksiyon süresi, sıcaklığı ve saflaştırma yöntemlerine bağlı olarak değişir (Otero ve ark., 2020).

Bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon işlemiyle ilgili çeşitli yöntemler bulunmaktadır, ancak her ekstraksiyon yönteminin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır (Martiny ve ark., 2022). Bu ekstraksiyon yöntemleri, konvansiyonel ve modern ekstraksiyon yöntemleri olarak iki ayrılır.

Konvansiyonel ekstraksiyon teknikleri arasında, çözücülerle karıştırarak yapılan maserasyon ekstraksiyonu (ME) ve çözücünün sürekli olarak bitki materyali üzerinden geçmesini sağlayan soxhlet ekstraksiyonu (SE) yer alır (Ismaili ve ark., 2016). Modern ekstraksiyon teknikleri ise daha verimli ve çevre dostu sonuçlar elde etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, ultrasonik dalgaların çözücü ile bitkisel materyali etkileştirerek daha hızlı bir ekstraksiyon sağlayan ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga enerjisi kullanarak işlemi hızlandıran mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ve süper kritik sıvı kullanılarak yapılan süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) öne çıkar (Kyriakoudi ve ark., 2024; Martiny ve ark., 2022; Giacometti ve ark., 2018; Ismaili ve ark., 2016).

2.10.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Teknikleri

Konvansiyonel ekstraksiyon teknikleri, çözücülerin doğru seçimine ve ekstraksiyon verimliliğini artırmak için ısıtmaya ve/veya çalkalamaya dayanır. Ancak bu ekstraksiyon teknikleri, genellikle daha uzun ekstraksiyon süresi ve büyük miktarda çözücü kullanımını gerektirir (Taamalli ve ark., 2012). Zeytin yaprağı fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonunda, etanol ve metanol gibi organik çözücüler ile su kullanılarak yapılan konvansiyonel ekstraksiyonlar yaygın olsa da düşük ekstraksiyon verimliliği ve uzun ekstraksiyon süresi nedeniyle dezavantajlar sunmaktadırlar (Siamandoura ve Tzia, 2023). ME ve SE gibi ekstraksiyon yöntemleri konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinin başlıca örneklerindendir (Ismaili ve ark., 2016).

Maserasyon Ekstraksiyonu

ME, soğuk çözücü ekstraksiyonu olarak da bilinen, bitkinin farklı bölümlerinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılan en eski ve en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, bitki materyali çalkalama yapılmaksızın veya çalkalama eşliğinde oda sıcaklığında bir ekstraksiyon çözücüsüne daldırılır (Khalil ve ark., 2023). Ancak bu teknik, yüksek miktarda çözücü ihtiyacı, uzun ekstraksiyon süreleri, düşük seçicilik ve düşük verimlilik gibi dezavantajlara sahiptir (Martín-García ve ark., 2022). Ayrıca bazı biyoaktif bileşiklerin kaybına ve yüksek enerji tüketimine neden olabilir (Cifá ve ark., 2018).

Ansari ve arkadaşları (2011), zeytin yapraklarından OLP ekstraksiyonu için deiyonize su ve farklı çözücü oranlarını 40°C, 60°C ve 80°C'de test etmişlerdir. En yüksek OLP verimi, 60°C'de 4 saatte deiyonize su kullanılarak 13 mg/g olarak elde edilmiştir. Benzer şekilde, en iyi ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı başka bir çalışmada, pH 3'te ve 60°C'de ekstraksiyon çözücüsü olarak su kullanılarak zeytin yaprağından 19,3 mg/g OLP içeriği elde edilmiştir (Benincasa ve ark., 2019).

Soxhlet Ekstraksiyonu

SE, bitkisel materyallerden çözünür bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, örnek sürekli olarak taze ekstrakt ile temas ettirilir, çözücünün taşıma seviyesiyle ekstrakte edilen bileşikler toplanır. SE'nin avantajları arasında yüksek verimlilik ve kolay uygulanabilirlik yer alırken, dezavantajları arasında yüksek ekstraksiyon süresi, büyük miktarda çözücü ve ısıya duyarlı bileşiklerin bozulması bulunur (de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Lama-Muñoz ve arkadaşları (2020), SE ile basınçlı sıvı ekstraksiyon tekniklerini karşılaştırdığı bir çalışmada SE ile %60 etanol kullanılarak 4 saat ekstraksiyon süresi ile zeytin yapraklarındaki OLP içeriğinin 122,3 mg/g olduğu bildirilmiştir. Ancak basınçlı sıvı ekstraksiyonun, daha kısa ekstraksiyon süresi, düşük çözücü tüketimi ve enerji maliyetleri ile potansiyel endüstriyel uygulamalar için daha uygun bir alternatif olarak öne çıktığını belirtmişlerdir.

2.10.2. Modern Ekstraksiyon Teknikleri

Bitki materyalleri, karmaşık matriks yapılarından dolayı bileşiklerin ekstraksiyonunu zorlaştırabilir. Diğer yandan konvansiyonel ekstraksiyon yöntemleri genellikle sürdürülebilir olmayan çözücülerin kullanımını içerir. Bunlara ilaveten doğal ürünlerin sürdürülebilir ve çevre dostu ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmesi kimya ve teknoloji alanında önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Benincasa ve ark., 2019).

Doğal bileşiklerin ekstraksiyonu için UAE, SFE-CO₂ ekstraksiyonu ve MAE yöntemlerinin kullanılması ise daha yüksek ekstraksiyon verimliliği, küçük çözücü hacmi ve kısa ekstraksiyon süresi sunarak konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerine göre çeşitli avantajlara sahiptir (Ismaili ve ark., 2016; Şahin ve Bilgin, 2012).

Ultrasonik Ekstraksiyon

UAE, bitki materyallerinden biyoaktif bileşiklerin verimli bir şekilde elde edilmesini sağlayan etkili bir yöntemdir. Ultrasonik dalgalar, hücre duvarlarını bozarak kavitasyon ve mekanik basınç oluşturur, bu da hedef bileşenlerin salınımını kolaylaştırır (Giacometti ve ark., 2018). Kavitasyon, malzeme içinde yoğun basınç ve sıcaklık gradyanları oluşturarak fiziksel yapısal bozulmalara yol açar ve bu durum kütle transferini hızlandırarak hücre içi maddelerin ekstraksiyon ortamına salınmasını destekler (Cifá ve ark., 2018).

UAE’de, ultrasonik banyo ve ultrasonik prob olmak üzere temelde iki tip cihaz kullanılır. Ultrasonik banyo, düşük maliyetli, ulaşılabilir ve aynı anda birden fazla numunenin işlenmesine olanak tanınması nedeniyle yaygın olarak tercih edilir. Ultrasonik prob sistemleri ise yoğun ultrasonik enerjiyi prob ucundan ileterek yüksek verimlilik sağlar (Martín-García ve ark., 2022). UAE, ekstraksiyon sürelerini kısaltma, çözücü tüketimini azaltma, aktif bileşiklerin geri kazanımını artırma (Irakli ve ark., 2018), orta düzeyde yatırım, düşük enerji maliyetleri gerektirme, sürdürülebilir bir alternatif olma (Siamandoura ve Tzia, 2023) ve geleneksel yöntemlere kıyasla iyileştirilmiş verimlilik sunma gibi avantajlara sahiptir (Jerman ve ark., 2010).

Cifá ve arkadaşları (2018), UAE ile ME yöntemlerini karşılaştırarak çözücü oranını, ekstraksiyon süresini ve sıcaklık parametrelerini değerlendirdiği çalışmalarında, %70 etanol, 120 dakika ve 70°C sıcaklık koşullarında UAE ile maksimum OLP verimini 39,2 mg/g olarak elde etmişlerdir. Buna karşılık ME, 1 saatlik ekstraksiyon süresiyle elde edilen en yüksek verim 27,8 mg/g olarak belirlenmiştir.

Giacometti ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında, ultrasonik prob kullanılarak zeytin yapraklarından OLP ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Çalışmada, zeytin yaprakları, 60°C’de %80’lik etanolde 15, 20 ve 25 katı-sıvı oranları değerlendirilmiştir. Box-Behnken Tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda, optimum koşullarda elde edilen OLP miktarının 13,386 mg/g olduğu gösterilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için optimum koşulların belirlenmesinde tek faktörlü deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde

etanol, metanol, aseton ve su olmak üzere dört farklı ekstraksiyon çözücüsü değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için organik çözücü konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı gibi üç bağımsız değişken incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre %50 aseton ile 60°C’de 10 dakika süreyle yapılan ekstraksiyonun OLP ekstraksiyonu için en iyi koşullar olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda, zeytin yaprağı ekstraktında %10,65 OLP ve 37,44 mg GAE/g TPC elde edilmiştir (Irakli ve ark., 2018).

Ismaili ve arkadaşları (2016), OLP ekstraksiyonunu maksimize etmeye çalıştığı bir araştırmada, yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak ultrasonik ve tuz destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini optimize etmiştir. Ana parametrelerin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı uygulanmış ve ultrasonik süre, pH, tuz konsantrasyonu ile organik çözücünün hacmi incelenmiştir. OLP’nin en yüksek ekstraksiyon verimi için optimum koşullar; 30 dakika ultrasonik süre, organik çözücü hacmi 2,5 ml, tuz konsantrasyonu %25 ve numune pH’ı 4 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, %13,45 OLP elde edilmiştir.

Shirzad ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında, zeytin yapraklarının fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesini belirlemek için UAE koşulları optimize edilmiştir. Ultrasonik sıcaklık (35–65°C), süre (5–15 dakika) ve etanol oranı (%25–75) gibi parametreler Box-Behnken tasarımı ile değerlendirilmiştir. Optimum koşullar %51 etanol, 65°C ve 15 dakika olarak belirlenmiş; bu koşullarda TPC 183,4 mg GAE/g ve DPPH radikal süpürme aktivitesi %78,98 olarak tespit edilmiştir.

Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

SFE, bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan çevre dostu bir tekniktir. Bu yöntemde, genellikle polar olmayan bileşiklere karşı güçlü bir afinitesi olan SFE-CO₂ kullanılır (Kyriakoudi ve ark., 2024). CO₂, düşük maliyetli, çevre dostu ve kolay erişilebilir bir çözücü olması nedeniyle SFE’de en sık tercih edilen sıvıdır (Khalil ve ark., 2023). SFE-CO₂, ek olarak geleneksel sıvı ekstraksiyonuna göre artan seçicilik, süratlilik ve çevresel güvenlik gibi özel avantajlar da sunmaktadır (Xynos ve ark., 2012). Bu ekstraksiyon yöntemi, bitkisel materyallerin farklı kısımlarından çeşitli fenolik bileşiklerin (fenolik asitler, karotenoidler, uçucu yağlar, flavonoidler vb.)

ekstraksiyonunda kullanılan yeşil ekstraksiyon yöntemi olarak kabul edilir (Khalil ve ark., 2023).

Kyriakoudi ve arkadaşlarının (2024) çalışmasında, SFE-CO₂ kullanarak farklı sıcaklıklar (35–90°C) ve yardımcı çözücü olmaksızın veya etanol, su ve etanol/su karışımları gibi yardımcı çözücülerin kullanımı durumunda OLP, hidroksitirozol, tirozol ve α -tokoferol miktarları üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Yardımcı çözücü olmaksızın ekstraksiyon gerçekleştirildiğinde örneklerde OLP tespit edilmezken, yardımcı çözücü olarak sadece su kullanıldığında araştırılan tüm bileşiklerin ekstraksiyon verimleri önemli ölçüde azalmıştır. En yüksek OLP ve hidroksitirozol miktarları, yardımcı çözücü olarak mutlak etanol kullanıldığında elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, en etkili ekstraksiyon koşullarının 90°C sıcaklık, 30 MPa basınç ve yardımcı çözücü olarak mutlak etanol kullanımıyla OLP miktarını 1.9 mg/g düzeyine ulaştırdığı belirlenmiştir.

Şahin ve arkadaşları (2011), OLP verimini karşılaştırmak amacıyla zeytin yapraklarını SE ve SFE-CO₂'nu incelemiştir. SFE-CO₂, basınç (100–300 bar), sıcaklık (50 ve 100°C) ve yardımcı çözücü türü (su, etanol, metanol) gibi değişkenlerin hem toplam ekstrakt miktarı hem de OLP verimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları, SE'de en yüksek OLP veriminin metanol kullanılarak (37.84 mg/g) elde edildiğini, SFE-CO₂ ise 300 bar, 100°C ve yardımcı çözücü olarak metanol kullanıldığında maksimum OLP miktarının (14.26 mg/g) sağlandığını göstermiştir.

Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

MAE, bitki hücresindeki nemin mikrodalga enerjisiyle ısıtılarak hücre duvarlarının zayıflatılıp yırtılmasını sağlar. Bu durum, biyoaktif bileşiklerin çevredeki çözücüye geçişini kolaylaştırarak ekstraksiyon verimini artırır (Siamandoura ve Tzia, 2023). Elektromanyetik dalgaların dipol rotasyonu oluşturması, bitki hücresel yapısının kırılmasına ve hedeflenen fenolik bileşiklerin salınmasına yardımcı olur. Geleneksel yöntemlere kıyasla MAE, daha kısa sürede yüksek verimli bir ekstraksiyon sunar (Di Meo ve ark., 2022). MAE, çözücü ve enerji gereksinimlerini azaltan çevre dostu bir ekstraksiyon yöntemidir. Daha az çözücü kullanımı, düşük ekstraksiyon maliyeti ve kısa ekstraksiyon süresi gibi avantajlara sahiptir (Siamandoura ve Tzia, 2023; Martiny ve ark.,

2022). Ayrıca, yüksek ekstraksiyon verimliliği ve hedef bileşenlerin minimum düzeyde bozunması, MAE'nin diğer öne çıkan özelliklerindendir (Taamalli ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada, MAE kullanılarak zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çözücü tipi ve bileşimi, mikrodalga sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi gibi değişkenler analiz edilmiştir. Optimum koşullar, ekstraksiyon çözücüsü olarak %80 metanol kullanımıyla, 80°C sıcaklıkta ve 6 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. OLP ve izomerleri MAE ile %12,51'lik bir verim göstermiştir (Taamalli ve ark., 2012).

Di Meo ve arkadaşları (2022), OLP miktarının değişimini mart, haziran ve kasım aylarında incelemişlerdir. Çalışmada, su, metanol ve etanol olmak üzere üç farklı çözücü, kullanılmıştır. MAE, 300 Watt güçte 2 dakikalık bir ekstraksiyon süresi uygulanmış ve mart ayında hasat edilen yapraklardan %80 metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarda OLP içeriğinin 72,08 mg/g seviyesine ulaştığı bildirilmiştir.

2.11. Oleuropein Saflaştırma Teknikleri

OLP'nin zeytin yapraklarından saflaştırılması hem bilimsel araştırmalar hem de ticari uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak bu süreç genellikle karmaşık adımları içerir ve kullanılan yöntemin verimliliği, maliyeti, çevresel etkisi ve uygulanabilirliği ile yakından ilişkilidir. Ayrıca zeytin yapraklarından OLP'nin saflaştırılması konusunda giderek artan bir ilgi vardır, çünkü doğal aktif bileşikler, insan sağlığı açısından sentetik kimyasallara göre daha güvenilir kabul edilmektedir (Khemakhem ve ark., 2017).

OLP'nin saflaştırılmasında kullanılan yöntemler arasında silika jel kolon kromatografisi, (Zun-Qiu ve ark., 2015; Andreadou ve ark., 2006), mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon gibi farklı membran tabanlı ayırma teknikler (Khemakhem ve ark., 2017) ve makro gözenekli reçineler (Li ve ark., 2011; Liu ve ark. 2020) göze çarpmaktadır. Genellikle OLP içeren ekstraktların saflaştırılmasında kolon kromatografisi kullanılmaktadır. Bu yöntem, iki fazın (katı ve sıvı) adsorpsiyon kapasitesi ve çözünürlüğüne dayanarak ayrılmasını sağlar. İşlem sırasında, çözünen maddeler iki faz arasında dinamik bir denge oluşturur ve hedef bileşik, uygun çözücü karışımlarıyla sabit

fazdan elüe edilir. Kolon kromatografisi, basit, etkili ve maliyet açısından uygun bir yöntemdir (Otero ve ark., 2020).

Zun-Qiu ve arkadaşları (2015), zeytin yapraklarından saf OLP elde etmek için metanol ve etil asetat (1:13, v/v) karışımını elüent olarak kullanarak silika jel üzerinde kolon kromatografisi uygulamışlardır. Bu çalışmada, %96.54 saflık ve %78.49 saflaştırma verimi ile %13.52 OLP elde edilmiştir.

Khemakhem ve arkadaşları (2017), OLP'nin saflaştırılması için mikro, ultra ve nanofiltrasyon gibi farklı teknolojilerin kombinasyonunu incelemiştir. Yazarlar, OLP içeriğini 10 kat yoğunlaştırarak 100g'da 1685 mg OLP içeren bir ekstrakt elde etmişlerdir.

Li ve arkadaşları (2011), sekiz makro gözenekli reçinenin performansını ve ayrılabilirliğini değerlendirdikleri bir çalışmada, LSA-21 reçinesi kullanarak zeytin ağacı yapraklarından OLP'yi seçici olarak saflaştırmışlardır. Bu çalışmada, LSA-21 reçinesi daha iyi adsorpsiyon özelliği göstermiş olup, nihai saflaştırılmış ürünlerde OLP içeriği 120 g/kg'dan 902 g/kg'a artmış ve geri kazanım verimi %85.6 olarak bulunmuştur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada kullanılan aynı çevresel ve tarımsal koşullar altında yetiştirilen ve ülkemizde yaygın yetiştiriciliği yapılan 35 farklı zeytin çeşidine ait yapraklar T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (İzmir/Türkiye) arazilerinden, Ocak ve Temmuz 2023'te toplanmıştır. Ayrıca zeytin ağacının farklı bölgelerindeki OLP düzeylerini değerlendirmek amacıyla dört farklı zeytin çeşidinde, ağaçların apikal (uç), orta ve bazal (dip) pozisyonlarından yaprak örnekleri alınmıştır. Toplama sırasında ağaçların benzer bölgelerinden örnek alınmasına dikkat edilmiştir. Toplanan zeytin yaprakları, polipropilen torbalar içerisinde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

Zeytin yaprakları, 40°C'de etüvde 96 saat kurutulmuş ve böylelikle nem içeriği %5'in altına düşmesi sağlanmış ve ardından laboratuvar tipi öğütücü kullanılarak öğütülmüştür. Hazırlanan numuneler, santrifüj tüpleri içinde laboratuvarında analizler yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan zeytin yaprağı çeşitleri Tablo 3.1.'de ve materyallerin toplandığı deneme arazisi görseli Şekil 3.1.'de sunulmaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Zeytin Yaprağı Çeşitleri

1. Halhalı Çelebi	13. Samsun Tuzlamalık	25. Mavi
2. Eğriburun (Tatayn)	14. Melkabazı	26. Girit
3. Erkence	15. Samanlı	27. Kilis Yağlık
4. Hamza Çelebi	16. Butko	28. Tavşan Yüreği
5. İzmir Sofralık	17. Hurma Karaca	29. Çekişti
6. Yuvarlak Halhalı	18. Çelebi (İznik)	30. Uslu
7. Sarı Ulak	19. Büyük Topak Ulak	31. Nizip Yağlık
8. Erdek Yağlık	20. Hurma Kaba	32. Gemlik
9. Aşı Yeli	21. Edincik	33. Ayvalık Yağlık
10. Saurani	22. Küçük Topak Ulak	34. Domat
11. Kan Çelebi	23. Kiraz	35. Memecik
12. Çakır	24. Çilli	



Şekil 3.1. Zeytin Yapraklarının Toplandığı T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Arazisi

Deneme arazisinden toplanan zeytin yaprağı örneklerine uygulanan numune hazırlık çalışmalarına ait bir görsel Şekil 3.2’de sunulmaktadır.



Şekil 3.2. Zeytin Yaprağı Örneklerine Uygulanan Numune Hazırlama İşlemleri

3.2. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışma kapsamında yapılan analizlerde kullanılan cihazlara ilişkin marka ve menşei bilgileri Tablo 3.2’de sunulmuştur. Cihazlar; kromatografik ölçümler, enzimatik testler, spektral analizler ve ekstraksiyon işlemleri için laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
UV-Vis Spektrofotometre	Agilent, Cary 60, Boblingen, Almanya
UPLC Analiz Cihazı	Thermo Fisher Scientific, Dionex UltiMate 3000, Germering, Almanya
Saf Su Cihazı	MES, MP Minipure BASIC M UP, Ankara, Türkiye
Laboratuvar Tipi Mekanik Öğütücü	IKA, MF 10 Basic, Staufen, Almanya
pH Metre	Ohaus, Starter 3100M, Parsippany, NJ, ABD
Ultrasonik Banyo	ISOLAB, 621.06.003, Eschau, Almanya
Döner Buharlaştırma Sistemi	Heidolph, Laborota 4000 Efficient, Schwabach, Almanya
Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyon Cihazı	Superex, F500 CO ₂ Ekstraktör, Konya, Türkiye
Manyetik Karıştırıcı	MTOPS, MS300HS, Seul, Güney Kore
Santrifüj Cihazı	Hettich, Rotofix 32 A, Tuttlingen, Almanya
Vorteks	ISOLAB, Vortex Mixer – Advanced, Eschau, Almanya
Etüv	Memmert, INE 500, Schwabach, Almanya
Mikroplaka Cihazı	Fisher Scientific, AccuSkan GO, Waltham, ABD
Renk Ölçüm Cihazı	Konica Minolta, Chroma Meter CR-400, Osaka, Japonya
Hassas Terazî	Ohaus, Pioneer PX224/E, Nänikon, İsviçre
Su Banyosu	Mikrotest, DT107, Ankara, Türkiye

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerde kullanılan kimyasallar en az analitik saflıkta olacak şekilde temin edilmiştir. Kullanılan sarf malzemeler deneysel aşamalarda gerekli kalite standartlarını sağlayacak şekilde seçilmiştir. Tablo 3.3'te kullanılan kimyasallar ve sarf malzemelere ait bilgiler sunulmuştur.

Tablo 3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar Ve Sarf Malzemeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma
Oleuropein (%98)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Folin–Ciocalteu Reaktifi	Merck Darmstadt, Almanya
Gallik Asit	Merck Darmstadt, Almanya
Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit, $\geq$ %97)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
2,2-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS $\geq$ %99)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Sodyum Karbonat	ISOLAB, Wertheim, Almanya
α -Glukosidaz (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , G0660)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
α -Amilaz (Domuz Pankreas Tip VI-B, A3176)	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Etanol	Carlo-Erba, Milano, İtalya
Metanol	Carlo-Erba, Milano, İtalya
Asetonitril	Carlo-Erba, Milano, İtalya
Etil Asetat	Carlo-Erba, Milano, İtalya
Asetik Asit	Carlo-Erba, Milano, İtalya
Silika Jel	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Sodyum Fosfat Monobazik	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Potasyum Dihidrojen Fosfat	ISOLAB, Wertheim, Almanya
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Karbondioksit	Habaş, Antalya, Türkiye
Akarboz	BLD Pharmatech, Shanghai, Çin
Behrerler	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Cam Şişeler	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Mezür	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Nitril Eldiven	Beybi, İstanbul, Türkiye
Santrifüj Tüpleri	ISOLAB, Wertheim, Almanya
HPLC Vial	Sigma, St. Louis, Missouri, ABD
Mikropipetler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD

3.3. Nem Analizi

Numunelerin nem içeriği gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Öncelikle 50 g örnek tartılmış ve 40°C etüvde 96 saat ön kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Ön kurutma sonrasında, örneklerin 1 g cam bir tüpte tartılarak 105°C'ye ayarlanmış etüve yerleştirilmiştir. Üç saat sonunda kurutma kapları çıkarılarak tartım yapılmış ve numuneler sabit ağırlığa ulaşana kadar her saat başı yeniden tartılarak kontrol edilmiştir. Her numunenin nem içeriği, ilk ve son ağırlıklar arasındaki farka göre hesaplanmıştır. Bu analitik prosedür ile nem içeriğinin ölçülmesini sağlamıştır (Lama-Muñoz ve ark., 2019).

3.4. Renk Analizi

Numunelere ait renk ölçümleri, renk ölçüm cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Renk analizinde, CIE Lab^* renk sistemine dayalı olarak ölçüm yapılmıştır. Bu sistemde; L^* değeri, 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değişen parlaklığı, a^* değeri, pozitif değerlerle kırmızılığı, negatif değerlerle yeşilliği, b^* değeri ise, pozitif değerlerle sarılığı, negatif değerlerle maviliği ifade etmektedir. Her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır.

3.5. Ekstraksiyon Prosedürü

3.5.1. Süperkritik Akışkan CO₂ Ekstraksiyonu

Numunelerdeki OLP bileşiğinin ekstraksiyonu, Şahin ve arkadaşları (2011) tarafından bildirilen SFE-CO₂ yönteminde bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre, hazırlanan materyaller 50 g tartılarak SFE-CO₂ cihazının reaktörüne yerleştirilmiştir. Yardımcı çözücü olarak etanol ya da yardımcı çözücü olmaksızın 2 saatlik ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda laboratuvarında ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği SFE-CO₂ sistemi Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Çalışmalarda Kullanılan Süperkritik Akışkan CO₂ Ekstraksiyonu Sistemi

3.5.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

UAE işlemi, frekans 35 kHz ve güç değeri 120 W olarak ayarlanmış bir ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir. Tüm deneylerde, 1 g kurutulmuş öğütülmüş zeytin yaprağı 20 ml çözücüyle birleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında örnekler filtre kağıdı kullanılarak süzölmüş, süzülen materyal 0,22 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiş ve analize yapılana kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.5.3. Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

UAE optimizasyon çalışmalarında, yaz mevsiminde toplanmış Hamza Çelebi çeşidine ait zeytin yaprakları kullanılmıştır. Zeytin yapraklarından OLP ekstraksiyonu için optimum koşulların belirlenmesinde RSM’den yararlanılmıştır. Ekstraksiyon koşullarını optimize etmek amacıyla etanol konsantrasyonu (X_1 , %60-80), ekstraksiyon sıcaklığı (X_2 , 30-60°C) ve ekstraksiyon süresi (X_3 , 10-30 dk) olmak üzere üç bağımsız değişken OLP verimi açısından değerlendirilmiştir.

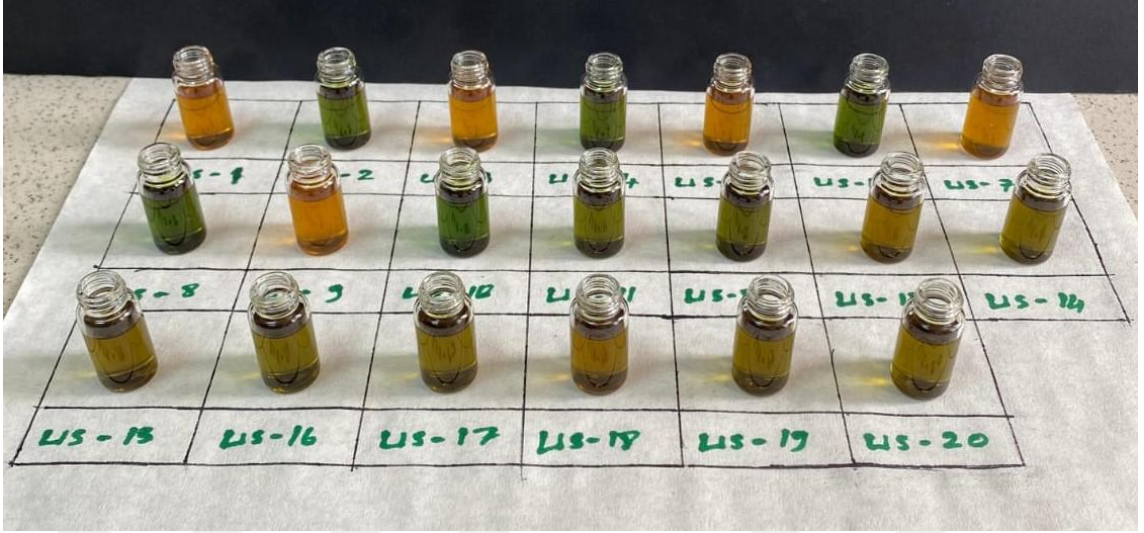
Deneyisel tasarımda Merkezi Bileşik Tasarım uygulanmış olup, her bir parametre üç deneysel seviyede test edilmiştir. Değişkenler -1, 0 ve +1 olarak kodlanmış ve toplamda 20 deney, rastgele bir sıralama ile gerçekleştirilmiştir.

Tam faktöriyel tasarıma sahip sekiz nokta, altı yıldız noktası ve deneysel hatayı tahmin etmek amacıyla altı merkez noktası belirlenmiştir. Modellerin yeterliliğini doğrulamak için RSM ile öngörülen optimum koşula göre ek deneyler yapılmış ve elde edilen veriler, model tarafından öngörülen değerle karşılaştırılmıştır. Tablo 3.4'te UAE çalışmalarına ait RSM çalışma tasarımı sunulmuştur.

Tablo 3.4. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Yüzey Yanıt Metodu Tasarımı

Deney Sırası	Bağımsız Değişkenler			
	X_I (%)	X_2 (°C)	X_3 (dk)	
1	70 (0)	70 (+1,682)	20 (0)	
2	80 (1)	30 (-1)	10 (-1)	
3	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
4	87 (+1,682)	45 (0)	20 (0)	
5	60 (-1)	30 (-1)	30 (1)	
6	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
7	80 (1)	60 (1)	30 (1)	
8	70 (0)	45 (0)	37 (+1,682)	
9	60 (-1)	60 (1)	30 (1)	
10	70 (0)	20 (-1,682)	20 (0)	
11	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
12	53 (-1,682)	45 (0)	20 (0)	
13	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
14	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
15	60 (-1)	60 (1)	10 (-1)	
16	80 (1)	30 (-1)	30 (1)	
17	70 (0)	45 (0)	20 (0)	
18	80 (1)	60 (1)	10 (-1)	
19	60 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	
20	70 (0)	45 (0)	3 (-1,682)	
Semboller		Kodlanmış Seviyeler		
Değişkenler		-1	0	1
Etanol Konsantrasyonu	X_I	60	70	80
Ultrasonik Sıcaklık	X_2	30	45	60
Ultrasonik Süre	X_3	10	20	30

Şekil 3.4'te görüldüğü üzere farklı etanol konsantrasyonu, sıcaklık ve süre parametreleri altında gerçekleştirilen 20 farklı ultrasonik ekstraksiyon denemesine ait ekstraktlar görsel olarak sunulmuştur. "US-1"den "US-20"ye kadar numaralandırılmış örnekler, RSM çalışma tasarımına karşılık gelmektedir. Örneklerin renk farklılıkları, ekstraktlardaki fenolik bileşik derişimlerinin ve çözücü etkileşiminin görsel bir göstergesi niteliğindedir.



Şekil 3.4. Yüzey Yanıt Metodu ile Gerçekleştirilen Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Denemelerine Ait Ekstraktların Görünümü

3.6. Oleuropein Miktar Tayini

OLP içeren tüm çözeltiler, düşük basınçlı gradyan pompa (LPG-3400SD) ve diyot dizisi dedektör (DAD-3000RS) içeren bir Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Veri sinyalleri, Chromeleon 7.0 yazılımı aracılığıyla bilgisayarda işlenmiştir. Ayırma işlemi, C18 Brisa LC2 kolon (250 mm × 4.6 mm, 5 µm partikül boyutu) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir standart çözelti ve zeytin yaprağı ekstraktı, üçer tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir.

Kromatografik koşullar Martínez-Navarro ve arkadaşları (2021) tarafından önerilen yöntemde değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir. OLP analizi için kullanılan koşullar: kolon sıcaklığı, 30°C; enjeksiyon hacmi, 20 µl; akış hızı, 1,5 ml/dk'dır. Mobil faz, iki çözücünden oluşmaktadır: (A) suda %1 asetik asit ve (B) asetonitril. Uygulanan gradyan programı 0. dakika, %5 B; 10. dakika, %20 B; 15. dakika, %30 B; 20. dakika, %30 B; 22. dakika, %100 B; 26. dakika, %100 B; 28. dakika, %5 B olacak şekilde tasarlanmıştır.

Analiz süresi toplamda 35 dakikadır. Kromatogramlar 200 nm ile 600 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiş ve OLP sinyalleri 280 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. OLP analizi için UPLC cihazına ait analitik koşullar Tablo 3.5’te sunulmaktadır.

Tablo 3.5. Oleuropein Analizi İçin UPLC Analitik Koşulları

Kolon	C18 (Brisa LC2 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm))
Kolon Sıcaklığı	30°C
Akış oranı	1,5 ml/dk
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Dalga boyu	280
Mobil faz	(A) Suda %1 asetik asit (B) Asetonitril

3.7. Geçerli Kılma (Validasyon) Parametreleri

Zeytin yaprağındaki OLP bileşiğinin belirlenmesi için UPLC yöntemi doğrusalılık, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), kesinlik, doğruluk ve spesifiklik açısından değerlendirilmiştir. Tüm validasyon çalışmaları, International Council for Harmonisation (ICH) tarafından yayımlanan “Q2(R1)-Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodoloji” başlıklı teknik kılavuzda belirtilen yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir (ICH, 2005). Her çalışma gününün başlangıcında, sistem uygunluğu, OLP’nin 50 ppm analitik standart çözeltisi kullanılarak kromatografik prosedürün çıkış zamanı ve sinyal hassasiyeti açısından performansını değerlendirmek için kullanılmıştır.

3.7.1. Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir konsantrasyon aralığında analit miktarı ile ölçülen sinyal arasındaki doğrusal ilişkinin geçerliliğini değerlendirmek için uygulanır. Bu değerlendirme genellikle en az beş farklı konsantrasyon düzeyinde olmalıdır. Bu çalışmada doğrusal ilişkiyi test etmek için 7 (3,125-6,25-12,5-25-50-100-200 ppm) farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için üçer tekrar yapılmış ve metanolde çözülmüş OLP standart çözeltileri UPLC cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar UPLC cihazına ait Chromeleon 7.0 yazılımı ile değerlendirilmiştir.

Doğrusallık için elde edilen veriler doğrusal regresyon ile analiz edilmiştir, korelasyon katsayısı (R^2), y-kesişim noktası, regresyon doğrusunun eğimi (slope) ve artık kareler toplamı hesaplanmıştır. Ayrıca, doğrusallık görsel olarak da ortaya konulmuştur.

3.7.2. Tespit limiti

LOD, bilinen analit konsantrasyonlarına sahip örneklerin analizi yoluyla ve analitin güvenilir şekilde saptanabildiği en düşük düzeyin belirlenmesiyle tespit edilir. Bu çalışmada LOD, yanıtların standart sapmasının 3 katı olarak hesaplanmıştır.

3.7.3. Tayin limiti

LOQ, bir analitik yöntemin güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde nicel ölçüm yapabileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder. Bu çalışmada LOQ, yanıtların standart sapmasının 10 katı olarak hesaplanmıştır.

3.7.4. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik (repeatability), ara kesinlik (intermediate precision) ve gerektiğinde tekrarlanabilirlik (reproducibility) başlıkları altında değerlendirilmelidir. Bu çalışmada, kesinlik değerlendirmesi kapsamında tekrarlanabilirlik (repeatability) ve ara kesinlik (intermediate precision) değerleri belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik için test konsantrasyonunun %100'üne karşılık gelen düzeyde aynı gün içerisinde, aynı cihaz ve analist ile yapılan bağımsız ölçümle değerlendirilmiş; ara kesinlik ise farklı bir gün içerisinde, aynı cihaz ve analist ile yapılan bağımsız ölçümle değerlendirilmiştir. Kesinlik bağıl standart sapma (RSD) olarak Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır.

Eşitlik (1):
$$RSD (\%) = (SD/\bar{x}) \times 100$$

SD: Standart sapma

$\bar{x}$: Ölçüm değerlerinin ortalaması

RSD: Bağıl standart sapma

3.7.5. Doğruluk

Doğruluk parametresi için %50, %100 ve %200 test konsantrasyonlarını temsil eden üç düzeyde deneyler yapılmıştır. Her düzeyde üçlü tekrar analiz yapılmış, elde edilen pik alanları kalibrasyon eğrisi yardımıyla konsantrasyonlara çevrilmiş ve ölçülen

konsantrasyonlar ile eklenen konsantrasyonlar karşılaştırılarak geri kazanım yüzdesi hesaplanmıştır. Geri kazanım Eşitlik 2'ye göre hesaplanmıştır.

Eşitlik (2): Geri Kazanım (%) = (Ölçülen Konsantrasyon/ Eklenen Konsantrasyon) ×100

3.7.6. Spesifiklik

Yöntemin spesifikliği, OLP standardı, zeytin yaprağı ekstraktı ve bu ekstrakta OLP analitik standardı eklenmiş örnekler üzerinde yapılan UPLC analizleriyle değerlendirilmiştir.

3.8. Toplam Fenolik Madde Analizi

Zeytin yaprağı ekstraktlarındaki fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir. Her ekstraktın 200 µL'si, 800 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş) ile 2 dakika boyunca reaksiyona sokulmuştur. Daha sonra 2 ml sodyum karbonat (%7,5) ilave edilip hacim, distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş ve köre karşı absorbans spektrofotometre ile 765 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, kurutulmuş numunenin gramı başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak ifade edilmiştir (Irakli ve ark., 2018).

3.9. Oleuropein Saflaştırılma İşlemleri

3.9.1. Başlangıç Materyalinin Hazırlanması

Hamza Çelebi çeşidine ait, yaz mevsiminde toplanmış, kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarından 20 g alınarak, etanol-su karışımı ile 1:20 (a/h) oranında bir ultrasonik banyo kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, daha önce RSM ile optimize edilen ultrasonik ekstraksiyon parametrelerine uygun olarak yapılmıştır.

Elde edilen ekstrakt, Büchner hunisi yardımıyla süzölmüş ve sıvı faz, 60°C sıcaklık ve 300 mbar basınç altında döner buharlaştırıcı kullanılarak konsantre edilmiştir. Konsantre edilen bu ekstrakt, saflaştırma işlemleri için başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

3.9.2. Lipofilik Bileşenlerin Uzaklaştırılması

Başlangıç materyalindeki lipofilik bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla konsantre ekstrakt tam çözünme sağlanana kadar 50 ml etanol karıştırılmıştır. Karışım iki gün

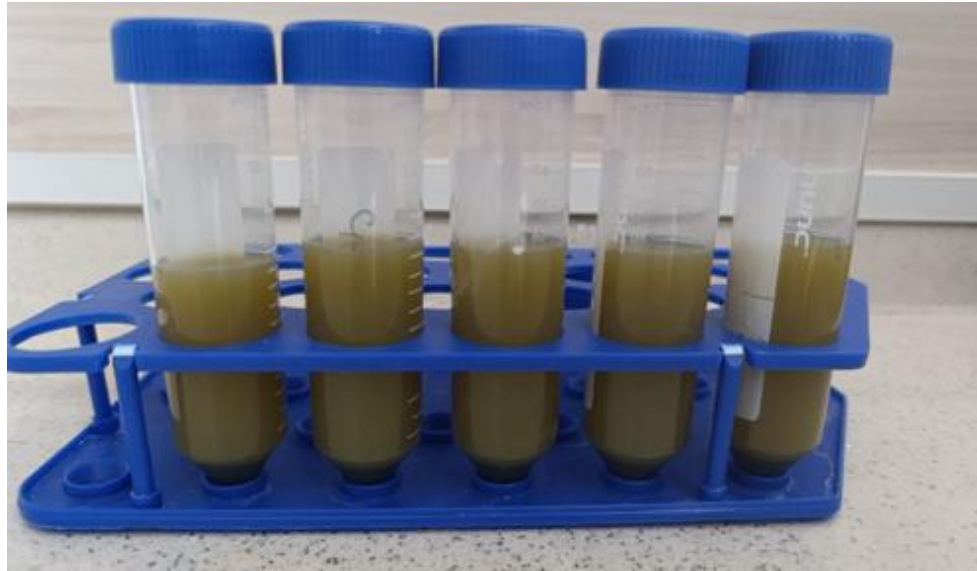
boyunca -20°C'de bekletilmiş, ardından soğuk etanol ile yıkanmış ve bir Büchner hunisi kullanılarak filtrelenmiştir. Bu adım, lipit bazlı bileşikleri etkili bir şekilde giderilmesini sağlamak için beş kez tekrarlanmıştır. Elde edilen materyal, etanolün uzaklaştırılması amacıyla döner buharlaştırıcı kullanılarak (50°C, 350 mbar) tekrar konsantre edilmiştir. Lipofilik bileşenlerin uzaklaştırılması işlemine ait bir görsel Şekil 3.5'te gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Başlangıç Materyalinden Lipofilik Bileşenlerin Uzaklaştırılmasına Ait Bir Görsel

3.9.3. Su ile Ekstraksiyon

Konsantre ekstrakt, homojen bir sulu ekstrakt elde etmek amacıyla 150 ml saf suda çözülmüştür. Şekil 3.6'da gösterildiği üzere sulu çözelti santrifüj tüplerine aktarılmış ve 10 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, üst fazlar birleştirilmiş ve 45 µm filtre kağıdı kullanılarak Büchner hunisi ile süzümüştür. Böylece klorofil içeriği büyük ölçüde uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Zeytin Yapağı Ekstraktının Klorofilden Arındırılması İşlemi

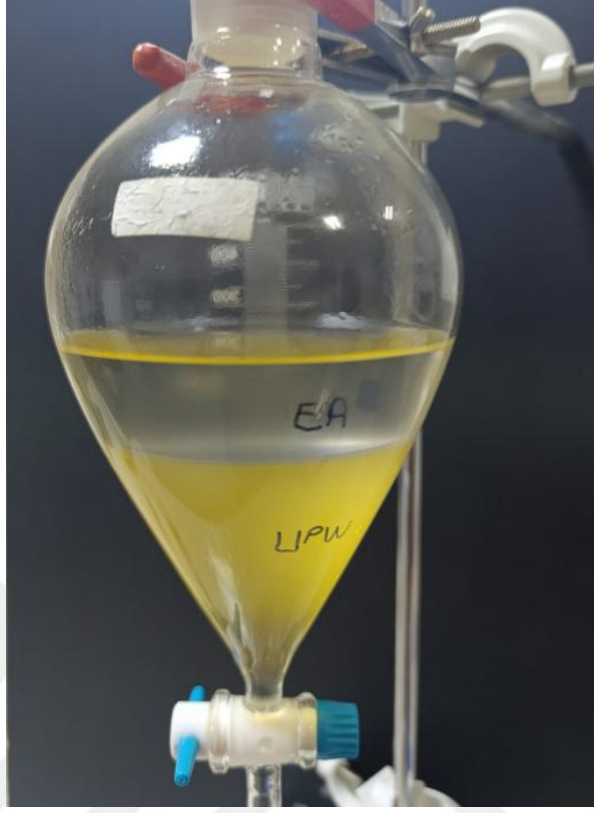
Süzülen ekstrakt, -20°C’de bir gece dondurulduktan sonra, 0,22 µm filtre kağıdı ile yeniden süzölmüştür. Bu filtrasyon işleminden sonra elde edilen ekstrakta ait görsel, Şekil 3.7’de sunulmaktadır. Sonuçta elde edilen turuncu renkli ekstrakt, toplam hacmi 300 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmış ve sıvı-sıvı ekstraksiyon için hazır hâle getirilmiştir.



Şekil 3.7. Filtrasyon Sonrası Elde Edilen Sulu Ekstraktın Görünümü

3.9.4. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sulu ekstrakt bir ayırma hunisinde etil asetat ile (1:1, v/v) ekstrakte edilmiştir. Bu işlem beş kez tekrarlanmış ve her aşamada elde edilen etil asetat fazları birleştirilmiştir. Etil asetat döner buharlaştırıcı (50°C, 350 mbar) kullanılarak uçurulmuştur. Bu işlem sonucunda, OLP açısından zenginleştirilmiş bir ekstrakt elde edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonuna ait bir görsel Şekil 3.8’de sunulmaktadır.

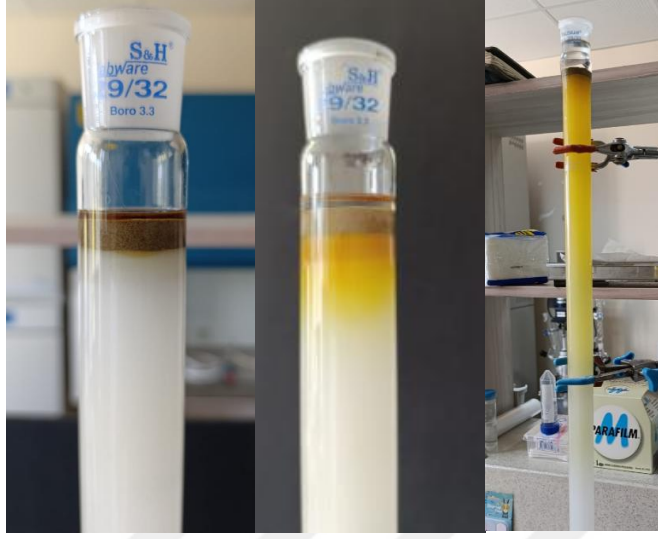


Şekil 3.8. Zeytin Yapağı Ekstraktına Uygulanan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon İşlemi

3.9.5. Kolon Kromatografisi

OLP açısından zenginleştirilmiş ekstrakt, daha yüksek saflıkta OLP elde etmek amacıyla 30 mm çapında ve 600 mm uzunluğunda, silika dolgu maddesi ile doldurulmuş bir kromatografi kolonuna yüklenmiştir. Kolon, önceden etil asetat ile şartlandırılmıştır. Ekstrakt metanolde çözülerek kolona dikkatlice yüklenmiş ve ardından 13:1 oranında etil asetat:metanol karışımı kullanılarak kolonda yürütülmüştür (Zun-Qiu ve ark., 2015).

Kolondan elde edilen fraksiyonlar ayrı ayrı toplanmış ve her biri UPLC ile analiz edilmiştir. UPLC sonuçlarına göre, yüksek oranda OLP içeren fraksiyonlar birleştirilerek çözücüler uzaklaştırılmıştır. Kalan materyalin bir kısmı saflık analizleri için bir kısmı ise *in vitro* deneylerde kullanılmıştır. Kolon kromatografisine ait bir görsel Şekil 3.9'da gösterilmektedir.



Şekil 3.9. Oleuropeinin Saflaştırılmasında Kullanılan Kolon Kromatografisi İşlemi

3.10. Antioksidan Analizler

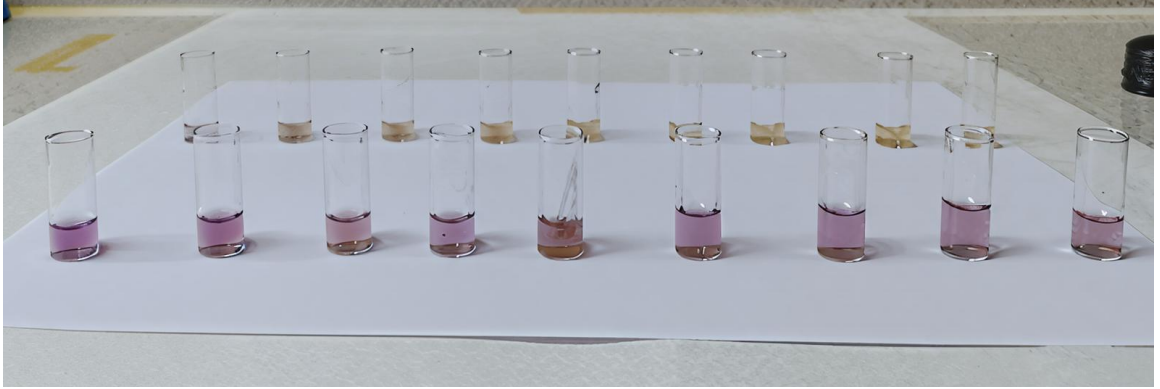
3.10.1. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi Analizi (ABTS^{•+})

Saflaştırılan materyal ve zeytin yaprağı ekstraktının katyon radikali giderme aktiviteleri, Re ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 7 mM ABTS ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltileri hazırlanmıştır. ABTS^{•+} stok çözeltisini elde etmek amacıyla, bu iki çözelti eşit hacim oranında (1:1) karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında, ışık geçirmeyen koşullarda 16 saat bekletilerek radikal oluşumu sağlanmıştır. Analizlerde kullanılacak ABTS^{•+} çalışma çözeltisi, stok çözeltiden 1 ml alınarak %96'lık etanol ile seyreltilmiş ve 734 nm dalga boyunda $0,70 \pm 0,02$ absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır. Her bir örnekten 40 µL alınarak 4 ml ABTS^{•+} çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 6 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda absorbans ölçümleri 734 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Örneklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenebilmesi amacıyla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış troloks standart çözeltileri (50, 100, 150, 200, 250, ve 300 ppm) kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen absorbans verileri bu eğri doğrultusunda değerlendirilmiş ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri/g ekstrakt (mg TE/g) olarak ifade edilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. Serbest radikali giderme aktivitesi (DPPH•)

Çalışmada saflaştırılan materyal ve zeytin yaprağı ekstraktının serbest radikal giderme aktiviteleri, Blasi ve arkadaşları (2016) tarafından bildirilen yönteme dayalı gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 0,06 mM derişiminde DPPH   zeltisi metanol içerisinde hazırlanmış ve 517 nm dalga boyundaki absorbans  ,70 ± 0,05 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan   zelti, ışık geçirmeyen koşullarda 4 C’de 1 saat bekletilerek stabilizasyonu sağlanmıştır. Her bir örnekten 100  L alınarak 3,90 mL DPPH   zeltisi ile karıştırılmış ve karışım vortekslenerek homojen hale getirilmiştir (şekil 3.10). Elde edilen karışımlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Serbest radikal giderme aktiviteleri 517 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre ile ölçülmüştür.



şekil 3.10. Zeytin Yapradı Ekstraktı ve Saflaştırılan Materyalin DPPH Yöntemiyle Antioksidan Aktivite Değerlendirilmesi

 rnekerin antioksidan kapasitelerinin belirlenebilmesi amacıyla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan troloks standart çözeltileri (50, 100, 150, 200, 250, ve 300 ppm) kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri bu eğriye göre değerlendirilmiş ve sonuçlar mg Troloks eşdeğeri/g ekstrakt (mg TE/g) cinsinden ifade edilmiştir. Tüm analizler üç paralel  l  m ile gerçekleştirilmiştir.

3.11. Oleuropeinin Antidiyabetik Etkisinin Belirlenmesi

3.11.1.  -Glukosidaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi

Zeytin yaprağından elde edilen ekstrakt, saflaştırılan materyal ve OLP analitik standardının  -glukosidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi, p-nitrofenil- -D-

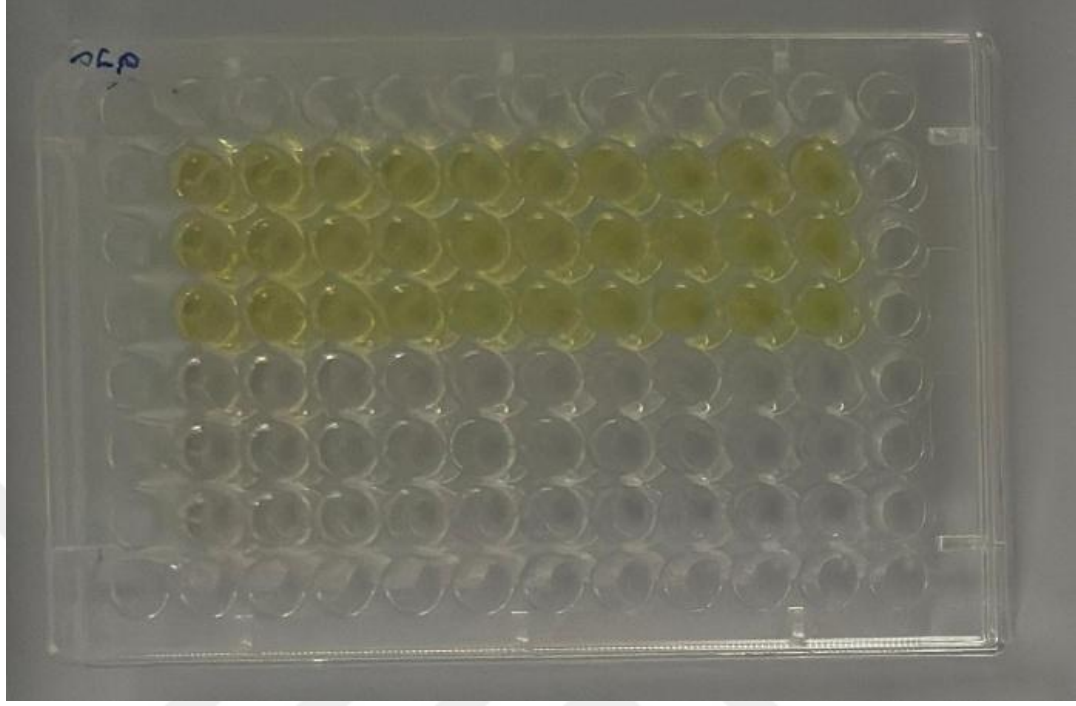
glukopiranozit (pNPG) substratı kullanılarak spektrofotometrik yöntemle değerlendirilmiştir. Uygulanan yöntem, Dong ve arkadaşları (2012) tarafından bildirilen protokol temel alınarak optimize edilmiştir.

α -Glukosidaz enzim inhibisyonu deneylerinde iki farklı tampon çözelti kullanılmıştır:

- Tampon I: %1 DMSO içeren 0,1 M pH 6,8 sodyum fosfat tamponu
- Tampon II: DMSO içermeyen 0,1 M pH 6,8 sodyum fosfat tamponu

Çalışmada üç farklı test örneği (ekstrakt, saflaştırılan materyal ve OLP analitik standardı) ile pozitif kontrol olarak akarboz test edilmiştir. Tüm test örnekleri ve akarboz çözeltileri Tampon I içerisinde hazırlanırken, pNPG substratı ve α -glukosidaz enzimi Tampon II içerisinde çözülmüştür.

Deneyisel uygulamada, test örnekleri 250, 500, 1000 ve 2000 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Her bir reaksiyon tüpüne, 60 μ L test örneği ile birlikte 50 μ L 0,2 U/ml α -glukosidaz enzimi ilave edilerek reaksiyon karışımları oluşturulmuştur. Karışımlar 37°C’de 10 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından, her bir tüpe 50 μ L pNPG substratı eklenmiş ve reaksiyonun devamı için karışım 37°C’de 20 dakika daha inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda reaksiyonlar, 405 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile absorbans değerleri ölçülmüştür. α -Glukosidaz inhibisyon deneylerine ait bir görsel Şekil 3.11’de sunulmuştur.



Şekil 3.11. α -Glukosidaz İnhibisyon Testi Ön Denemelerine Ait Bir Görsel

Ölçümlerde elde edilen ham absorbans (HA) verileri, Lankatillake ve arkadaşları (2021) çalışmasında önerilen yöntemle göre çok katmanlı blank düzeltmesi yapılarak analiz edilmiştir. Bütün blanklar üç tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır.

Deneyin doğruluğunu ve ölçümlerin spesifikliğini sağlamak amacıyla blank grupları hazırlanmıştır:

- Tampon Blankı (TB): Sadece Tampon I içeren, sistemin bazal absorbans düzeyini belirlemeye yönelik olarak hazırlanmıştır.
- Substrat Blankı (SB): Yalnızca pNPG ve tampon içeren; substratın kendi optik sinyalini ölçmek için kullanılmıştır.
- Örnek Blankı (ÖB): Her test örneği ve her bir konsantrasyon düzeyi için, yalnızca test örneği ve tampon içeren; enzim ve substrat ilave edilmeksizin hazırlanan kuyulardır. Bu blankın amacı, örneklerin kendisinden kaynaklanabilecek renk, bulanıklık veya matris etkisi gibi optik girişimlerin ortadan kaldırılmasıdır.

Her test örneği ve akarboz, dört farklı konsantrasyonda, üçer tekrar olacak şekilde test edilmiştir. Aynı konsantrasyonlar için yine üçer tekrar olacak şekilde ÖB hazırlanmıştır. Böylece her test örneği için toplam 24 kuyu kullanılmıştır. Mikroplaka üzerinde sadece merkez kuyuları kullanılmış, kenar kuyuları sıcaklık farkı ve buharlaşma gibi kenar etkileri nedeniyle boş bırakılmıştır.

Negatif kontrol, enzim ve substrat içeren ancak inhibitör içermeyen reaksiyon karışımlarından oluşturulmuştur ve enzimin maksimum aktivitesini temsil etmiştir. Bu grubun verilerine de aynı blank düzeltme protokolü uygulanmıştır. Deneye ait mikroplaka yerleşimi, Şekil 3.12’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tüm absorbans verileri, örneklerin kendi blank değerleri ile düzeltilmiş; ayrıca substrat ve tampon kaynaklı sinyal katkıları da dikkate alınarak net absorbans (NA) değerleri Eşitlik 3’e göre hesaplanmıştır.

Eşitlik (3):
$$NA = HA - [(SB - TB) + ÖB]$$

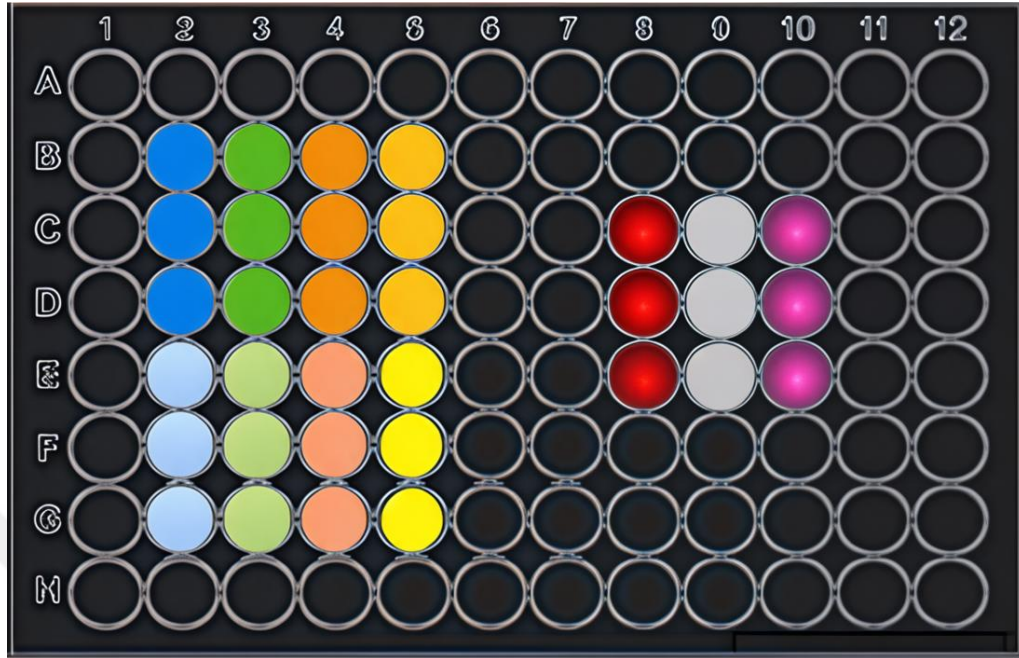
Bu eşitlikte, substratın net optik katkısı $[(SB - TB)]$ ve örneğe ait katkı (ÖB), HA değerinden çıkarılarak yalnızca inhibitöre özgü absorbans değeri elde edilmiştir. Blank düzeltmeleri yapılmadan yalnızca HA değerleri ile yorum yapılması durumunda; yüksek arka plan sinyali, örnek matris etkisi ve girişimlerden kaynaklanan istatistiksel hatalar ve anlamsız varyanslar oluşabileceği için tüm analizler yalnızca düzeltilmiş net verilere dayandırılmıştır.

Her bir test örneği için % inhibisyon değeri, blanklar ile düzeltilmiş net absorbans (NA) verileri kullanılarak Eşitlik 4’e göre hesaplanmıştır.

Eşitlik (4):
$$\text{İnhibisyon (\%)} = (NA_{\text{Negatif Kontrol}} - NA_{\text{Test Örneği}} / NA_{\text{Negatif Kontrol}}) \times 100$$

$NA_{\text{Negatif Kontrol}}$: Negatif kontrol grubunun net absorbans değeri

$NA_{\text{Test örneği}}$: İlgili test örneğine ait net absorbans değeridir.



- **Pozitif Kontrol**
(60 μ L akarboz + 50 μ L enzim + 50 μ L substrat)
- **Pozitif Kontrol Blank**
(60 μ L akarboz + 100 μ L tampon II)
- **Zeytin Yaprığı Ekstraktı**
(60 μ L zeytin yaprağı ekstraktı + 50 μ L enzim + 50 μ L substrat)
- **Zeytin Yaprığı Blank**
(60 μ L zeytin yaprağı + 100 μ L tampon II)
- **Saflaştırılan Oleuropein (%68)**
(60 μ L saflaştırılan oleuropein + 50 μ L enzim + 50 μ L substrat)
- **Saflaştırılan Oleuropein (%68) Blank**
(60 μ L saflaştırılan oleuropein (%68) + 100 μ L tampon II)
- **Oleuropein Analitik Standardı (%98)**
(60 μ L oleuropein analitik standardı (%98) + 50 μ L enzim + 50 μ L substrat)
- **Oleuropein Analitik Standardı (%98) Blank**
(60 μ L oleuropein analitik standardı (%98) + 100 μ L tampon II)
- **Negatif Kontrol**
(60 μ L Tampon I + 100 μ L tampon II)
- **Substrat Blank**
(50 μ L substrat + 110 μ L tampon II)
- **Tampon Blank**
(160 μ L tampon I)

Şekil 3.12. α -Glukosidaz İnhibisyon Testi Kapsamında, 8000 ppm Düzeyindeki Test Örnekleri, Akarboz ve İlgili Blank Gruplarına Ait Mikroplaka Yerleşim Düzeni

3.11.2. α -Amilaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi

Zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılan materyal ve OLP analitik standardının α -amilaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Uygulanan yöntem, Liu ve arkadaşları (2013) tarafından bildirilen protokol temel alınarak optimize edilmiştir. Analiz, α -amilaz enziminin nişasta substratını hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan indirgen şekerlerin DNSA ile etkileşerek oluşturduğu renkli kompleksin 540 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

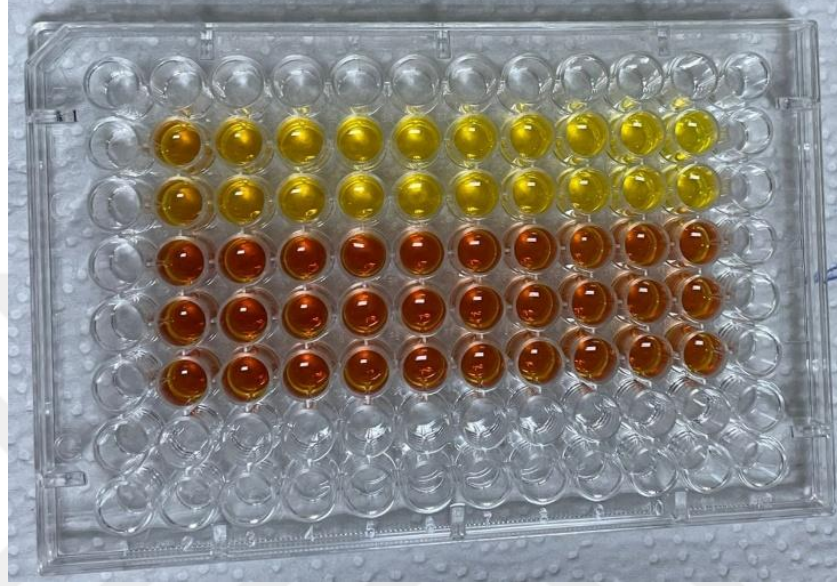
α -amilaz enzim inhibisyonu deneylerinde iki farklı tampon kullanılmıştır:

- Tampon III: %1 DMSO içeren 0,02 M pH 6,9 sodyum fosfat tamponu ve 0,006 M NaCl
- Tampon IV: DMSO içermeyen, 0,02 M pH 6,9 sodyum fosfat tamponu ve 0,006 M NaCl içeren çözelti olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada üç farklı test örneği (zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılan materyal ve OLP analitik standardı) ile birlikte pozitif kontrol olarak akarbozun α -amilaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirilmiştir. Tüm test örnekleri ve akarboz çözeltileri, Tampon III içerisinde hazırlanmıştır. Buna karşılık, substrat olarak kullanılan nişasta ve α -amilaz enzimi Tampon IV içerisinde çözündürülmüş; DNSA reaktifi ise distile su kullanılarak sodyum hidroksit ile hazırlanmıştır.

Deneyssel uygulamada, test örnekleri 250, 500, 1000 ve 2000 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. 40 μ L 5 U/ml α -amilaz çözeltisi, 360 μ L Tampon II ve 200 μ L numune çözeltisi ile karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Pozitif kontrol grubu olarak, aynı konsantrasyon aralıklarında hazırlanan akarboz çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı 37°C'de 20 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmış, ardından her tüpe 300 μ L %1 nişasta çözeltisi eklenerek tekrar 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonun durdurulması amacıyla her tüpe 200 μ L DNSA çözeltisi eklenmiş ve tüpler 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir.

Reaksiyon karışımlarının absorbans ölçümleri 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Liu ve ark., 2013). α -amilaz inhibisyon deneylerine ait bir görsel Şekil 3.13'te sunulmuştur.



Şekil 3.13. Zeytin Yaprığı Ekstraktı, Saflaştırılan Materyal ve Oleuropein Analitik Standardına Ait α -Amilaz İnhibisyonuna Yönelik Ön Denemelere İlişkin Görsel

3.12. İstatistiksel Analiz

Tüm deneysel veriler üç tekrarlı olacak şekilde elde edilmiş olup, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 25.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normalliği Shapiro-Wilk testi, varyans homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerde, gruplar arası farkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanmış, anlamlı fark tespit edilen durumlarda ise Tukey post-hoc testi ile grup farklılıkları analiz edilmiştir. Aynı çeşide ait kış ve yaz mevsiminde toplanan yapraklardaki bileşik düzeylerinin karşılaştırılmasında eşleştirilmiş t-testi kullanılmıştır.

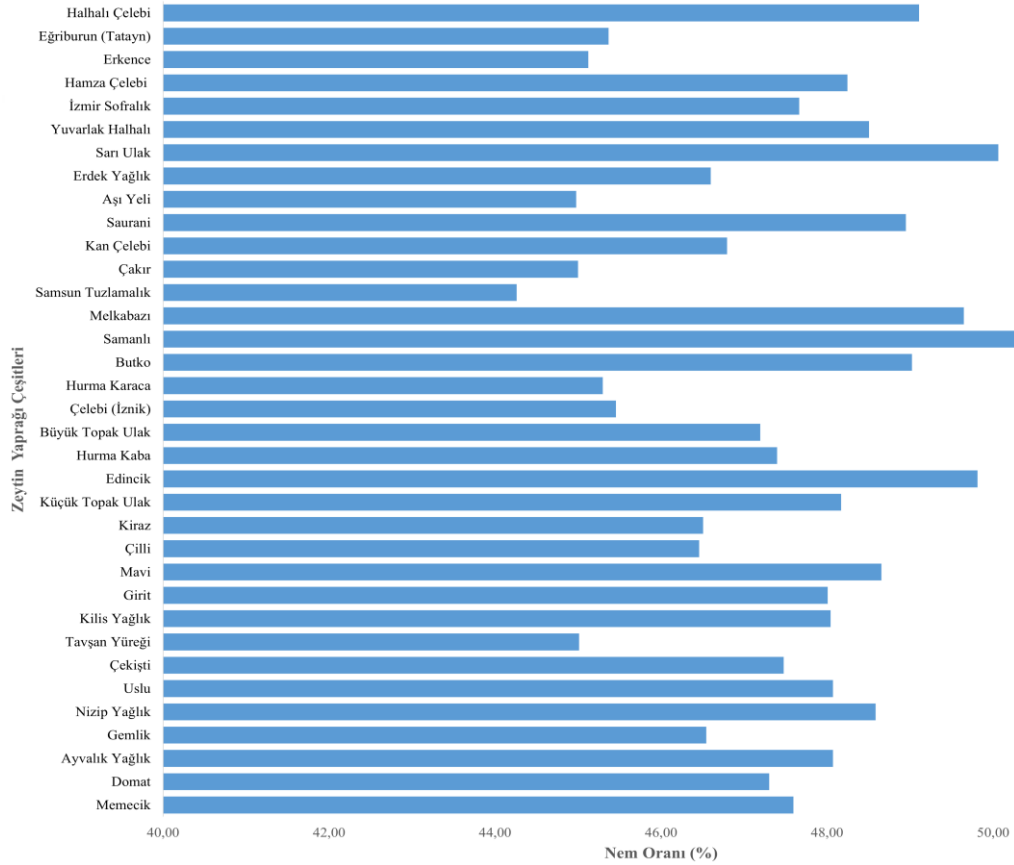
Değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Spearman sıralama korelasyon analizi (Spearman's rank correlation) uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi tüm testler için $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Veri işleme süreçlerinde Microsoft Excel programı kullanılmış; grafikler, regresyon eğrileri, histogramlar ve diğer tanımlayıcı görseller Minitab 18 ve Excel yazılımları aracılığıyla oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Numunelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

4.1.1. Nem Analizi Sonuçları

Şekil 4.1.'de farklı zeytin çeşitlerine ait zeytin yapraklarının nem içerikleri (%) gösterilmektedir. Yaprakların nem içerikleri %44,26 ile %51,10 arasında değişmekte olup, örnekler arasında belirgin bir farklılık göstermektedir. En yüksek nem içeriği Samanlı çeşidinde (%51,10) kaydedilirken, en düşük nem içeriği Samsun Tuzlamalık çeşidinde (%44,26) gözlemlenmiştir. Yüksek nem seviyelerine sahip diğer çeşitler arasında Edincik (%49,81), Melkabazı (%49,65) ve Halhalı Çelebi (%49,11) yer alırken; Çakır (%45,00), Erkence (%45,12) ve Tavşan Yüreği (%45,01) gibi çeşitler daha düşük nem içerikleri sergilemiştir



Şekil 4.1. Farklı Zeytin Çeşitlerine Ait Yaprakların Nem İçerikleri (%)

4.1.2. Renk Analizi Sonuçları

Zeytin yaprağı örneklerine ait renk analizi sonuçları Tablo 4.1’de sunulmaktadır.

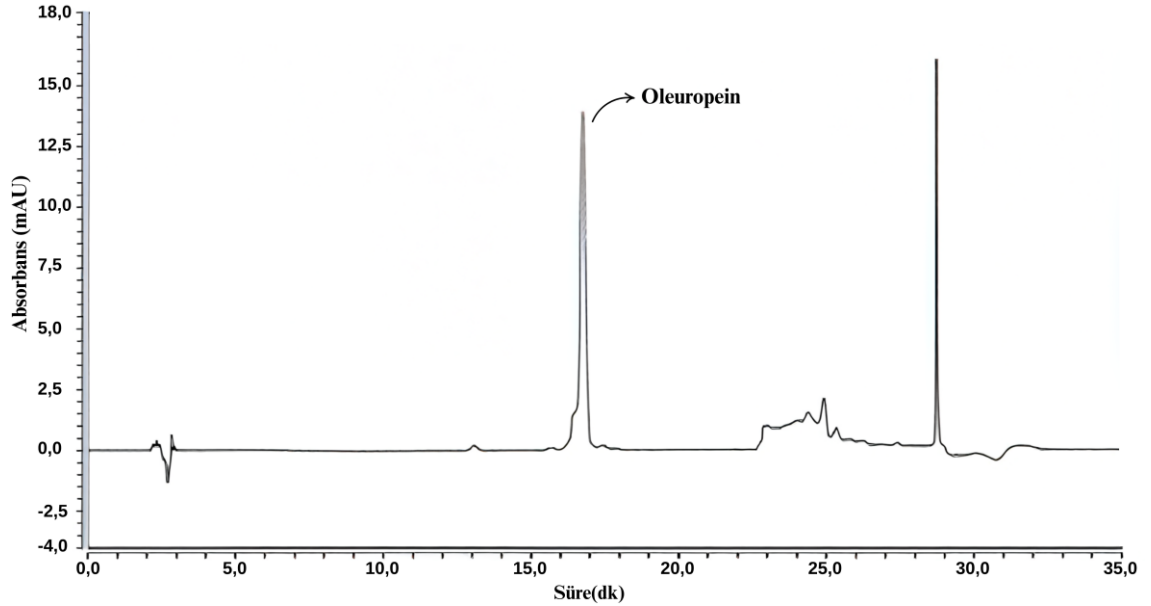
Tablo 4.1. Zeytin Yapraklı Renk Parametreleri (L*, a*, b*) Analiz Sonuçları

Zeytin Yapraklı	L* Değeri	a* Değeri	b* Değeri
Halhalı Çelebi	12,06	2,45	2,36
Eğriburun (Tatayn)	13,63	1,93	1,93
Erkence	13,18	2,31	1,29
Hamza Çelebi	13,80	1,89	1,92
İzmir Sofralık	13,11	1,92	2,09
Yuvarlak Halhalı	13,39	1,99	1,89
Sarı Ulak	12,59	2,09	2,22
Erdek Yağlık	13,88	2,26	1,72
Aşı Yeli	13,44	2,11	1,08
Saurani	10,76	2,43	3,76
Kan Çelebi	12,61	2,27	2,54
Çakır	13,05	1,90	1,87
Samsun Tuzlamalık	13,24	2,07	2,02
Melkabazı	14,52	1,82	1,17
Samanlı	13,00	2,09	2,66
Butko	13,47	1,99	1,62
Hurma Karaca	13,68	1,75	2,02
Çelebi (İznik)	13,13	2,05	2,39
Büyük Topak Ulak	13,00	2,25	2,02
Hurma Kaba	13,25	1,94	1,95
Edincik	13,42	2,17	1,66
Küçük Topak Ulak	13,33	2,12	2,49
Kiraz	12,97	1,96	2,07
Çilli	13,44	2,06	1,81
Mavi	13,68	1,95	2,09
Girit	13,07	2,03	2,96
Kilis Yağlık	11,31	2,02	1,46
Tavşan Yüreği	14,57	0,93	1,33
Çekişti	13,00	2,01	1,97
Uslu	13,69	1,97	1,66
Nizip Yağlık	12,56	1,95	2,99
Gemlik	13,35	2,32	2,55
Ayvalık Yağlık	13,14	2,26	2,76
Domat	12,73	2,32	2,33
Memecik	10,89	2,29	3,67

Tablo 4.1'e sunulan verilere göre, çeşitler arasında yaprak rengi açısından belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Parlaklığı temsil eden L değerleri 10,76–14,57 aralığında değişmiş; bu durum tüm örneklerin genel olarak koyu renkli yapraklara sahip olduğunu göstermektedir. En koyu tonlar Saurani ve Memecik, en açık yeşil tonlar ise Tavşan Yüreği ve Melkabazı çeşitlerinde kaydedilmiştir. Tavşan Yüreği en düşük a değerine (0,93), Halhalı Çelebi ise en yüksek a* değerine (2,45) sahiptir. Tüm b* değerlerinin pozitif olması, sarı tonun maviye baskın olduğunu göstermektedir. Saurani (3,76) ve Memecik (3,67) en yüksek b* değerlerine sahipken, Aşı Yeli (1,08) en düşük b* değeriyle sarı ton katkısının en az olduğu çeşittir. Bulgular, yaprak renginin zeytin çeşitlerine göre farklılaştığını ortaya koymaktadır

4.2. UPLC Validasyon Parametreleri

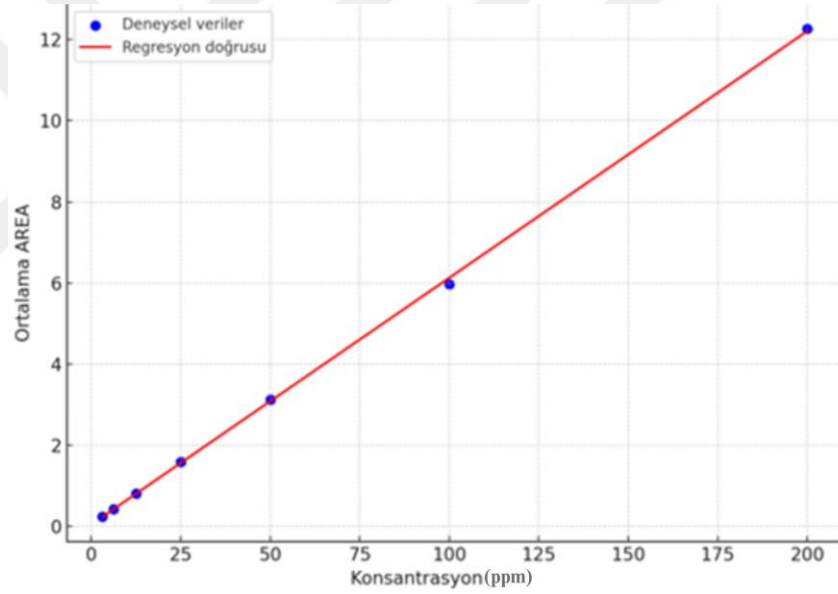
Zeytin yapraklarındaki OLP düzeylerinin UPLC yöntemi ile belirlenmesinden önce ilgili yöntem valide edilmiştir. Bu kapsamda 3.6. Oleuropein Miktar Tayini bölümünde belirtildiği şekliyle hazırlanan kromatografik sisteme OLP analitik standardı enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Oleuropein Standart Çözeltisine Ait Kromatogram (50 ppm)

Belirtilen kromatografik sisteme farklı konsantrasyonlarda enjekte edilen OLP standardı için elde edilen kalibrasyon eğrisi, 3,125–200 ppm aralığında doğrusal bir ilişki sergilemiş olup doğrusallık analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.3.’te sunulmuştur. Kullanılan kromatografik koşullar altında, kalibrasyon eğrisi regresyon analiziyle yüksek doğrusallık göstermiştir ($R^2 > 0,9997$). Doğru eğimi (slope) 0,0608, y-kesişim noktası ise 0,0418 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, veri noktalarının regresyon doğrusundan sapmaları analiz edilmiş ve artık kareler toplamı 0,0306 olarak bulunmuştur. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre regresyon doğrusu Eşitlik 5’te verilmiştir:

Eşitlik (5): $y = 0,0608x + 0,0418$



Şekil 4.3. 3,125- 200 ppm Aralığında Oleuropein Analitik Standardına Ait Kalibrasyon Grafiği

LOD ve LOQ için 3,125 ppm düzeyindeki ölçüm tekrarlarından elde edilen yanıtların standart sapması 0,1290 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere dayanarak, LOD 0,3871 ppm ve LOQ ise 1,2905 ppm olarak hesaplanmıştır.

Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik değeri olarak ifade edilmiş ve bu değer %RSD 0,27 olarak hesaplanmıştır. Analitik yöntemin ara kesinliği, farklı günlerde gerçekleştirilen ölçümler ile değerlendirilmiş olup ara kesinlik için %RSD 0,64 olarak belirlenmiştir.

Doğruluk (geri kazanım) parametresi doğrusal aralığın (3,125–200 ppm) orta düzeyi 50 ppm olarak kabul edilmiş ve bu değer esas alınarak düşük (%50), orta (%100) ve yüksek düzeyleri (%200) değerleri için hesaplanmış ve analiz sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

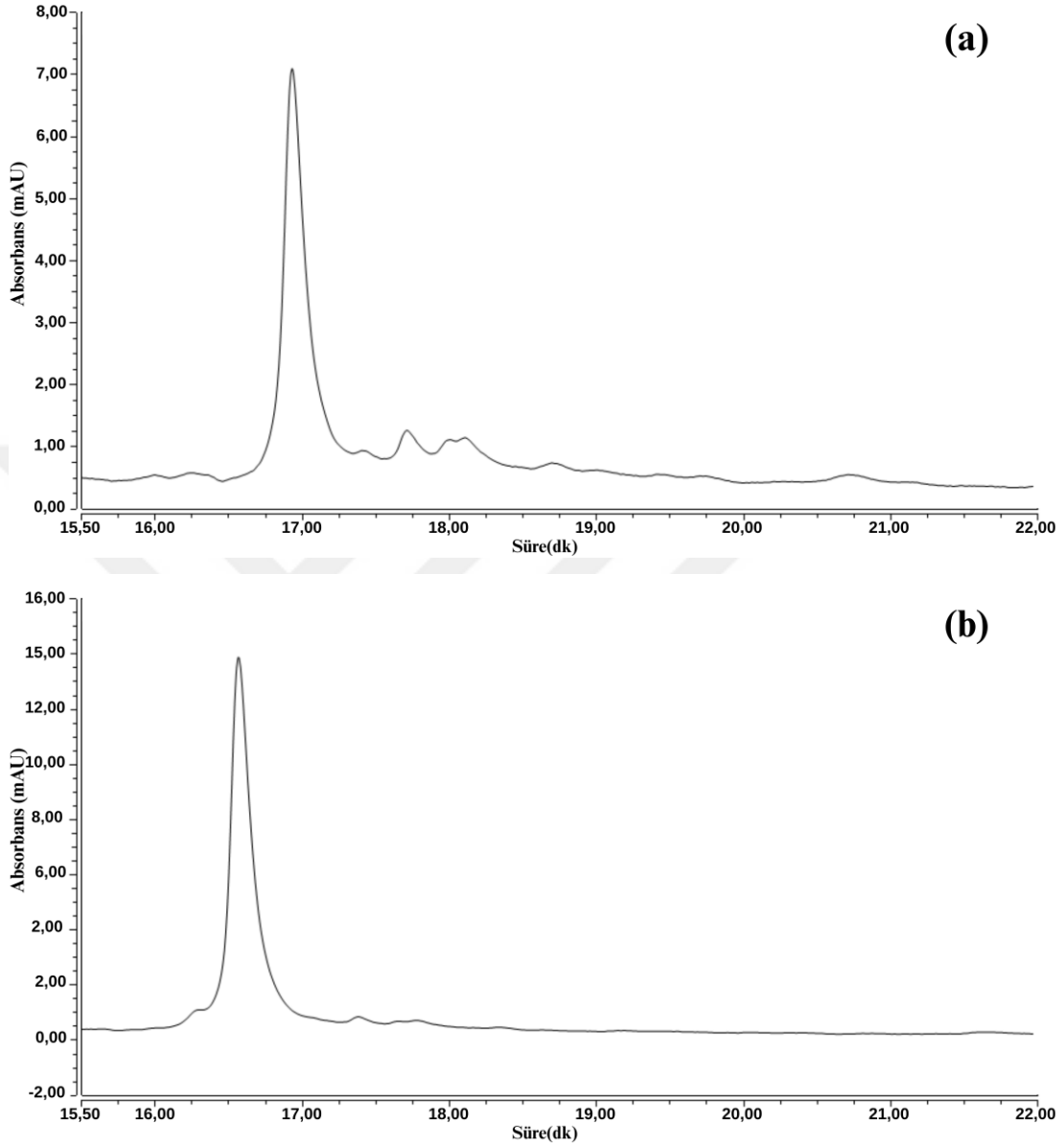
Tablo 4.2. Oleuropeine Ait Doğruluk (Geri Kazanım) Verileri

Düzy	Konsantrasyon (ppm)	Ölçülen Ortalama Konsantrasyon (ppm) $\pm$ SD	Geri Kazanım (%)
Düşük düzey (%50)	25	25,49 $\pm$ 0,35	101,95
Orta düzey (%100)	50	50,79 $\pm$ 0,13	101,58
Yüksek düzey (%200)	100	97,54 $\pm$ 2,24	97,54

SD: Standart Sapma
n=3

Tablo 4.2’de sunulan verilere göre, düşük düzeyde ortalama ölçülen konsantrasyon 25,49 ppm, orta düzeyde 50,79 ppm ve yüksek düzeyde 97,54 ppm olarak bulunmuştur. Bu düzeylerde hesaplanan geri kazanım oranları sırasıyla %101,96, %101,57 ve %97,54 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.2.’te OLP pikinin çıkış zamanını gösterilmektedir. Şekil 4.4.’te ise zeytin yaprağı ekstraktına ait kromatogram (a) ve bu ekstrakta OLP standardı eklenerek yapılan spike çalışması (b) gösterilmektedir. OLP pikinin çıkış zamanında ekstrakt içinde karşılık gelen bir pik gözlenmiş ve OLP standardı eklenmesiyle bu pikin alanında belirgin artış saptanmıştır. Bu bulgular, yöntemin OLP’yi ekstrakt içerisindeki diğer bileşenlerden ayırt edebildiğini ve spesifiklik açısından yeterli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, OLP pikinin özgüllüğünü desteklemek amacıyla UV spektral analiz gerçekleştirilmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktındaki hedef pikin UV spektrumu, OLP standardının UV spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Her iki spektrumun da maksimum absorbans değerinin 280 nm’de olduğu ve spektral örtüşme gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, ölçülen piklerin OLP’ye ait olduğunu doğrulamakta ve yöntemin spesifikliğini desteklemektedir.



Şekil 4.4. Zeytin Yaprığı Ekstraktı Kromatogramı (a); Oleuropein Standardı Eklenmiş Ekstraktın Kromatogramı (b)

4.3. Oleuropein Ekstraksiyon Sonuçları

Bu çalışmada, OLP ekstraksiyonu için SFE-CO₂ yöntemiyle gerçekleştirilen denemelerde istenilen verime ulaşılammıştır. Bu nedenle çalışmaya, ekstraksiyon parametrelerinin RSM ile optimize edildiği ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniğiyle devam edilmiştir. Tablo 4.3'te RSM tasarımına göre UAE koşulları ve elde edilen OLP verimleri sunulmaktadır.

Tablo 4.3. Yüzey Yanıt Metodu Tasarımına Göre Ultrasonik Ekstraksiyon Koşulları ve Oleuropein Verimleri (mg/g)

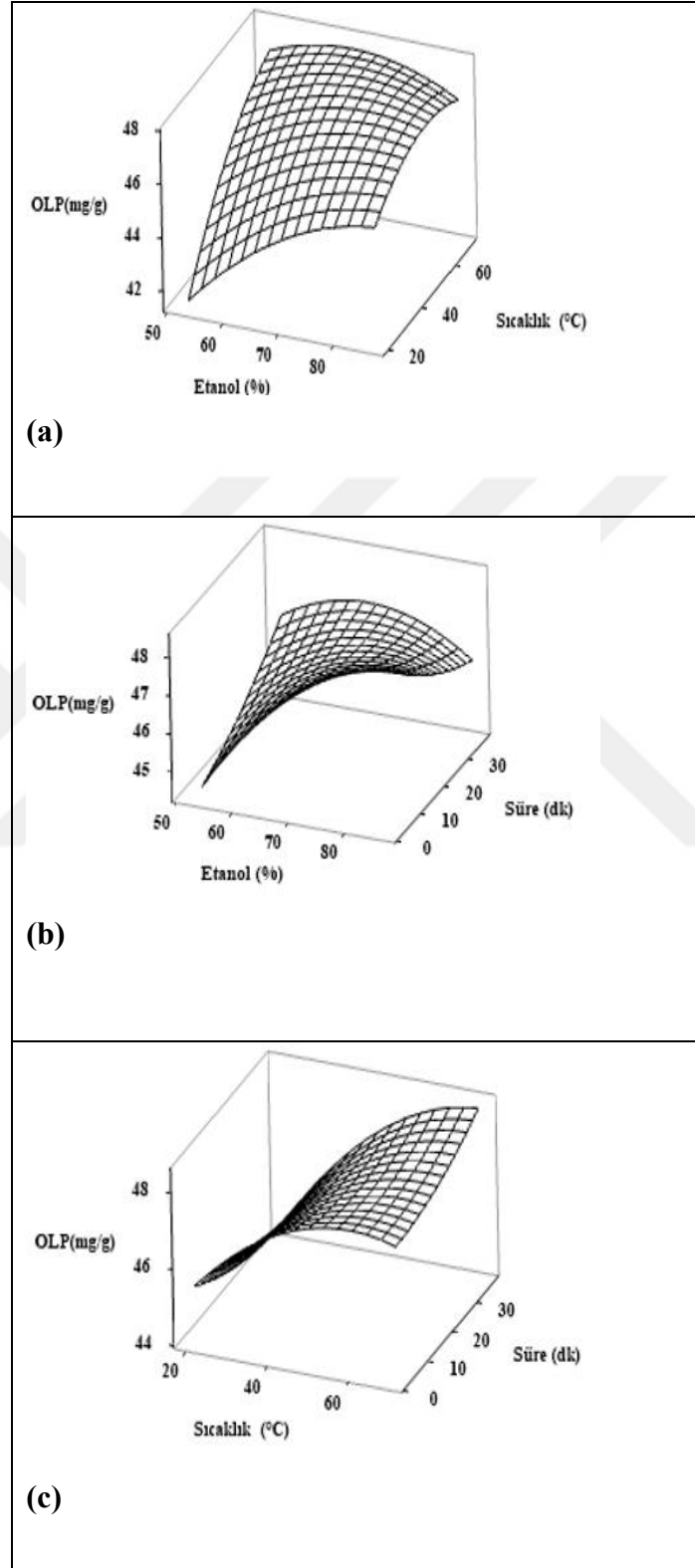
Deney Sırası	Bağımsız Değişkenler			Oleuropein Miktarı (mg/g)
	X_1 (%)	X_2 (°C)	X_3 (dk)	
1	70 (0)	70 (+1,682)	20 (0)	46,93
2	80 (1)	30 (-1)	10 (-1)	47,17
3	70 (0)	45 (0)	20 (0)	47,25
4	87 (+1,682)	45 (0)	20 (0)	46,67
5	60 (-1)	30 (-1)	30 (1)	44,06
6	70 (0)	45 (0)	20 (0)	46,69
7	80 (1)	60 (1)	30 (1)	47,44
8	70 (0)	45 (0)	37 (+1,682)	47,81
9	60 (-1)	60 (1)	30 (1)	47,86
10	70 (0)	20 (-1,682)	20 (0)	45,06
11	70 (0)	45 (0)	20 (0)	47,28
12	53 (-1,682)	45 (0)	20 (0)	45,45
13	70 (0)	45 (0)	20 (0)	47,13
14	70 (0)	45 (0)	20 (0)	47,45
15	60 (-1)	60 (1)	10 (-1)	47,1
16	80 (1)	30 (-1)	30 (1)	45,72
17	70 (0)	45 (0)	20 (0)	46,50
18	80 (1)	60 (1)	10 (-1)	48,61
19	60 (-1)	30 (-1)	10 (-1)	44,51
20	70 (0)	45 (0)	3 (-1,682)	46,55
Semboller		Kodlanmış Seviyeler		
Değişkenler		-1	0	1
Etanol Konsantrasyonu	X_1	60	70	80
Ultrasonik Sıcaklık	X_2	30	45	60
Ultrasonik Süre	X_3	10	20	30

Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak yapılan ultrason destekli OLP ekstraksiyonuna ait varyans analizi sonuçları ve model özeti Tablo 4.4'te sunulmaktadır. Genel regresyon modelinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($F = 5,94$, $p = 0,005$) görülmüştür. Test edilen bağımsız değişkenler, OLP verimindeki değişimi açıklamaya önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır.

Ana etkiler incelendiğinde, hem etanol konsantrasyonu ($p<0,05$) hem de ekstraksiyon sıcaklığı ($p<0,001$) OLP verimi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkilere sahipken ekstraksiyon süresi anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Farklı sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu şartlarında OLP ekstraksiyonu için elde edilen RSM grafikleri OLP verimi üzerindeki etkileri, yanıt yüzeyi grafikleri ile görsel olarak da desteklenmiştir. Şekil 4.5a'da görüldüğü üzere, etanol konsantrasyonundaki artış, sıcaklıkla birlikte OLP verimini belirgin şekilde artırmıştır. Buna karşılık, Şekil 4.5b'de süre faktörünün etkisi sınırlı kalmıştır. Karesel terimler ve ikili etkileşimler incelendiğinde anlamlı katkılar bulunmamıştır ($p>0,05$). Lack-of-fit modelin verilere yeterince uyduğunu göstermektedir ($p>0,05$). Model uyum istatistikleri incelendiğinde, R^2 %84,24 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, yanıtta değişkenliğin büyük bir kısmının model tarafından açıklandığını göstermektedir.

Tablo 4.4. Yüzey Yanıt Metoduna Göre Yapılan Varyans Analizi ve Model Uygunluğu İstatistikleri

Varyans Kaynağı	F Değeri	<i>p</i> -Değeri
Model	5,94	0,005
Ana Etkiler		
Etanol Konsantrasyonu (%)	10,05	0,010
Sıcaklık (°C)	29,31	0,000
Süre (dk)	0,01	0,945
Karesel Terimler		
Etanol ²	3,44	0,093
Sıcaklık ²	3,98	0,074
Süre ²	0,25	0,627
İkili Etkileşimler		
Etanol × Sıcaklık	3,21	0,103
Etanol × Süre	2,68	0,133
Sıcaklık × Süre	0,69	0,426
Lack-of-fit	4,84	0,054
Model Uygunluk Değerleri	Değer	
S (Standart Hata)	0,635	
R^2 (R-sq) (%)	84,24	



Şekil 4.5. Yanıt Yüzey Metodu Optimizasyonu Sonucunda Elde Edilen Üç Boyutlu Yüzey Yanıt Grafikleri: (a) Etanol Yüzdesi ve Sıcaklığın Oleuropein Miktarına Etkisi, (b) Etanol Yüzdesi ve Ekstraksiyon Süresinin Oleuropein Miktarına Etkisi, (c) Sıcaklık ve Ekstraksiyon Süresinin Oleuropein Miktarına Etkisi

Tablo 4.5'te, en yüksek verimlilikte OLP elde etmek için optimum koşulları ve bu koşullar için formül gösterilmektedir. OLP verimini en yüksek seviyede elde etmede en uygun etanol oranı %87, sıcaklık 70°C ve süre ise 37 dakika olarak belirlenmiştir. Bu parametreler doğrultusunda ek deneyler sonrası OLP verimi $48,71 \pm 0,20$ mg/g olarak ölçülmüş ve bu değer, modelin öngörüsüyle (49,32 mg/g) yüksek düzeyde uyum göstermiştir.

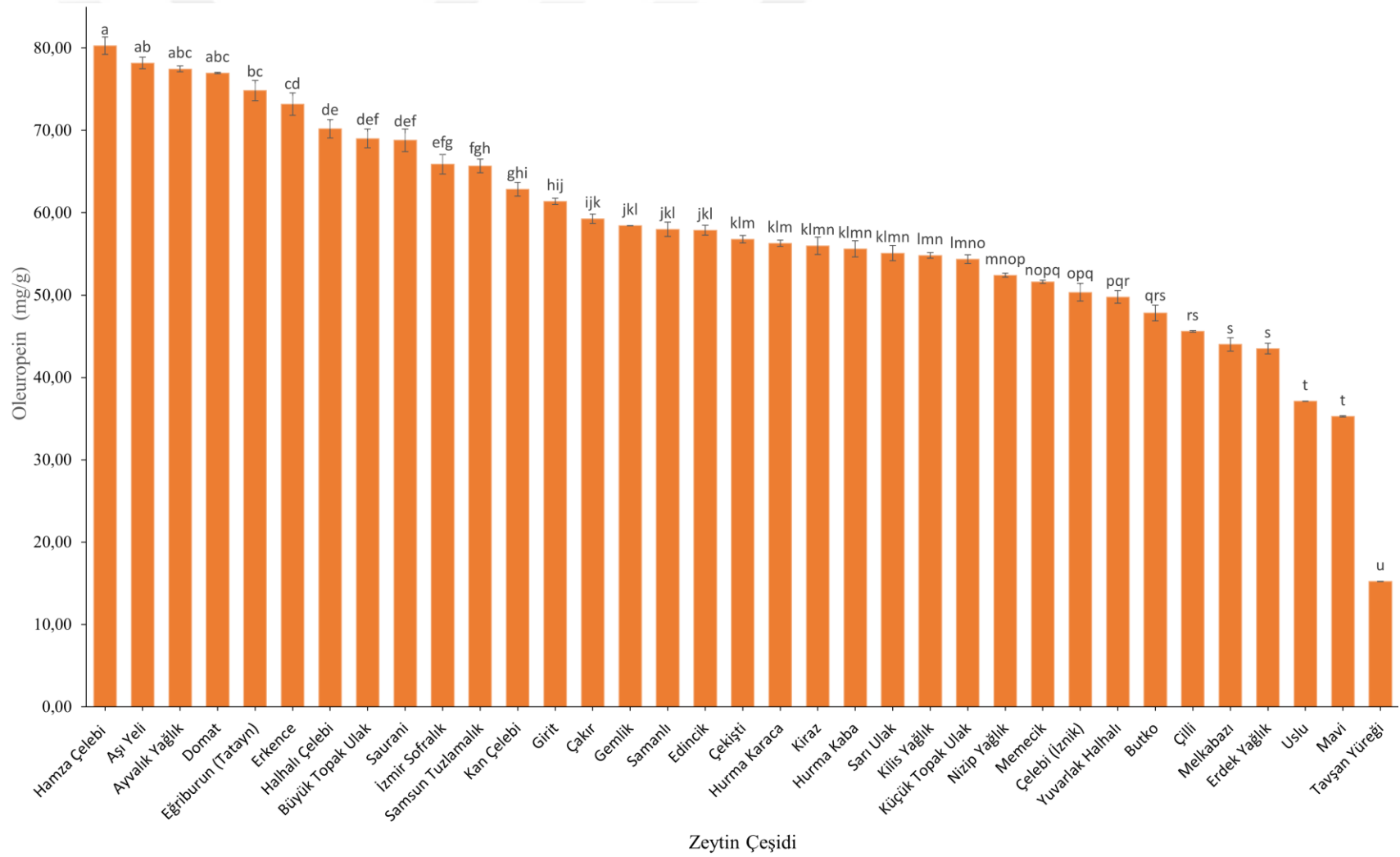
Tablo 4.5. Oleuropein Verimini Maksimize Eden Optimum Koşullar ve Tahmin Edilen Formül

Parametreler	Değerler
X_1 (%)	87
X_2 (°C)	70
X_3 (dk)	37
Oleuropein (mg/g)	$=10,30+0,676 \cdot X_1+0,361 \cdot X_2+0,167 \cdot X_3-0,00305 \cdot X_1^2-0,001505 \cdot X_2^2+0,00082 \cdot X_3^2-0,00268 \cdot X_1 X_2-0,00367 \cdot X_1 X_3+0,00124 \cdot X_2 X_3$
X_1 : Etanol Konsantrasyonu (%)	
X_2 Ultrasonik Sıcaklık (°C)	
X_3 Ultrasonik Süre (dk)	

4.4. Oleuropein Miktar Tayini Sonuçları

4.4.1. Farklı Zeytin Çeşidi Yapraklarındaki Oleuropein İçeriği

Bu çalışma kapsamında OLP miktarı açısından incelenmiş olan zeytin yaprağı örnekleri UAE çalışmalarından elde edilen optimum değerler kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ancak fenolik bileşiklerin 70°C ve üzerindeki sıcaklıklarda bozulma riski ve OLP'nin nispeten düşük termal kararlılığı nedeniyle (Ahmad-Qasem ve ark., 2013; Dent ve ark.,2013; Stamatopoulos ve ark.,2013; Cifá ve ark., 2018) merkezi kompozit tasarımda en uygun sıcaklık 70°C olarak hesaplanmasına karşın çalışmada tedarik edilen zeytin yaprağı numunelerinde uygulanan ekstraksiyon sıcaklık değeri 60°C olarak seçilmiştir. Bu çerçevede farklı zeytin çeşitlerine ait yapraklarının OLP içerikleri Şekil 4.6'da sunulmaktadır.



Farklı harfı paylaşan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur. $n=3$.

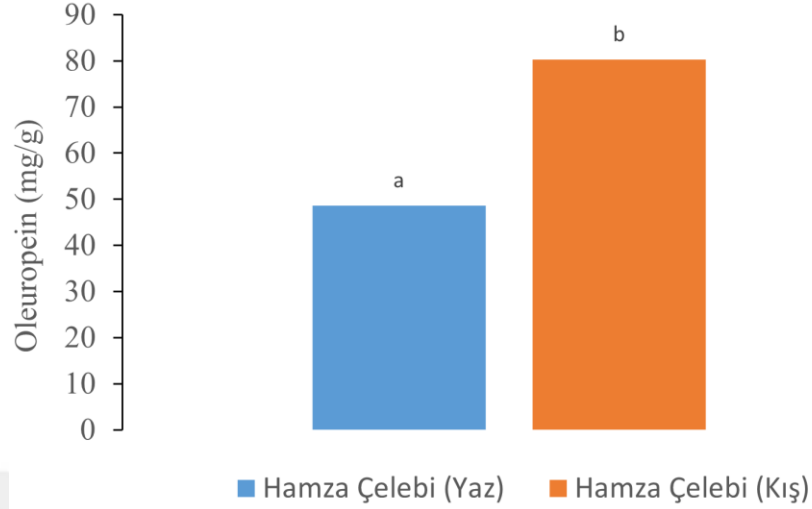
Şekil 4.6. Kış Döneminde Hasat Edilen Farklı Zeytin Çeşitlerine Ait Yaprakların Ortalama Oleuropein Miktarları (mg/g)

Şekil 4.6’da sunulan verilere göre, zeytin yapraklarındaki OLP içeriği $15,22 \pm 0,03$ mg/g ile $80,29 \pm 1,83$ mg/g arasında değişmektedir. Tek yönlü varyans analizi sonucuna göre çeşitler arasındaki OLP içeriği bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). En yüksek OLP içeriğine sahip yaprak çeşidi, $80,29 \pm 1,83$ mg/g Hamza Çelebi çeşidinde gözlemlenmiştir. Bunu Aşı Yeli ($78,18 \pm 1,21$ mg/g), Ayvalık Yağlık ($77,46 \pm 0,63$ mg/g) ve Domat ($76,97$ mg/g $\pm 0,12$) takip etmiştir. Bu dört zeytin çeşidi, diğer çeşitle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek OLP içeriğine sahiptir ($p<0,05$). Diğer yandan en düşük OLP içeriğine sahip zeytin çeşidi $15,22 \pm 0,03$ mg/g değeriyle Tavşan Yüreği çeşidinde rastlanmıştır ($p<0,05$). Bunu Mavi ($35,27 \pm 0,14$ mg/g) ve Uslu ($37,11 \pm 0,02$ mg/g) takip etmiştir. Bu çeşitler diğer zeytin yaprağı çeşitlerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük OLP içeriği sergilemiştir ($p<0,05$).

Çalışma kapsamında analiz edilen 35 farklı zeytin çeşidine ait yaprak örneklerinde, OLP içeriği bakımından çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, söz konusu farklılıkların yaprakların fiziksel özellikleriyle ilişkili olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, OLP içeriği ile yaprak rengini temsil eden L*, a* ve b* renk parametreleri arasındaki ilişki de incelenmiştir. Ancak yapılan istatistiksel analizler sonucunda, OLP içeriği ile bu renk parametreleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0,05$) (bkz. Tablo 4.1.).

4.4.2. Mevsimsel Değişimin Oleuropein İçeriğine Etkisi

Bu çalışmada incelenen zeytin yaprağı çeşitlerinden OLP içeriği en yüksek olarak belirlenen Hamza Çelebi çeşidine ait zeytin yaprakların OLP içeriği üzerine mevsimsel değişimin etkisi Şekil 4.7’de gösterilmektedir. Bu kapsamda yaz (temmuz) ve kış (ocak) mevsimlerinde toplanan yaprak örnekleri analiz edilmiş ve bu yaprakların OLP içerikleri sırasıyla $48,62 \pm 0,20$ mg/g ve $80,29 \pm 1,83$ mg/g olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, kış mevsiminde toplanan yapraklarda bulunan OLP içeriği, yaz mevsiminde toplanan yapraklara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

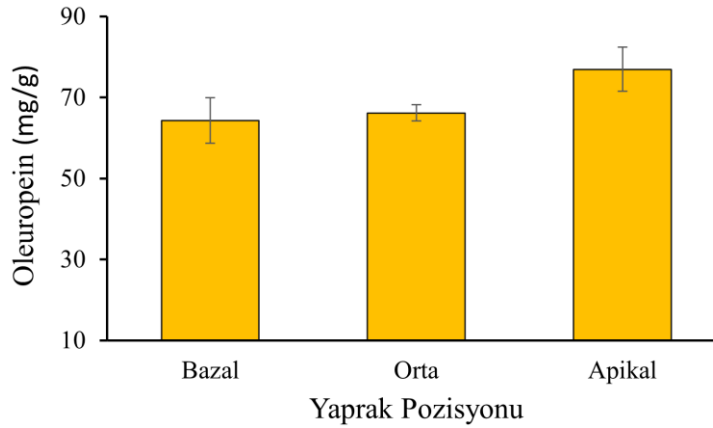


Değerler, her mevsim için üç tekrara dayalı olarak ortalama şeklinde sunulmuştur. Farklı harfi paylaşan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,001$).

Şekil 4.7. Hamza Çelebi Zeytin Çeşidinde Mevsimsel Değişimin Oleuropein İçeriğine Etkisi

4.4.3. Yaprakların Lokalizasyonlarına Göre Oleuropeinin Değişimi

Zeytin ağacının farklı yaprak konumlarının OLP içeriği üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla; apikal (uç), orta ve bazal (dip) bölgelerden toplanan yaprak örnekleri analiz edilmiş, elde edilen bulgular Şekil 4.8’de sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, apikal bölge için ortalama $76,84 \pm 8,56$ mg/g, orta bölge için $66,95 \pm 12,51$ mg/g ve bazal bölge için $68,79 \pm 12,32$ mg/g OLP tespit edilmiştir. Sonuçlar, yaprakların zeytin ağacındaki lokalizasyonuna göre OLP içeriği açısından anlamlı bir fark bulunmadığına işaret etmektedir ($p>0,05$).

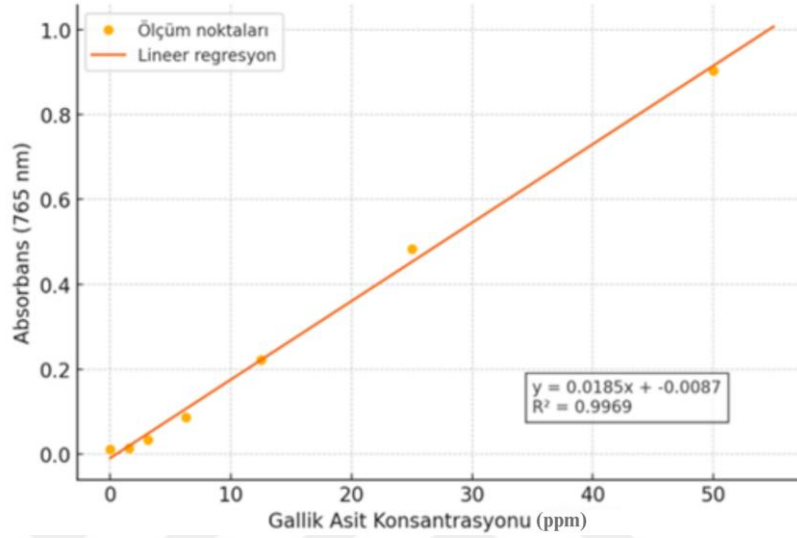


Veriler ortalamaları $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur.

Şekil 4.8. Zeytin Yapraklarının Ağaçtaki Lokalizasyonlarına Göre Oleuropein Miktarındaki Değişimleri

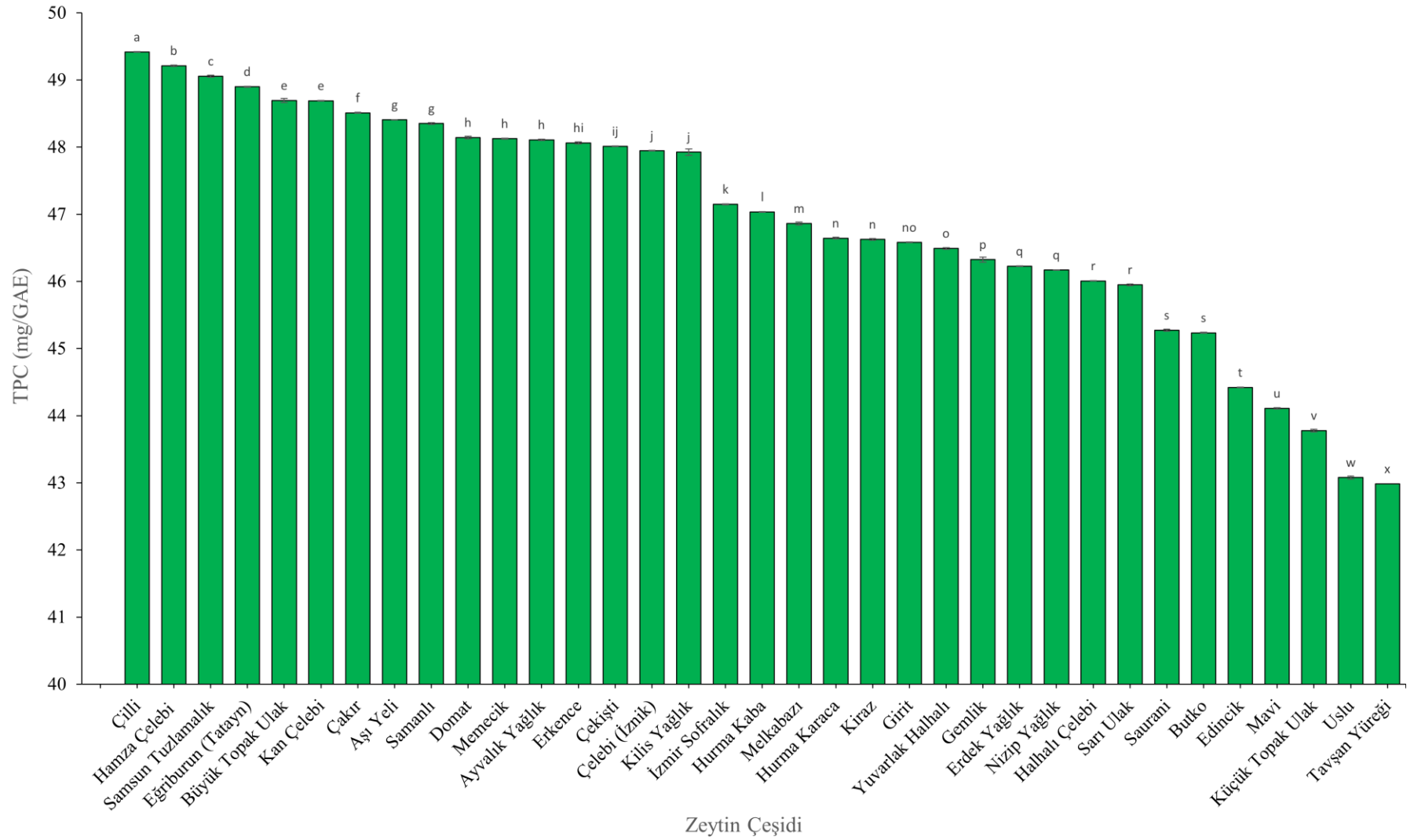
4.5. Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış ve gallik asit standart çözeltileri ile bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.9).



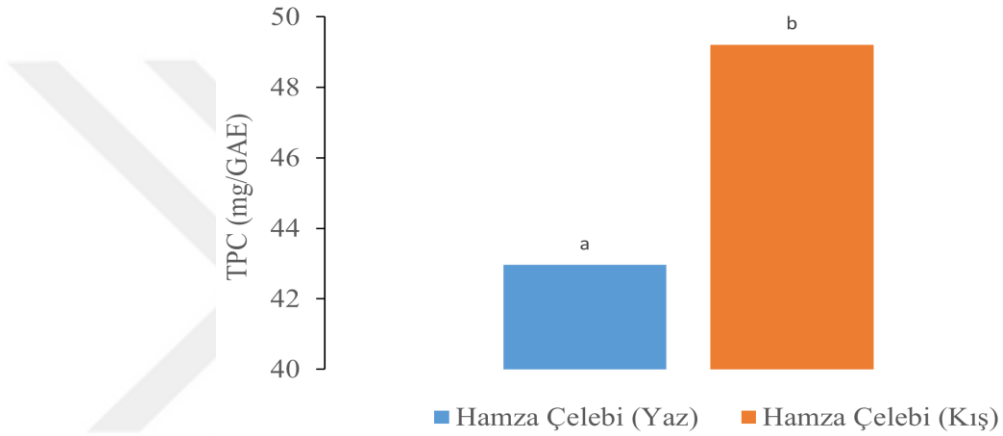
Şekil 4.9. Gallik Asit ile Oluşturulan Toplam Fenolik Madde Kalibrasyon Eğrisi

Şekil 4.9.'da sunulan verilere göre, 0-50 ppm aralığında hazırlanan gallik asit standardı ile elde edilen değerler doğrusal bir ilişki göstermiştir ($R^2 = 0,9969$). Elde edilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak çalışma kapsamındaki farklı zeytin çeşitlerine ait yaprakların TPC miktarları Şekil 4.10'da gösterilmektedir.



Şekil 4.10. Kış Döneminde Hasat Edilen Farklı Zeytin Çeşitlerine Ait Yapraklarda Ortalama Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg/GAE)

Elde edilen bulgulara göre, TPC düzeyleri farklı zeytin yaprağı çeşitleri arasında 42,98 mg GAE/g ile 49,42 mg GAE/g arasında değişmektedir. Çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttur ($p<0,05$). En yüksek TPC, Çilli çeşidinde ($49,42 \pm 0,03$ mg GAE/g, $p<0,05$), ardında Hamza Çelebi ($49,21 \pm 0,02$ mg GAE/g) çeşidinde tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna karşılık, en düşük TPC, Tavşan Yüreği çeşidinde ($42,98 \pm 0,04$ mg GAE/g, $p<0,05$) bulunmuş, bunu Uslu ($43,08 \pm 0,02$ mg GAE/g) ve Küçük Topak Ulak ($43,78 \pm 0,02$ mg GAE/g) takip etmiştir ($p<0,05$).



Değerler, her mevsim için üç tekrara dayalı olarak ortalama şeklinde sunulmuştur. Farklı harfi paylaşan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,001$).

Şekil 4.11. Hamza Çelebi Çeşidine Ait Zeytin Yapraklarında Mevsimsel Değişimin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi

Şekil 4.11’de Hamza Çelebi çeşidine ait zeytin yapraklarının TPC içeriğinin mevsimsel değişimini gösterilmektedir. Yaz (temmuz) ve kış (ocak) mevsimlerinde toplanan yaprak örnekleri analiz edilmiş ve bu yaprakların TPC içerikleri sırasıyla $42,96 \pm 0,01$ mg GAE/g ve $49,21 \pm 0,02$ mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda iki mevsim arasında OLP içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,001$). Kış mevsiminde toplanan yaprakların TPC içeriği, yaz mevsiminde toplanan yapraklara kıyasla daha yüksek düzeydedir.

Bu çalışma kapsamında analiz edilen 35 farklı zeytin çeşidine ait yaprak örneklerinin analiz sonucuna göre, OLP içeriği ile TPC miktarı arasında orta düzeyde, pozitif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($r = 0,620$; $p<0,001$). Bu bulgu, farklı genetik özelliklere sahip zeytin çeşitlerinde TPC içeriğinde artışın OLP düzeyindeki artışla ilişkili olduğunu göstermektedir.

4.6. Oleuropeinin Saflaştırılması

Saflaştırma çalışmaları kapsamında yüksek düzeyde OLP tespit edilen Hamza Çelebi çeşidine ait yazlık zeytin yaprağı örneğinden daha yüksek miktarda numune alınmış ve önceden RSM ile optimize edilmiş ultrasonik ekstraksiyon koşulları (%87 etanol, 60°C, 37 dakika) altında ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Başlangıç materyalinin hazırlanması için 20,00 g zeytin yaprağı 400 ml %87 etanol ile birleştirilmiştir. Bu koşullar altında yaz döneminde hasat edilen zeytin yapraklarından UAE yöntemi ile elde edilen ekstraktın %4,88 düzeyinde OLP içerdiği belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen ekstrakttaki OLP düzeyini artırmak amacı ile lipofilik bileşenlerin giderilmesi çalışmaları ile devam etmiştir. Bu adımın ardından ekstrakt ağırlığı 6,20 g olarak belirlenmiştir. Toplam OLP içeriği 975,12'dan 749,31 mg'a düşerek, yaklaşık %23,16'lık bir OLP kaybı gerçekleşmiştir. Buna rağmen bu adım sonunda ekstrakttaki OLP miktarı %4,88'den %12,09'a yükselmiştir (Tablo 4.6).

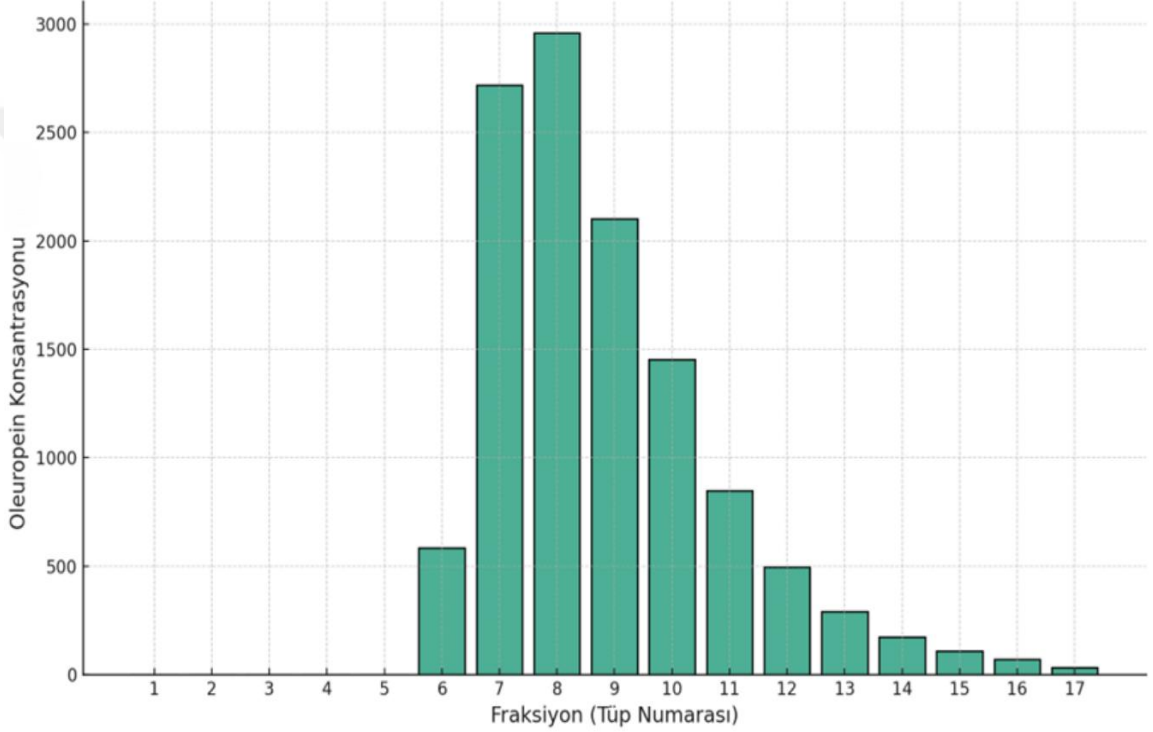
Tablo 4.6. Oleuropein Saflaştırma Adımlarında Ekstrakt Miktarı, Oleuropein İçeriği ve Kayıp Oranları

Saflaştırma Adımı	Kalan Ekstrakt Miktarı (g)	Oleuropein (mg)	Oleuropein (%)	Kayıp (% Oleuropein)
Ultrasonik Ekstraksiyon	20,00	975,12	4,88	
Lipit Uzaklaştırma	6,20	749,31	12,09	23,16
Sıvı Sıvı Ekstraksiyon	1,32	727,48	55,11	2,24
Silika Jel Sonrası	1,06	723,87	68,29	0,37

Sıvı-sıvı ekstraksiyon aşamasında, 727,48 mg OLP içeren 1,32 g ekstrakt elde edilmiştir. Bu aşamada toplam OLP miktarında ek %2,24'lük bir kayıp gözlemlenmiş ancak OLP yüzdesi önemli ölçüde artarak %55,11'e çıkmıştır.

Saflaştırma işleminin son adımında, silika jel kolon kromatografisi uygulanmıştır. Bu işlem sırasında, kolonun altına yerleştirilen 50 ml'lik tüplere toplam 17 farklı fraksiyon toplanmış ve her fraksiyondaki OLP içeriği UPLC kullanılarak belirlenmiştir. UPLC analizine göre, OLP içeriği ilk beş fraksiyonda tespit edilememiş; 6–17. fraksiyonlar arasında ise OLP saptanmıştır.

En yüksek OLP konsantrasyonu, Şekil 4.12'de gösterildiği üzere Fraksiyon 8'de gözlemlenmiştir. En yüksek OLP içeriğine sahip dokuz tüp birleştirilmiş ve yürütücü, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve toplam 1,06 g ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraktın içeriğinde 723,87 mg OLP bulunmakta olup, %68,29'luk saflık düzeyi sağlanmıştır. Kolon kromatografisi adımıyla OLP kaybı yalnızca %0,37 düzeyinde gerçekleşmiştir.



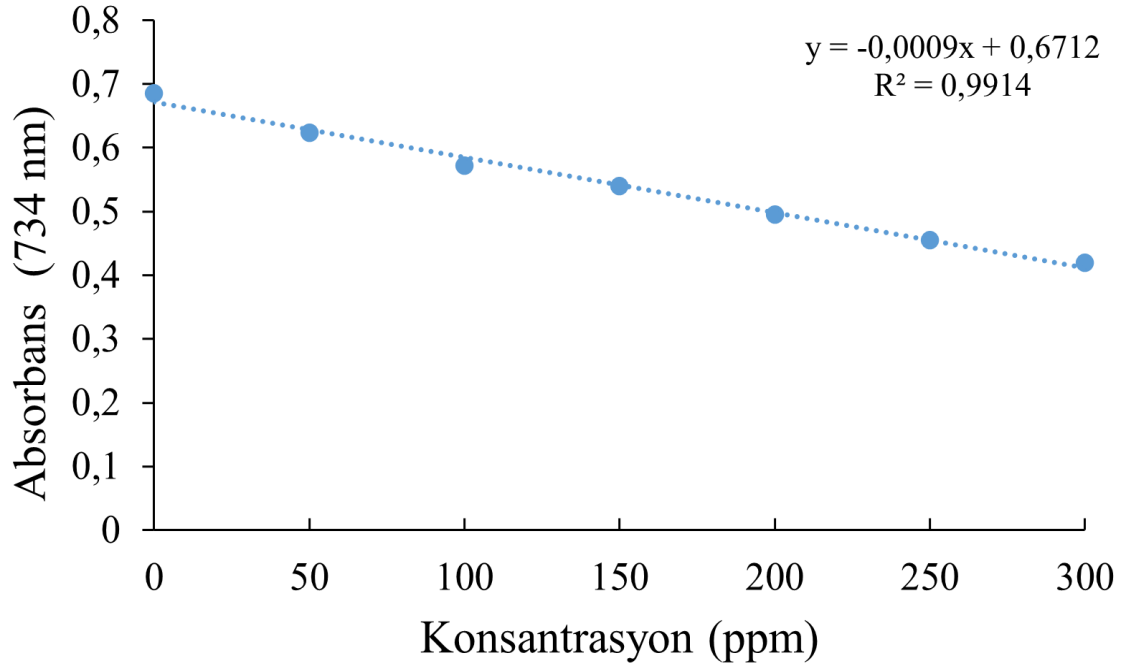
Şekil 4.12. Kolon Kromatografisinden Elde Edilen Fraksiyonların Oleuropein İçeriği (ppm)

Sonuç olarak, saflaştırma süreci sonunda toplam 20,00 g kurutulmuş zeytin yaprağı numunesinden 1,06 g saflaştırılmış materyal elde edilmiş ve bu materyalin kromatografik analizinde 723,87 mg OLP tespit edilmiş ve saflaştırılan materyalin OLP açısından saflık oranı %68,29 olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan materyalin başlangıç numunesindeki düzey 975,12 mg olması nedeni ile de toplam geri kazanım oranı %74,37 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar çalışma kapsamında, uygulanan saflaştırma protokolünün hem yüksek verim hem de yüksek saflık elde etmede etkili olduğunu göstermektedir.

4.7. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.7.1. ABTS^{•+} Katyon Radikali Giderme Aktivitesi Sonuçları

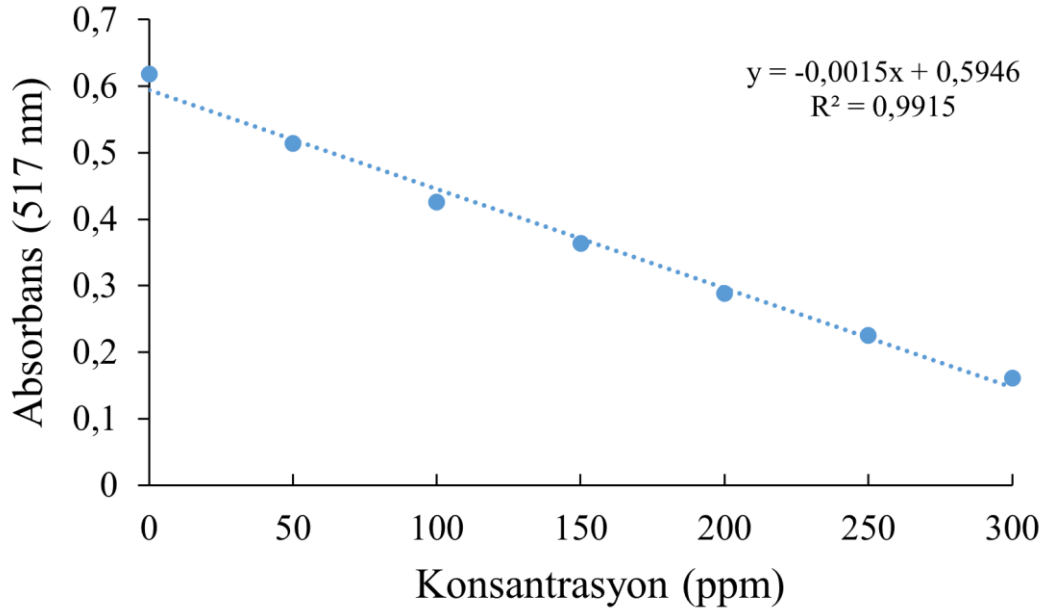
Zeytin yaprağı ekstraktı ve saflaştırılan materyalin antioksidan kapasiteleri, ABTS^{•+} katyon radikali giderme yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Troloks standart çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve örneklerin antioksidan aktiviteleri mg Troloks eşdeğeri/g ekstrakt (mg TE/g) cinsinden hesaplanmıştır. Kullanılan Troloks standart çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon doğrusu yüksek bir korelasyon göstermiş ($R^2 = 0,9914$) ve yöntem doğrusal bir yanıt vermiştir. Şekil 4.13'te ABTS^{•+} katyon radikali giderme aktivitesine yönelik oluşturulan kalibrasyon eğrisi sunulmuştur. Ölçüm sonuçlarına göre, zeytin yaprağı ekstraktının ABTS^{•+} radikal giderme kapasitesi $43,23 \pm 1,23$ mg TE/g, saflaştırılan materyal örneğinin ise $124,37 \pm 1,45$ mg TE/g olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan materyal, zeytin yaprağı ekstraktına kıyasla daha yüksek bir katyon radikali giderme aktivitesi göstermiştir.



Şekil 4.13. ABTS^{•+} Aktivitesi için Oluşturulan Troloks Kalibrasyon Eğrisi

4.7.2. DPPH• Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Sonuçları

Zeytin yaprağı ekstraktı ve saflaştırılan materyalin serbest radikal giderme kapasiteleri, DPPH yöntemi ile değerlendirilmiştir. Troloks standart çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi yüksek doğrusal uyum göstermiştir ($R^2 = 0,9915$). Şekil 4.14'te DPPH• serbest radikal giderme aktivitesine yönelik Troloks standart çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, zeytin yaprağı ekstraktının DPPH• radikal giderme kapasitesi $56,21 \pm 1,28$ mg TE/g, saflaştırılan materyalin ise $107,99 \pm 0,93$ mg TE/g olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan materyal, ham ekstrakta kıyasla daha yüksek bir antioksidan kapasite göstermiştir.

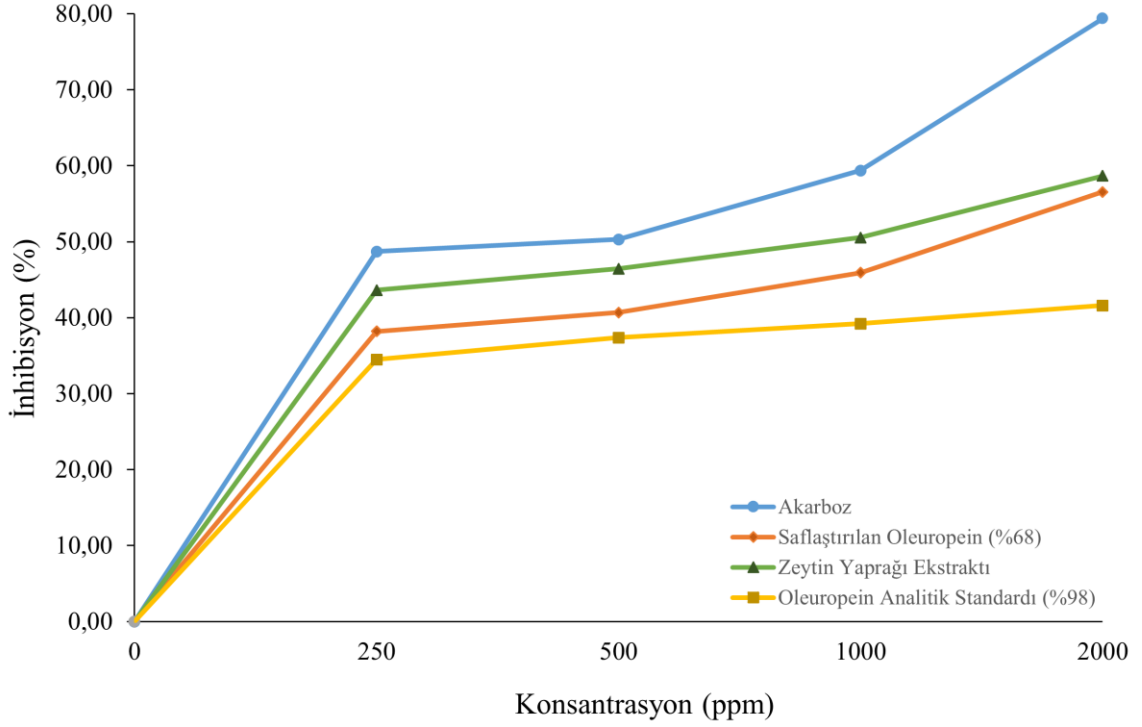


Şekil 4.14. DPPH• Aktivitesi için Oluşturulan Troloks Kalibrasyon Eğrisi

4.8. Oleuropeinin Antidiyabetik Etkisinin Belirlenmesi

4.8.1. α -Glukosidaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi

Zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılan materyal (%68,29), analitik OLP standardı (%98) ve pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun α -glukosidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri, 0–2000 ppm konsantrasyon aralığında değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.15'te sunulmuştur.



Şekil 4.15. Test Örneklerinin Farklı Konsantrasyonlardaki α -Glukosidaz İnhibisyonu (%)

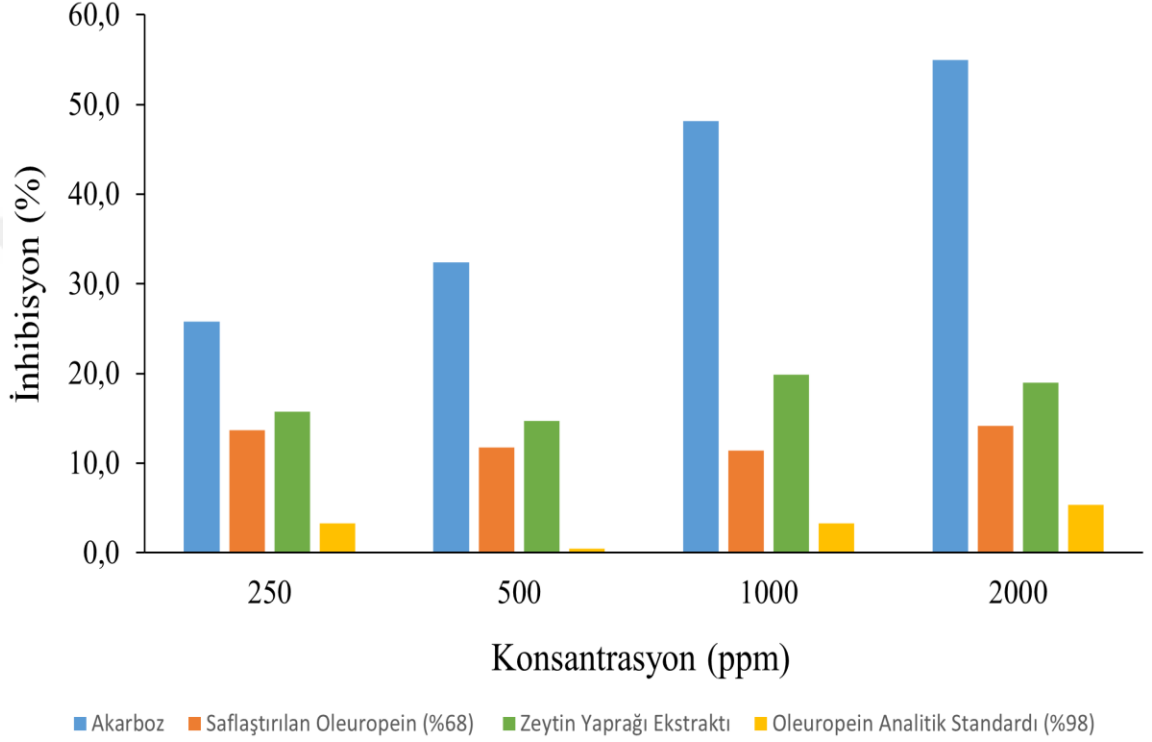
Şekil 4.15'te sunulan bulgulara göre, tüm örneklerde konsantrasyon arttıkça % inhibisyon değerlerinde artış gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubu olan akarboz, her konsantrasyonda en yüksek inhibisyon değerlerini göstermiştir. Akarbozun inhibisyon oranı 250 ppm'de %48,69 iken, bu oran 2000 ppm'de %79,38'e ulaşmıştır.

Zeytin yaprağı ekstraktı, 250 ppm konsantrasyonda %43,63, 2000 ppm'de ise %58,65 inhibisyon göstermiştir. Aynı konsantrasyon aralığında saflaştırılan materyalde %38,19–%56,55 aralığında, analitik OLP standardında ise %34,47–%41,59 aralığında inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

Tüm konsantrasyon düzeylerinde zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılan materyal (%68) ve de analitik OLP standardından (%98) daha yüksek inhibisyon göstermiştir. Bununla birlikte saflaştırılan materyalin analitik standarttan daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiş ve özellikle 1000 ve 2000 ppm konsantrasyonlarında bu fark daha belirgin hale gelmiştir.

4.8.2. α -Amilaz İnhibitör Etkisinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.16’da, α -amilaz enzimi üzerine uygulanan akarboz ve üç farklı test örneğinin 250, 500, 1000 ve 2000 ppm konsantrasyonlarındaki inhibitör etkileri yüzdesel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Test Örneklerinin Farklı Konsantrasyonlardaki α -Amilaz İnhibisyonu (%)

Sonuçlar, pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun, tüm konsantrasyonlarda en yüksek inhibitör etkiyi sergilediğini ve bu etkinin 2000 ppm düzeyinde %55,0 inhibisyona ulaştığını göstermektedir. Zeytin yapağı ekstraktı en yüksek inhibisyon oranını %19,8 ile 1000 ppm’de; saflastırılan materyal %19,0 ile 2000 ppm’de ve OLP analitik standardı %5,4 ile yine 2000 ppm’de göstermiştir. Akarboz konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranında belirgin bir artış gösterirken, test örneklerinin hiçbirinde doza bağımlı bir inhibisyon eğilimi gözlemlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen 35 farklı zeytin çeşidine ait yapraklarda OLP miktarı belirlenmiş, OLP için ekstraksiyon ve saflaştırma süreçleri optimize edilmiştir. Ayrıca TPC miktarı belirlenmiş, antioksidan ve antidiyabetik aktiviteler değerlendirilmiştir.

Kurutma sıcaklığı, yapraklar biyoaktif bileşikleri üzerindeki etkileri açısından önemli bir parametredir (Al Juhaime ve ark., 2018). Zeytin yaprakları gibi yan ürünleri fermantasyon ve oksidatif dönüşümü önlemek için çalışmalardan önce sıklıkla kurutulur (Castillo-Luna ve ark., 2023). Bu çalışmada zeytin yaprakları kurutma işlemine tabi tutulmuş, ardından nem oranları belirlenmiştir. Numunelerin ortalama nem içeriklerinin %44,26 ile %51,10 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Lama-Muñoz ve arkadaşları (2019) çalışmasında, zeytin yapraklarının nem içeriğinin %41,1 ile %49,7 arasında değiştiğini bildirilmiştir. Bu bulgu, çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan kromatografik koşullar, OLP'nin kantitatif analizi için yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlamıştır. Elde edilen kromatogramda OLP'ye ait pik, zeytin yaprağındaki diğer tüm piklerden iyi bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 4.2). Kalibrasyon eğrisi 3,125–200 ppm aralığında doğrusal bir ilişki sergilemiş olup, $R^2 > 0,9997$ belirlenmiştir. Bu durum, analitik yöntemin bu konsantrasyon aralığında tutarlı ölçümler yapabildiğini göstermektedir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı korelasyon katsayısı ve görsel inceleme ile doğrulanmıştır. Ayrıca artık kareler toplamının düşük olması (0,0306) yöntemin güvenilirliğini desteklemiştir. Analitik yöntemin duyarlılığı, LOD ve LOQ değerleri ile desteklenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,3871 ppm ve 1,2905 ppm olarak hesaplanmıştır. Literatürde OLP için bildirilen farklı çalışmalar LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 17,48 ppm ve 21,54 ppm (Martínez-Navarro ve ark., 2021) ve 1,66 ppm ve 5,03 ppm (Cifá ve ark., 2018) olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen daha düşük LOD ve LOQ değerleri, geliştirilen yöntemin yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada yapılan gün içi ve günler arası %RSD değerleri sırasıyla %0,27 ve %0,64 olarak bulunurken, geri kazanım oranları %97,54 ile %101,96 arasında değişmiştir. Ismaili ve arkadaşları (2016), gün içi ve günler arası %RSD değerlerinin sırasıyla %5,5 ve %7,5 ve geri kazanım oranlarının %90,0 ile %97,0 arasında olduğu bildirilmiştir. Ansari ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışmada, geri kazanım oranlarının %119,9 ile %120,1 arasında olduğu bildirilmiştir. Benzer bir şekilde Alqarni ve arkadaşları (2021) çalışmalarında geri kazanım oranı %98.40 ile %101.09 arasında hesaplanmıştır. Bu bulgular, geliştirilen yöntemin yüksek güvenilirlik ve analitik performans sunduğunu göstermektedir.

Zeytin yaprağı ekstraktının sağlık faydaları, temel olarak çeşitli fenolik bileşiklerin, özellikle de OLP'nin varlığından kaynaklanmaktadır (Khalil ve ark., 2023). Bu nedenle, OLP'nin ekstraksiyonu için basit, hızlı ve doğru bir yöntem geliştirmek hem farmasötik hem de fonksiyonel gıda alanlarında önemli bir adımdır (Giacometti ve ark., 2018). Bu çalışmada, OLP ekstraksiyonunu optimize etmek amacıyla UAE uygulanmış ve RSM çalışma tasarımı kullanılmıştır. RSM, çoklu değişkenlerin ve bu değişkenler arasındaki etkileşimlerin değerlendirilmesini sağlarken, aynı zamanda deneme sayısını azaltarak deneysel süreci daha verimli hale getirmektedir (Deng ve ark., 2017). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p < 0,05$) ve modelin OLP verimindeki varyasyonu %84,24 oranında açıkladığını gösterilmiştir. Etanol konsantrasyonu ve sıcaklık, OLP ekstraksiyonunda istatistiksel olarak anlamlı etkiler göstermiş ($p < 0,05$), ekstraksiyon süresi ise anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, özellikle çözücünün bileşimi ve sıcaklık gibi parametrelerin, ekstraksiyon verimi üzerinde süreden daha etkili olduğunu göstermektedir.

Ekstraksiyon çözücüsünün polaritesi, fenolik bileşiklerin etkin şekilde elde edilmesinde belirleyici bir faktördür. Ekstraksiyonlar için en yaygın kullanılan çözücüler etanol, metanol, aseton ve sulu etanol çözeltileridir (Cifá ve ark., 2018). Etanolün yeniden kullanılabilirlik, düşük toksisite ve gıda sınıfı olması gibi diğer çözücüler arasında çeşitli avantajlarından dolayı bu çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol kullanılmıştır (Lama-Muñoz ve ark., 2019). Bununla birlikte ekstraksiyon çözücüsünde az miktarda su bulunması, bitki matrisindeki hücre duvarlarının geçirgenliğini artırarak kütle transferini

hızlandırır ve ekstraksiyon verimini artırır (Taamalli ve ark., 2012). Çalışmada bu yaklaşıma uygun şekilde su-etanol karışımları farklı oranlarda test edilmiş ve optimum verim %87 etanol konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklıklar fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak difüzyon hızını artırabilir; böylece kütle transfer oranı artar (Siamandoura ve Tzia, 2023). Bu bağlamda, yapılan çalışmada sıcaklığın OLP verimi üzerindeki etkisinin anlamlı bulunması, literatür ile de uyum göstermektedir. Sıcaklık artışıyla birlikte OLP veriminde de artış gözlemlenmiş olup, bu durum çözünürlük ve difüzyon katsayısındaki artışla açıklanabilir (Cifá ve ark., 2018). Bu çalışmada RSM sonucu optimum sıcaklık 70°C bulunmuştur. Daha önce yapılan çalışmalar, OLP'nin nispeten düşük termal kararlılığını vurgulamıştır (Ahmad-Qasem ve ark., 2013; Dent ve ark., 2013; Stamatopoulos ve ark., 2013; Cifá ve ark., 2018). Ayrıca, zeytin yapraklarındaki fenolik bileşikler ve OLP verimi üzerine yapılan çeşitli çalışmalar, 60 °C'nin optimum ekstraksiyon sıcaklığı olduğunu ortaya koymuştur (Blasi ve ark., 2016; Iraklı ve ark., 2018). Literatürde bildirilen termal kararlılık sınırları göz önünde bulundurularak, 70°C üzerindeki sıcaklıkların fenolik bileşiklerin yapısal bozulmasına yol açabileceği dikkate alınmış ve bu nedenle doğrulama deneyleri 60°C ile sınırlandırılmıştır. Bu koşullarda $48,71 \pm 0,20$ mg/g OLP verimi elde edilmiş ve modelin öngördüğü değere (49,32 mg/g) çok yakın sonuçlar alınmıştır.

Ultrasonik ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için, örnek çeşitliliğini sabit tutmak amacıyla Hamza Çelebi çeşidine ait yaz mevsiminde toplanan yapraklar kullanılmıştır. Bu yaklaşım, ekstraksiyon koşullarının biyokimyasal içerikten ziyade proses parametrelerine dayalı olarak optimize edilmesini sağlamıştır. Ancak, çalışmanın genelinde en yüksek OLP miktarı, aynı çeşidin kışın toplanan örneklerinde elde edilmiştir ($80,29 \pm 1,83$ mg/g). Yine de RSM sonucunda elde edilen maksimum OLP verimi ($48,71 \pm 0,20$ mg/g), literatürde bildirilen pek çok ekstraksiyon yönteminden daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Cifá ve arkadaşları (2018) çalışmasında %70 etanol ve 120 dakika yapılan UAE sonucunda maksimum 39,2 mg/g ve ME yöntemi ile ise 27,8 mg/g verim bildirilmiştir. Giacometti ve arkadaşları (2018), ultrasonik prob kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada yalnızca 13,38 mg/g OLP elde etmiş; Siamandoura ve Tzia (2023), 60 °C ve 30 dk UAE yönteminde %70 etanol içeren çözelti ile $19,89 \pm 1,08$ mg/g OLP bildirmişlerdir. SE'de 37,84 mg/g (Şahin ve ark., 2011) verim değeri rapor edilmiş,

ME çalışmalarında ise OLP veriminin 13 mg/g (Ansari ve ark., 2011) ile 19,30 mg/g (Benincasa ve ark., 2019) arasında değiştiği bildirilmiştir. MAE’da elde edilen OLP verimi ise 72,08 mg/g düzeyine ulaşmıştır (Di Meo ve ark., 2022). SFE-CO₂, metanol gibi yardımcı çözücülerin kullanıldığı koşullarda maksimum OLP verimi 14,26 mg/g olarak bildirilmiştir (Şahin ve ark., 2011), ancak bazı çalışmalarda bu değer 1,90 mg/g seviyesinde kalmıştır (Kyriakoudi ve ark., 2024). Buna karşılık, bu çalışmada ultrasonik banyo kullanılarak optimize edilen ekstraksiyon koşullarında elde edilen $48,71 \pm 0,20$ mg/g OLP verimi hem klasik yöntemler hem de modern ekstraksiyon teknikleriyle bildirilen birçok sonuçtan daha yüksek düzeydedir. Ancak burada ekstraksiyon çalışmaları öncesi başlangıç materyalindeki OLP düzeylerinin de dikkate alınması gerekmektedir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular ultrasonik ekstraksiyonun optimize edilmiş koşullar altında yüksek verim sağlayabilen, güvenilir ve çevre dostu bir teknik olduğunu desteklemektedir.

Farklı zeytin çeşitlerine ait yapraklarda belirlenen OLP ve TPC içerikleri sırasıyla 15,22 mg/g ile 80,29 mg/g ve 42,98 mg GAE/g ile 49,42 mg GAE/g arasında değişmekte olup, çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Zeytin yapraklarının fenolik profili; zeytin çeşidi, çevresel koşullar (iklim, toprak, coğrafi konum), rakım ve hasat sonrası uygulamalar gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu unsurlar, yapraklardaki biyoaktif bileşiklerin miktar ve bileşimini doğrudan şekillendirerek, fenolik içerikte çeşitler arası belirgin farklılıklara yol açabilmektedir (Zhang ve ark., 2022; Irakli ve ark., 2018). Bu çalışmada, Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen 35 farklı zeytin çeşidine ait yapraklar, aynı çevresel koşullar, rakım ve mevsim dikkate alınarak toplanmış; benzer şekilde kurutulup muhafaza edilmiştir. Bu ortak koşullar altında elde edilen farklılıkların büyük ölçüde genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgu, zeytin çeşitleri arasında hem OLP birikimi hem de TPC miktarı açısından doğal varyasyonlar bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Özellikle Hamza Çelebi çeşidi, en yüksek OLP düzeyine sahipken, en yüksek TPC değeri Çilli çeşidinde ve sonrasında Hamza Çelebi çeşidinde gözlemlenmiştir. Buna karşılık Tavşan Yüreği çeşidinde ise hem OLP miktarı hem de TPC içeriği anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca yapılan korelasyon analizinde, OLP ve TPC

içerikleri arasında pozitif yönlü orta düzeyde bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ($r = 0,620, p < 0,001$). Bu sonuç, OLP düzeyinin tahmini için TPC analizinin, özellikle tarama çalışmaları açısından pratik ve etkili bir alternatif olabileceğini öngörmektedir. Elde edilen bulgular, OLP açısından zengin çeşitlerin belirlenmesinin, bu bileşiği hedefleyen fonksiyonel gıda ve farmasötik ürün geliştirme süreçleri açısından stratejik önem taşıdığını göstermektedir. Özellikle yerel veya ticari önemi yüksek bazı çeşitlerin hem OLP hem de TPC profili bakımından avantajlı olduğu saptanmış ve bu yönüyle öne çıkmıştır.

Bitkilerde kimyasal bileşiklerin mevsimsel değişimi, sekonder metabolitlerin biyosentezi, stabilitesi ve yıkımı ile ilişkili yaygın bir durumdur. (Wang ve ark., 2019). Tüm bitkiler, biyosentetik aktivitenin değişken aşamalarından geçmekte; bu süreçte ikincil metabolitler büyümenin farklı evrelerinde nitel ve nicel değişikliklere uğramaktadır (Şahin ve ark., 2012). Bu doğrultuda, bu çalışmada Hamza Çelebi çeşidine ait zeytin yapraklarında OLP ve TPC içerikleri mevsimsel olarak karşılaştırılmıştır. Ocak ayında toplanan örneklerde OLP içeriği $80,29 \pm 1,83$ mg/g, TPC içeriği ise $49,21 \pm 0,02$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Buna karşılık temmuz ayında toplanan örneklerde ise OLP içeriği $48,62 \pm 0,20$ mg/g ve TPC içeriği $42,96 \pm 0,01$ mg GAE/g olarak ölçülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, her iki parametre açısından da mevsimler arasında anlamlı düzeyde fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Ocak ayında toplanan yapraklar hem OLP hem de TPC içeriği bakımından temmuz ayında toplananlara kıyasla daha yüksek değerlere sahiptir. Benzer şekilde Hashemi ve arkadaşları (2010), ocak ayında hasat edilen yapraklarda OLP içeriğinin yaz aylarına kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmiştir.

Zun-Qiu ve arkadaşları (2015) ise 29 farklı zeytin çeşidini kapsayan bir çalışmada, OLP ve TPC içeriklerinin ocak ayında en yüksek düzeye ulaştığını; özellikle meyvenin hızlı gelişim gösterdiği mayıs–temmuz döneminde ise OLP içeriğinin belirgin bir şekilde azaldığını belirtmiştir. Bu sonuçlar, optimum fenolik bileşik verimi açısından hasat zamanının önemini vurgulamaktadır.

Mevsimsel karşılaştırmalarda öne çıkan en dikkat çekici bulgulardan biri, Hamza Çelebi çeşidine ait zeytin yapraklarda kış mevsiminde toplanan örneklerde en yüksek OLP

içeriğine ($80,29 \pm 1,83$ mg/g) ve aynı mevsimde en yüksek ikinci TPC değerine ($49,21 \pm 0,02$ mg GAE/g) sahip olmasıdır. Buna karşın, yaz mevsiminde toplanan yapraklarında TPC içeriği ($42,96 \pm 0,01$ mg GAE/g), çalışmada yer alan ve kış mevsiminde toplanmış 35 farklı zeytin çeşidinden sonra en düşük değer olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, mevsimsel koşulların özellikle fenolik bileşikler üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu desteklemektedir. Bununla birlikte OLP içeriği açısından değerlendirildiğinde de kış döneminde hasat edilen yapraklarda, yaz döneminde toplanan yapraklara göre daha yüksek oranda OLP içeriği belirlenmiştir. Ayrıca Hamza Çelebi'nin yaz mevsiminde toplanan yapraklarındaki OLP miktarı ($48,62 \pm 0,20$ mg/g), yedi farklı zeytin çeşidinin (Butko, Çilli, Melkabazı, Erdek Yağlık, Uslu, Mavi ve Tavşan Yüreği) kış mevsiminde ulaştığı OLP değerlerinden bile daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, OLP birikiminin mevsimsel faktörlerle birlikte çeşide özgü genetik yapıyla da yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Sonuçlar zeytin yaprağı örneklerindeki TPC ve OLP düzeyleri üzerine mevsimsel değişikliklerin yanında genetik faktörlerin de baskın rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bu bulgu, yüksek OLP içeriğine sahip fonksiyonel çeşitlerin belirlenmesi ve yıl boyu verimli kullanımı açısından stratejik öneme sahiptir.

Ayrıca bu çalışmada Domat, Ayvalık Yağlık, Memecik ve Gemlik çeşitlerine ait zeytin ağaçlarından alınan bazal, orta ve apikal lokalizasyondaki yaprak örneklerinin OLP içerikleri değerlendirilmiştir. Apikal lokalizasyondan elde edilen yapraklarda ortalama OLP içeriği $76,84 \pm 8,56$ mg/g, orta lokalizasyonda $66,95 \pm 12,51$ mg/g ve bazal lokalizasyonda $68,79 \pm 12,32$ mg/g olarak belirlenmiştir. Sayısal olarak en yüksek OLP içeriği apikal lokalizasyondaki yapraklarda tespit edilmiş olsa da istatistiksel analizler bu farkın anlamlı olmadığını ortaya koymuştur ($p>0,05$).

Bununla birlikte, yapraklarda görece yüksek ortalama değer, bu bölgelerde ışık alımının ve metabolik aktivitenin daha yoğun olmasına bağlı olarak OLP biyosentezinin artabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Ancak gözlenen sayısal farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, söz konusu faktörlerin OLP birikimi üzerinde sınırlı etkisi olabileceğini veya diğer biyotik ve abiyotik faktörlerin bu etkiyi maskeliyor olabileceğini göstermektedir. Nitekim yaban mersini bitkisinde yapılan bir çalışmada, doğrudan güneş ışığına maruz kalan apikal yapraklarda, gölgede kalan bazal yapraklara kıyasla daha

yüksek fenolik bileşik içeriği ve flavonoid biyosentezine ilişkin genlerin daha fazla ifade edildiği bildirilmiştir (Jaakola ve ark., 2004). Bu bulgular, ışığın fenolik metabolizma üzerindeki uyarıcı etkisini ortaya koymakla birlikte, OLP farklı bir kimyasal sınıf olan sekoiridoit yapısında bir bileşik olduğundan, flavonoidlere özgü ışıkla indüklenen biyosentetik yollardan doğrudan etkilenmeyebilir. Dolayısıyla, apikal bölgelerdeki ışık şiddeti artışı OLP üretimi üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olabilir. Bu durum, tez çalışmasında lokalizasyonlara göre gözlenen, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıkları açıklayabilecek bir etken olarak değerlendirilebilir.

Çalışmada zeytin yaprağından OLP elde etmek için lipofilik bileşenlerin uzaklaştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve kolon kromatografisi yöntemleri uygulanmış, başlangıçta 975,12 mg OLP içeren zeytin yaprağı ekstraktı, uygulanan saflaştırma protokolü sonucunda %68,29 saflıkta ve %74,37 genel geri kazanım oranıyla 725,21 mg OLP elde edilmiştir.

Saflaştırma protokolü, hem yüksek saflıkta OLP elde edilmesini sağlamış hem de sürdürülebilirlik, ekonomik uygulanabilirlik ve toksikolojik güvenlik açısından daha önce yapılan birçok yaklaşıma göre avantaj sunmuştur. Atık yaprakların değerli biyoaktif bileşikler kaynağı olarak değerlendirilmesi, tarım ve gıda sektörlerinde sürdürülebilir üretimi destekleyen ve kaynak tüketimini azaltmayı hedefleyen döngüsel ve yeşil ekonomiye geçişle uyumlu bir yaklaşımdır (Kyriakoudi ve ark., 2024). Bu yönüyle çalışma, çevresel yükü azaltırken katma değeri yüksek ürünlerin üretimine katkı sağlamaktadır.

UAE, ekstraksiyon sürelerini kısaltma, çözücü tüketimini azaltma, aktif bileşiklerin geri kazanımını artırma (Irakli ve ark., 2018), orta düzeyde yatırım, düşük enerji maliyetleri gerektirme, sürdürülebilir bir alternatif olma (Siamandoura ve Tzia, 2023) ve geleneksel yöntemlere kıyasla iyileştirilmiş verimlilik sunma gibi avantajlara sahiptir (Jerman ve ark., 2010). Dolayısıyla, bu çalışmada kullanılan ultrasonik sistem hem verimlilik hem de sürdürülebilirlik açısından literatürle uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Bu yönüyle, literatürdeki belirtilen çalışmalara göre (Hassan ve ark., 2024; Topuz ve Bayram, 2022) kullanılan ekipman seçimi de sürdürülebilir üretim stratejilerine hizmet etmektedir.

Saflaştırma sürecinde tercih edilen çözücüler literatürde bildirilen yöntemlere (Andreadou ve ark., 2006; Hassan ve ark., 2024; Topuz ve Bayram, 2022; Zun-Qiu ve ark. 2015) göre daha çevre dostu ve düşük toksisiteye sahip olan çözücülerdir. Özellikle etanol ve su düşük toksisite ve gıda sınıfı olması (Lama-Muñoz ve ark., 2019) gibi diğer çözücüler arasında çeşitli avantajlarından dolayı bu çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada, hem sıvı-sıvı ekstraksiyon hem de kolon kromatografisi aşamalarında yürütücü olarak etil asetat kullanılmıştır. Gıda ve İlaç Dairesi'nin çözücü sınıflandırmasına göre etil asetat, düşük toksisiteye sahip çözücüler arasında yer almakta olup gıda ve farmasötik endüstrilerde kullanımı uygun kabul edilmektedir. Etil asetatın seçici ekstraksiyon kapasitesi, yeşil kimya ilkeleri doğrultusunda sahip olduğu düşük toksisite ve çevre dostu özellikleri (Naleini ve ark., 2015), bu çalışmada çözücü olarak tercih edilmesinde belirleyici olmuştur. Ayrıca etanol ve etil asetat çözücülerinin geri dönüştürülebilir nitelikte olması, çözücü geri kazanım ve atıkların azaltılması açısından sürecin sürdürülebilirliğini artırmaktadır.

Khemakhem ve arkadaşları (2017) çalışmalarında, saflaştırma amacıyla mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon gibi ileri membran teknolojilerine başvururken literatürdeki diğer çalışmalarda ise makro gözenekli reçine sistemleri kullanılmıştır (Li ve ark., 2011; Liu ve ark., 2020). Ancak bu tür yöntemler, yüksek geri kazanım sağlasa da her laboratuvarında bulunamayacak özel ekipmanlar gerektirmesi ve yüksek maliyetli olmaları nedeniyle uygulama açısından kısıtlar barındırmaktadır.

Bu çalışmada saflaştırma sürecine entegre edilen lipofilik bileşenlerin uzaklaştırılması ve sıvı-sıvı ekstraksiyon adımları; düşük donanım gereksinimi, uygulanabilirlik ve yüksek seçicilik gibi özellikleriyle, OLP saflaştırmasında pratik ve etkili bir alternatif sunmaktadır.

Literatürde OLP üzerine çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, bu bileşiğin sistematik ve kantitatif olarak saflaştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Elde edilen veriler, OLP'nin saflaştırma süreçlerine ışık tutabilir niteliktedir. Zun-Qiu ve arkadaşları (2015) silika jel kolon kromatografisi uygulamasında %96,54 saflık ve %78,49 verim elde ettiklerini bildirmiştir. Benzer şekilde, Li ve arkadaşları (2011), makro gözenekli LSA-21 reçinesi ile OLP içeriğini 120 g/kg'dan 902 g/kg'a çıkararak %85,6 oranında geri kazanım

sağlamışlardır. Bu yöntemler, yüksek verim sunmakla birlikte donanım gereksinimi, maliyet, çevresel güvenlik ve uygulanabilirlik açısından belirli sınırlamalar içermektedir. Buna karşılık, bu çalışmada geliştirilen saflaştırma protokolü; düşük toksisite, çevresel güvenlik, çözücü geri kazanımı, donanım erişilebilirliği ve ölçeklenebilirlik gibi yeşil kimya ilkeleriyle uyumlu parametreleriyle öne çıkmakta ve sürdürülebilir üretim yaklaşımlarına katkı sunmaktadır.

Gıda endüstrilerinde antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu büyük önem taşımaktadır. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek hücreleri oksidatif strese karşı korur (Shirzad ve ark., 2017). Bitki ekstraktlarının antioksidan özellikleri, özellikle yağ bazlı gıdalarda lipid oksidasyonunu engelleyerek istenmeyen tatların ve toksik bileşiklerin oluşumunu önlemesi açısından önem taşır. Bu yönüyle, zeytin yaprağı ekstraktı gibi doğal kaynaklar, güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle sentetik antioksidanlara çevre dostu bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Kyriakoudi ve ark., 2024). Bu nedenlerden ötürü bu çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktı ve saflaştırılan materyalin antioksidan aktiviteleri hem DPPH[•] serbest radikal giderme yöntemi hem de ABTS^{•+} katyon radikali giderme yöntemi ile değerlendirilmiştir. Her iki yöntem sonucunda elde edilen değerler, test edilen örneklerin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının DPPH analizinden elde edilen antioksidan kapasitesi $56,21 \pm 1,28$ mg TE/g, ABTS analizinden elde edilen değeri ise $43,23 \pm 1,23$ mg TE/g olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan materyalde ise bu değerlerin sırasıyla $107,99 \pm 0,93$ mg TE/g (DPPH) ve $124,37 \pm 1,45$ mg TE/g (ABTS) olduğu görülmüştür.

Literatürde yer alan çalışmalar da benzer şekilde hem OLP'nin hem de zeytin yaprağı ekstraktlarının yüksek antioksidan kapasite gösterdiğini doğrulamaktadır. Martín-García ve arkadaşları (2022), yedi farklı zeytin çeşidinin yaprak ekstraktlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, DPPH antioksidan kapasite değerlerinin $33,03 - 46,8$ mg TE/g, ABTS analizinde ise $26,92 - 35,7$ mg TE/g aralığında değiştiği raporlanmıştır. Her iki analiz yöntemi bakımından en yüksek antioksidan kapasite Changlot Real çeşidinde tespit edilmiştir. Bu bulgular, zeytin yaprağının antioksidan etkinliğinin genotipik farklılıklara bağlı olarak çeşitler arasında anlamlı düzeyde değişebileceğini göstermektedir.

Zun-Qiu ve arkadaşları (2015) tarafından yürütülen bir diğer çalışmada, zeytin yapraklarından yüksek saflıkta OLP izole edilmiş ve bu bileşiğin DPPH ve ABTS analizlerine karşı yüksek düzeyde radikal giderme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. 100 ppm konsantrasyondaki OLP örneği ile yapılan analizlerde DPPH giderme oranı $92,81 \pm 0,12$, ABTS giderme oranı ise $98,90 \pm 0,015$ olarak rapor edilmiştir. Ancak 60 $\mu\text{g/ml}$ 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda etkinliğin anlamlı bir artış göstermediği belirtilmiş, bunun da OLP'nin maksimum radikal giderme kapasitesine erken konsantrasyonlarda ulaştığını belirtmişlerdir.

Lama-Muñoz ve arkadaşları (2020) ise ticari amaçla yetiştirilen Arbequina, Picual ve Royal çeşitleri ile 600 metre rakıma sahip bölgeden toplanan üç yabani zeytin çeşidine ait yaprakların antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Ticari çeşitler arasında antioksidan kapasite bakımından anlamlı bir fark tespit edilmezken, yabani çeşitler içerisinde Wild 2 olarak adlandırılan çeşit, DPPH analizinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek antioksidan kapasite göstermiştir. Bu örnekte ölçülen 431,8 mmol TE/kg değeri, çalışmadaki en yüksek antioksidan kapasite olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada, saflaştırılan materyalin hem DPPH hem de ABTS analizlerinden elde edilen antioksidan kapasite değerlerinin, zeytin yaprağı ekstraktına kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, OLP'nin serbest radikaller üzerindeki etkinliğinin, yapısındaki serbest hidroksil gruplarının pozisyonu, moleküler sterik yapısı ve oluşan aroksil radikalın stabilitesi gibi spesifik yapısal özelliklerinden kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır (Zun-Qiu ve ark., 2015).

Diyabetteki patolojik durumları yönetmek için çeşitli tedaviler kullanılmaktadır. Yaşam tarzı değişiklikleri, yan etki riski olmaksızın glisemik kontrolün sağlanmasına katkı sunmasına rağmen, bireylerin uzun vadede bu değişimlere uyum sağlaması çoğu zaman güç olmaktadır. Diğer yandan, ilaç bazlı tedaviler ise esas olarak yan etkileri ve maliyetleri nedeniyle tam olarak tatmin edici değildir (Haguet ve ark., 2023). Bu nedenle, glikoz homeostazını korumak ve insülin duyarlılığını iyileştirmek için daha az yan etkiye sahip yeni antidiyabetik biyoaktif bileşiklerin araştırılması giderek artan bir bilimsel ilgi görmektedir (Alkhateeb ve ark., 2022).

Günümüzde, kan glukoz düzeylerini düşürmek amacıyla en yaygın kullanılan ilaç gruplarından biri α -glukosidaz inhibitörleridir. α -glukosidaz enzimi, ince bağırsağın fırçamsı kenarında bulunur ve kompleks karbonhidratların parçalanarak monosakkaritlere dönüştürülmesinden sorumludur. (Mansour ve ark., 2023). Akarboz, vogliboz ve miglitol olmak üzere α -glukosidaz aktivitesini inhibe ederek etki eden antidiyabetik ilaçlar mevcuttur, ancak bu ilaçların sürekli kullanımı genellikle gastrointestinal semptomlar ve karaciğer toksisitesi gibi istenmeyen yan etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle, daha güvenli alternatifler olarak, istenmeyen etkileri minimal düzeyde olan doğal α -glukosidaz inhibitörlerinin keşfi büyük önem taşımaktadır (AlShaal ve ark., 2020).

Araştırmacılar, bazı tıbbi bitkilerin ve fonksiyonel gıdaların α -glukosidaz ve α -amilaz enzimlerini etkili bir şekilde inhibe ederek diyabet gelişimini önleyebileceğini göstermiştir (Mwakalukwa ve ark., 2020). Bu çalışmada, zeytin yaprağından saflaştırılan materyalin α -glukosidaz ve α -amilaz inhibitör etkisinin değerlendirilmesi, bu bileşiğin olası antidiyabetik mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir. α -glukosidaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon analizlerinde, pozitif kontrol grubu olan akarbozun tüm konsantrasyonlarda en yüksek inhibisyon oranlarına ulaştığı görülmüştür. Akarbozun α -glukosidaz enzimini 250 ppm’de %48,69, 2000 ppm’de ise %79,38 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Buna karşılık, zeytin yaprağı ekstraktı (%4,87 OLP) aynı konsantrasyonlarda sırasıyla %43,63 ve %58,65 inhibisyon değerlerine ulaşmıştır. Saflaştırılan materyal (%68,29 OLP) %38,19 - %56,55, analitik OLP standardı (%98 OLP) ise %34,47-%41,59 arasında değişen inhibisyon oranları göstermiştir. α -glukosidaz enzimi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak artan bir inhibisyon etkisi gözlenmiş; zeytin yaprağı ekstraktı, saflaştırılmış OLP’nin ve analitik OLP standardına kıyasla daha yüksek inhibitör aktivite sergilemiştir. Bu durum, ekstraktın sadece OLP değil, aynı zamanda hidroksitirozol ve flavonoidler gibi diğer fenolik bileşenleri içermesiyle açıklanabilir.

Nitekim literatürde, hidroksitirozol ve OLP’nin α -glukosidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinin güçlü olduğu; yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) değerlerinin sırasıyla 150 μ M (81,1 ppm) ve 400 μ M (216,2 ppm) olduğu belirtilmiştir (Hadrich ve ark., 2015). AlShaal ve arkadaşları (2020) da 3850 ppm konsantrasyondaki zeytin yaprağı

ekstraktının %81,34 oranında α -glukosidaz inhibisyonu sağladığını ve bu etkinin hidroksitirozol ve OLP içeriğiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Benzer şekilde, α -amilaz enzimi üzerine yapılan inhibisyon analizlerinde, pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz, tüm konsantrasyonlarda en yüksek inhibitör etkiyi sergilemiş olup, 2000 ppm düzeyinde %55,0 inhibisyona ulaşmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı en yüksek inhibisyon oranını %19,8 ile 1000 ppm’de; saflaştırılan materyal %19,0 ile 2000 ppm’de ve OLP analitik standardı %5,4 ile yine 2000 ppm’de göstermiştir. Akarboz konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranında belirgin bir artış gösterirken, test örneklerinin hiçbirinde doza bağımlı bir inhibisyon eğilimi gözlemlenmemiştir. Zeytin yaprağı bileşenlerinin α -amilaz enzimine karşı zayıf bir inhibitör etkisi mevcuttur. Bu sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir. Hadrich ve arkadaşları (2015), OLP’nin en yüksek konsantrasyonda dahi %10’un altında α -amilaz inhibisyonu sağladığını belirtmiştir. Ayrıca, Kerimi ve arkadaşları (2019) tarafından yürütülen insan çalışmaları, OLP takviyesinin nişasta gibi kompleks karbonhidratların sindirimi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını, ancak düşük doz sakkaroz alımında postprandiyal glukoz yanıtını azaltabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, OLP α -amilaz inhibitör etkisinin zayıf olduğunu, ancak α -glukozidaz inhibisyonu yoluyla postprandiyal hipergliseminin kontrolünde etkili olabileceğini göstermektedir.

Zeytin yaprağı ekstraktı, içerdiği fenolik bileşiklerin sinerjik etkisi sayesinde α -glukosidaz inhibisyonunda yüksek biyolojik aktivite sergilemekte ve bu özelliği ile doğal bir antidiyabetik ajan olarak öne çıkmaktadır. Ancak α -amilaz üzerindeki düşük inhibitör etki, bu ekstraktların nişasta açısından zengin diyetlerle birlikte kullanıldığında kan şekeri regülasyonunda sınırlı kalabileceğini göstermektedir. OLP’nin antidiyabetik etkisi yalnızca enzim inhibisyonu ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda güçlü antioksidan özellikleriyle de ilişkilendirilmektedir. Diyabette hiperglisemiye bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi oksidatif stresi artırmakta, bu durum ise pankreatik β -hücre fonksiyonlarının bozulmasına, insülin sinyal yollarının baskılanmasına ve kronik komplikasyonların gelişimine neden olabilmektedir. Bu nedenle, antioksidan özellik gösteren doğal bileşiklerin glisemik kontrolü destekleyici bir rol oynayabileceği belirtilmektedir. Bu çalışmada, saflaştırılan materyalin, zeytin yaprağı ekstraktına kıyasla

daha yüksek radikal giderme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Literatürde de OLP'nin, serbest radikalleri etkisiz hale getirme, oksidatif stresi azaltma ve hücrel antioksidan savunma sistemlerini modüle etme kapasitesiyle diyabete karşı koruyucu rol üstlenebileceği bildirilmiştir (Zun-Qiu ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2022). Dolayısıyla, OLP'nin antidiyabetik etkisinin sadece α -glukosidaz ve α -amilaz inhibisyonu ile değil, aynı zamanda oksidatif stresin baskılanması gibi diğer mekanizmalarla da ilişkili olduğu söylenebilir. Bu çok yönlü etki profili, OLP'yi diyabetin önlenmesi ve yönetimi açısından önemli bir fitokimyasal aday haline getirmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Uygulanan saflaştırma protokolü, yalnızca yüksek saflıkta OLP elde edilmesini sağlamakla kalmamış, aynı zamanda sürdürülebilirlik, ekonomik uygulanabilirlik ve toksikolojik güvenlik açısından literatürde bildirilen birçok yönteme kıyasla önemli avantajlar sunmuştur. Bu kapsamda, zeytin yaprağından OLP elde etmek amacıyla lipofilik bileşenlerin uzaklaştırılması, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve kolon kromatografisi basamaklarını içeren bir saflaştırma stratejisi uygulanmıştır. Saflaştırma protokolü sonucunda %68,29 saflıkta ve %74,37 genel geri kazanım oranıyla OLP elde edilmiştir. Saflaştırılan materyal, yüksek düzeyde antioksidan özellikler göstermiştir. Ayrıca hem zeytin yaprağı ekstraktı hem de saflaştırılmış OLP, karbonhidrat sindiriminden sorumlu olan α -glukosidaz enzimi üzerinde konsantrasyona bağlı inhibitör etkiler sergilemiştir. Bu bulgular, OLP'nin postprandiyal kan şekeri kontrolüne iki yönlü katkı sağlayabileceğini göstermektedir: bir yandan α -glukosidaz enzimini inhibe ederek glukoz emilimini geciktirmekte, diğer yandan ise oksidatif stresi baskılayarak diyabetin patofizyolojisine karşı koruyucu rol üstlenmektedir. Söz konusu bu çift mekanizmalı etki profili, OLP'nin potansiyel terapötik değerini artırmakta ve onu diyabetin önlenmesi ve komplikasyonlarının yönetimi açısından umut verici doğal bir ajan haline getirmektedir. Bu çalışmada ulaşılan önemli noktalar ışığında aşağıda maddelerde belirtilen hususlar sonraki çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır.

- Zeytin yaprakları, OLP açısından zengin ve ekonomik bir biyoaktif kaynak olduğundan, tarım atığı olarak değerlendirilmek yerine, fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesinde aktif bir hammadde olarak kullanılabilir.
- Ham madde standardizasyonu için, farklı zeytin çeşitlerine ve mevsimlere göre OLP içerik düzeyleri haritalanmalı, maksimum verim sağlayan hasat zamanları ve çeşitler belirlenmelidir.
- Ekstraksiyon ve saflaştırma süreçleri çevre dostu, toksikolojik olarak güvenli ve sürdürülebilir yöntemlerle optimize edilmeli ve endüstriyel ölçekte üretim için çalışmalara öncelik verilmelidir.

- OLP'nin doğal antioksidan ve α -glukosidaz inhibitör özelliklerinden yararlanılarak, fonksiyonel gıda, besin takviyesi ve doğal koruyucu içerikli ürünlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar arttırılmalıdır.
- OLP'nin diğer bitkisel bileşiklerle (hidroksitirozol, flavonoidler vb.) sinerjik etkileri araştırılmalı; bu kombinasyonların glisemik kontrol ve antioksidan kapasite üzerindeki etkileri değerlendirilmelidir.



KAYNAKLAR

- Abdallah I M, Al-Shami K M, Yang E, Wang J, Guillaume C, Kaddoumi A. Oleuropein-rich olive leaf extract attenuates neuroinflammation in the Alzheimer's disease mouse model. *ACS Chemical Neuroscience*. 2022;13(7):1002–1013.
- Abiola D, Sathyapalan T, Hepburn D. Management of type 1 and type 2 diabetes requiring insulin. *Prescriber*. 2016;27(9):50–57.
- Adeniyi A, Asase A, Ekpe P K, Asitoakor B K, Adu-Gyamfi A, Awekor P Y. Ethnobotanical study of medicinal plants from Ghana; confirmation of ethnobotanical uses, and review of biological and toxicological studies on medicinal plants used in Apra Hills Sacred Grove. *Journal of Herbal Medicine*. 2018;14:76–87.
- Agati G, Cerovic Z G, Pinelli P, Tattini M. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environmental and Experimental Botany*. 2011;73:3–9.
- Agrawal K, Melliou E, Li X, Pedersen T L, Wang S C, Magiatis P, Holt R R. Oleocanthal-rich extra virgin olive oil demonstrates acute anti-platelet effects in healthy men in a randomized trial. *Journal of Functional Foods*. 2017;36:84–93.
- Ahamad J, Toufeeq I, Khan M A, Ameen M S M, Anwer E T, Uthirapathy S, Almansour K, Ahmad J. Oleuropein: A natural antioxidant molecule in the treatment of metabolic syndrome. *Phytotherapy Research*. 2019;33(12):3112–3128.
- Ahmadpour E, Toulabi T, Yadegarinia D, Yarahmadi S, Mohammadi R, Keyvanfar A. Efficacy of olive leaves extract on the outcomes of hospitalized COVID-19 patients: A randomized, triple-blinded clinical trial. *Explore*. 2023;19(4):536–543.
- Ahmad-Qasem M H, Cánovas J, Barrajón-Catalán E, Carreres J E, Micol V, García-Pérez J V. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(26):6190–6198.

Al Juhaimi F, Özcan M M, Uslu N, Ghafoor K, Babiker E E, Adiamo O Q, Alsawmahi O N. The effects of conventional heating on phenolic compounds and antioxidant activities of olive leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55:4204–4211.

Al-Azzawie HF, Alhamdani MSS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*. 2006;78(12):1371–1377.

Alqarni M H, Salkini M A, Alam P, Alanazi M T, Abdel-Kader M S, El Sohafy S M. Assessment of seasonal variation of the bioactive oleuropein in *Olea europaea* L. leaves cultivated in Saudi Arabia. *Acta Chromatographica*. 2021.

Alkhateeb HH, Kaplan NM, Al-Duais M. Understanding the mechanism underlie the antidiabetic activity of oleuropein using ex-vivo approach. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*. 2022;11(1):146.

AlShaal S, Karabet F, Daghestani M. Evaluation the antioxidant activity of Syrian Ficus and olive leaf extracts and their inhibitory effects on α -glucosidase in vitro. *Moroccan Journal of Chemistry*. 2020;8(1):J-Chem.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(Supplement_1):S81–S90.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2014. *Diabetes Care*. 2014;37(Supplement_1):S14–S80.

Anderson E, Durstine J L. Physical activity, exercise, and chronic diseases: A brief review. *Sports Medicine and Health Science*. 2019;1(1):3–10.

Andreadou I, Iliodromitis E K, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis A L, Kamber E, Tsantili-Kakoulidou A, Kremastinos D T. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *The Journal of Nutrition*. 2006;136(8):2213–2219.

Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis E K, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos D T. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;42(3):549–558.

Ansari M, Kazemipour M, Fathi S. Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2011;8:38–47.

Anwar S, Saleem H, Khurshid U, Ansari S Y, Alghamdi S, Al-Khulaidi A W A, Awadh Ali N A. Comparative phytochemical composition, oleuropein quantification, antioxidant and cytotoxic properties of *Olea europaea* L. leaves. *Natural Product Research*. 2022;37(6):1023–1029.

Balwan W K, Kour S. Lifestyle Diseases: The Link between Modern Lifestyle and threat to public health. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2021;7(4):179–184.

Benincasa C, Santoro I, Nardi M, Cassano A, Sindona G. Eco-friendly extraction and characterisation of nutraceuticals from olive leaves. *Molecules*. 2019;24(19):3481.

Blasi F, Urbani E, Simonetti M S, Chiesi C, Cossignani L. Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves collected from different Italian cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2016;89:202–207.

Carrara M, Kelly M T, Griffin L, Margout-Jantac D. Development and cross-validation of simple HPLC-fluorescence and UPLC-MS-UV methods for rapid determination of oleuropein in olive leaves. *Phytochemical Analysis*. 2023;35(3):476–482.

Carrera-González M P, Ramírez-Expósito M J, Mayas M D, Martínez-Martos J M. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in Food Science & Technology*. 2013;31(2):92–99.

Castejón ML, Rosillo MÁ, Montoya T, González-Benjumea A, Fernández-Bolaños JM, Alarcón-de-la-Lastra C. Oleuropein down-regulated IL-1 β -induced inflammation and oxidative stress in human synovial fibroblast cell line SW982. *Food & Function*. 2017;8(5):1890–1898.

Castillo-Luna A, Miho H, Ledesma-Escobar C A, Priego-Capote F. Comparison of Drying Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Olive-Tree Materials. *Foods*. 2023;12(14):2684.

Ceriello A, Prattichizzo F. Variability of risk factors and diabetes complications. *Cardiovascular Diabetology*. 2021;20(1):101.

Chigurupati S, Alharbi F S, Almahmoud S, Aldubayan M, Almoshari Y, Vijayabalan S, Venugopal V. Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Olea europaea* L. ethanolic leaves extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 2021;14(11):103422.

Cifá D, Skrt M, Pittia P, Di Mattia C, Poklar Ulrih N. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*. 2018;6(4):1128–1137.

Cole J B, Florez J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*. 2020;16(7):377–390.

Covas M I, Nyyssönen K, Poulsen H E, Kaikkonen J, Zunft H J F, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumlér H, EUROLIVE Study Group. The effect of phenolic compounds in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2006;145(5):333–341.

Cör Andrejč D, Butinar B, Knez Ž, Tomažič K, Knez Marevci M. The effect of drying methods and extraction techniques on oleuropein content in olive leaves. *Plants*. 2022;11(7):865.

Da Porto A, Brosolo G, Casarsa V, Bulfone L, Scandolin L, Catena C, Sechi LA. The pivotal role of oleuropein in the anti-diabetic action of the Mediterranean diet: A concise review. *Pharmaceutics*. 2021;14(1):40.

Darenskaya M A, Kolesnikova L A, Kolesnikov S I. Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;171(2):179–189.

De Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Cutfield WS. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: A randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One*. 2013;8(3):e57622.

De Castro M L, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(16):2383–2389.

Deng J, Xu Z, Xiang C, Liu J, Zhou L, Li T, Yang Z, Ding C. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;37:328–334.

Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, Brncic M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*. 2013;51(1):84.

Deshmukh C D, Jain A, Nahata B. Diabetes mellitus: a review. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 2015;3(3):224–230.

Dhatariya K K, Glaser N S, Codner E, Umpierrez G E. Diabetic ketoacidosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):40.

Di Meo M C, De Cristofaro G A, Imperatore R, Rocco M, Giaquinto D, Palladino A, Varricchio E. Microwave-assisted extraction of olive leaf from five Italian cultivars: Effects of harvest-time and extraction conditions on phenolic compounds and in vitro antioxidant properties. *ACS Food Science & Technology*. 2022;2(1):31–40.

Dong H Q, Li M, Zhu F, Liu F L, Huang J B. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*. 2012;130(2):261–266.

Egan A M, Dinneen S F. What is diabetes?. *Medicine*. 2019;47(1):1–4.

Fayez N, Khalil W, Abdel-Sattar E, Abdel-Fattah A F M. In vitro and in vivo assessment of the anti-inflammatory activity of olive leaf extract in rats. *Inflammopharmacology*. 2023;31(3):1529–1538.

Filardo S, Roberto M, Di Risola D, Mosca L, Di Pietro M, Sessa R. *Olea europaea* L-derived secoiridoids: Beneficial health effects and potential therapeutic approaches. *Pharmacology & Therapeutics*. 2024:108595.

Fowler M J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*. 2011;29(3):116–122.

Fujiwara Y, Tsukahara C, Ikeda N, Sone Y, Ishikawa T, Ichi I, Aoki Y. Oleuropein improves insulin resistance in skeletal muscle by promoting the translocation of GLUT4. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2017;61(3):196–202.

Gallego R, Suárez-Montenegro Z J, Ibáñez E, Herrero M, Valdés A, Cifuentes A. In vitro neuroprotective potential and lipidomics study of olive leaves extracts enriched in triterpenoids. *Frontiers in Nutrition*. 2021;8:769218.

Ghomari O, Sounni F, Massaoudi Y, Ghanam J, Kaitouni L B D, Merzouki M, Benlemlih M. Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports*. 2019;23:e00347.

Giacometti J, Žauhar G, Žuvić M. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of major phenolic compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.) using response surface methodology. *Foods*. 2018;7(9):149.

Gonzalez-Ortega R, Di Mattia C D, Pittia P, Poklar Ulrih N. Effect of heat treatment on phenolic composition and radical scavenging activity of olive leaf extract at different pH conditions: a spectroscopic and kinetic study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2023;103(4):2047–2056.

Hadrich F, Bouallagui Z, Junkyu H, Isoda H, Sayadi S. The α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of hydroxytyrosol and oleuropein. *Journal of Oleo Science*. 2015;64(8):835–843.

Hadrich F, Mahmoudi A, Bouallagui Z, Feki I, Isoda H, Feve B, Sayadi S. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2016;252:54–60.

Haguet Q, Le Joubioux F, Chavanelle V, Groult H, Schoonjans N, Langhi C, Maugard T. Inhibitory potential of α -amylase, α -glucosidase, and pancreatic lipase by a formulation of five plant extracts: TOTUM-63. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3652.

Hanganu D, Niculae M, Ielciu I, Olah N K, Munteanu M, Burtescu R, Ștefan R, Olar L, Pall E, Andrei S, Bungau S, Benedec D, Vlase L, Oniga I. Chemical profile, cytotoxic activity and oxidative stress reduction of different *Syringa vulgaris* L. extracts. *Molecules*. 2021;26(11):3104.

Hashemi P, Delfan B, Ghiasvand A R, Alborzi M, Raeisi F. A study of the effects of cultivation variety, collection time, and climate on the amount of oleuropein in olive leaves. *Acta Chromatographica*. 2010;22(1):133–140.

Hassan J, Koohi M K, Sharifzadeh A, Babaei M, Moghadam S, Pourshaban Sharestani A. Extraction and purification of oleuropein from olive leaves. *Natural Product Research*. 2024:1–9.

Huang W C, Liou C J, Shen S C, Hu S, Chao J C, Huang C H, Wu S J. Oleuropein attenuates inflammation and regulates immune responses in a 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis mouse model. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2022.

Hussein D, El-Shiekh R A, Saber F R, Attia M M, Mousa M R, Atta A H, Mouneir S M. Unravelling the anthelmintic bioactives from *Jasminum grandiflorum* L. subsp. *floribundum* adopting in vitro biological assessment. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;275:114083.

Imran M, Nadeem M, Gilani S A, Khan S, Sajid M W, Amir R M. Antitumor perspectives of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol: Recent updates. *Journal of Food Science*. 2018;83(7):1781–1791.

International Council for Harmonisation (ICH). Harmonised tripartite guideline: validation for analytical procedures, text and methodology Q2 (R1). Geneva. 2005.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 10th edition. Brussels: IDF Publications; 2021

Inzucchi S E, Bergenstal R M, Buse J B, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters A L, Tsapas A, Wender R, Matthews D R. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(1):140–149.

Irakli M, Chatzopoulou P, Ekateriniadou L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*. 2018;124:382–388.

Ismaili A, Heydari R, Rezaeepour R. Monitoring the oleuropein content of olive leaves and fruits using ultrasound- and salt-assisted liquid–liquid extraction optimized by response surface methodology and high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2016;39(2):405–411.

Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*. 2004;218:721–728.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(19):8798–8804.

Jerman T, Trebše P, Vodopivec B M. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2010;123(1):175–182.

Kabbash E M, Abdel-Shakour Z T, El-Ahmady S H, Wink M, Ayoub I M. Comparative metabolic profiling of olive leaf extracts from twelve different cultivars collected in both fruiting and flowering seasons. *Scientific Reports*. 2023;13(1):612.

Kabbash E M, Ayoub I M, Gad H A, Abdel-Shakour Z T, El-Ahmady S H. Quality assessment of leaf extracts of 12 olive cultivars and impact of seasonal variation based on UV spectroscopy and phytochemical content using multivariate analyses. *Phytochemical Analysis*. 2021;32(6):932–941.

Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson B J, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):1–17.

Kerimi A, Nyambe-Silavwe H, Pyner A, Oladele E, Gauer JS, Stevens Y, Williamson G. Nutritional implications of olives and sugar: Attenuation of post-prandial glucose spikes in healthy volunteers by inhibition of sucrose hydrolysis and glucose transport by oleuropein. *European Journal of Nutrition*. 2019;58:1315–1330.

Khalil A A, Rahman M M, Rauf A, Islam M R, Manna S J, Khan A A, Rebezov M, Thiruvengadam M, Simal-Gandara J. Oleuropein: Chemistry, extraction techniques and nutraceutical perspectives—An update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;1–22.

Khemakhem I, Gargouri O D, Dhouib A, Ayadi M A, Bouaziz M. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. *Separation and Purification Technology*. 2017;172:310–317.

Khursheed R, Singh S K, Wadhwa S, Kapoor B, Gulati M, Kumar R, Kalra S, Mani M, Gupta G, Dua K. Treatment strategies against diabetes: Success so far and challenges ahead. *European Journal of Pharmacology*. 2019;862:172625.

Kiani A K, Dhuli K, Donato K, Aquilanti B, Velluti V, Matera G, Mancinelli R, Shoaib M, Dini L, Bertelli M. Main nutritional deficiencies. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2022;63(2 Suppl 3):E93.

Kyriakoudi A, Mourtzinou I, Tyśkiewicz K, Milovanovic S. An Eco-Friendly Supercritical CO₂ Recovery of Value-Added Extracts from *Olea europaea* Leaves. *Foods*. 2024;13(12):1836.

Lama-Muñoz A, del Mar Contreras M, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*. 2020;320:126626.

Lama-Muñoz A, del Mar Contreras M, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. Valorization of olive mill leaves through ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry*, 2019;314, 126218.

Lankatillake C, Luo S, Flavel M, Lenon G B, Gill H, Huynh T, Dias D A. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*. 2021;17:1–19.

- Lee O H, Lee B Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*. 2010;101(10):3751–3754.
- Li C, Zheng Y, Wang X, Feng S, Di D. Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L. (olive) leaves using macroporous resin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011;91(15):2826–2834.
- Liao X, Hong Y, Chen Z. Identification and quantification of the bioactive components in *Osmanthus fragrans* roots by HPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2021;11(3):299–307.
- Liu B, Liu J, Huang D, Pei D, Di D. Separation and purification of hydroxytyrosol and oleuropein from *Olea europaea* L. (olive) leaves using macroporous resins and a novel solvent system. *Journal of Separation Science*. 2020;43(13):2619–2625.
- Liu L, Ahn K S, Shanmugam M K, Wang H, Shen H, Arfuso F, Chinnathambi A, Alharbi S A, Chang Y, Sethi G. Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor–negative breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(3):4504–4513.
- Liu S, Li D, Huang B, Chen Y, Lu X, Wang Y. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;149(1):263–269.
- Liu Y, Dai W, Ye S. The olive constituent oleuropein exerts nephritic protective effects on diabetic nephropathy in db/db mice. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2022;128(2):455–462.
- Liu YN, Jung JH, Park H, Kim H. Olive leaf extract suppresses messenger RNA expression of proinflammatory cytokines and enhances insulin receptor substrate 1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet–induced diabetes. *Nutrition Research*. 2014;34(5):450–457.

- Luo S, Jiang X, Jia L, Tan C, Li M, Yang Q, Huang J, Ding C. In vivo and in vitro antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*. 2019;24(4):704.
- Magyari-Pavel I Z, Moacă E A, Avram Ș, Diaconeasa Z, Haidu D, Ștefănuț M N, Dehelean C A, Danciu C. Antioxidant extracts from Greek and Spanish olive leaves: antimicrobial, anticancer and antiangiogenic effects. *Antioxidants*. 2024;13(7):774.
- Malliou F, Andreadou I, Gonzalez FJ, Lazou A, Xepapadaki E, Vallianou I, Konstandi M. The olive constituent oleuropein, as a PPAR α agonist, markedly reduces serum triglycerides. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018;59:17–28.
- Marcovecchio M L. Complications of acute and chronic hyperglycemia. *US Endocrinology*. 2017;13(1):17–21.
- Marín-Peñalver J J, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, del Cañizo-Gómez F J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2016;7(17):354.
- Martínez-Navarro E M, Cebrián-Tarancón C, Moratalla-López N, Lorenzo C, Alonso G L, Salinas R M. Development and validation of an HPLC-DAD method for determination of oleuropein and other bioactive compounds in olive leaf by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(4):1447–1453.
- Martín-García B, De Montijo-Prieto S, Jiménez-Valera M, Carrasco-Pancorbo A, Ruiz-Bravo A, Verardo V, Gómez-Caravaca A M. Comparative extraction of phenolic compounds from olive leaves using a sonotrode and an ultrasonic bath and the evaluation of both antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants*. 2022;11(3):558.
- Martiny T R, Dotto G L, Raghavan V, de Moraes C C, da Rosa G S. Freezing effect on the oleuropein content of olive leaves extracts obtained from microwave-assisted extraction. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2022;19(10):10375–10380.

Mir-Cerdà A, Granados M, Saurina J, Sentellas S. Olive tree leaves as a great source of phenolic compounds: Comprehensive profiling of NADES extracts. *Food Chemistry*. 2024;140042.

Mosele J I, Martín-Peláez S, Macià A, Farràs M, Valls R M, Catalán Ú, Motilva M J. Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: In vitro and in vivo approaches. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2014;58(9):1809–1819.

Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation*. 2016;133(2):187–225.

Mwakalukwa R, Amen Y, Nagata M, Shimizu K. Postprandial hyperglycemia lowering effect of the isolated compounds from olive mill wastes – An inhibitory activity and kinetics studies on α -glucosidase and α -amylase enzymes. *ACS Omega*. 2020;5(32):20070–20079.

Nakamura T. The birth of nutrition and the systematization of learning. *Japan Nutrition*. 2022;13–27.

Naleini N, Rahimi M, Heydari R. Oleuropein extraction using microfluidic system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2015;92:1–6.

Odeyemi S, Bradley G. Medicinal plants used for the traditional management of diabetes in the Eastern Cape, South Africa: pharmacology and toxicology. *Molecules*. 2018;23(11):2759.

Omar S H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*. 2010;78(2):133–154.

Otero D M, Oliveira F M, Lorini A, Antunes B D F, Oliveira R M, Zambiasi R C. Oleuropein: Methods for extraction, purifying and applying. *Revista Ceres*. 2020;67:315–329.

Ölmez E, Vural K, Gok S, Ozturk Z, Kayalar H, Ayhan S, Var A. Olive leaf extract improves the atherogenic lipid profile in rats fed a high cholesterol diet. *Phytotherapy Research*. 2015;29(10):1652–1657.

Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate–, high fat–fed rats. *The Journal of Nutrition*. 2010;140(5):946–953.

Purwanta M L A, Dewi N P A P A, Saraswati M R. Probiotics for type 2 diabetes mellitus: an anti-diabetic intervention to see beyond the gut. *Indonesia Journal of Biomedical Science*. 2017;11(2):11–18.

Ranalli A, Contento S, Lucera L, Di Febo M, Marchegiani D, Di Fonzo V. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54:434–440.

Re, R, Pellegrini, N, Proteggente, A, Pannala, A, Yang, M, Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999;26(9–10):1231–1237.

Saisho Y. Use of diabetes treatment satisfaction questionnaire in diabetes care: importance of patient-reported outcomes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018;15(5):947.

Sanz M, De Simón B F, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz A M, Hernández T, Estrella I, Pinto E. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*. 2012;47(7):905–918.

Scheen A J. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes & Metabolism*. 1998;24(4):311–320.

Seino Y, Yabe D, Takami A, Niemoeller E, Takagi H. Long-term safety of once-daily lixisenatide in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: GetGoal-Mono-Japan. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2015;29(8):1304–1309.

Shirzad H, Niknam V, Taheri M, Ebrahimzadeh H. Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from olive leaves: A nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. *Journal of Food Science and Technology*. 2017;54(8):2361–2371.

Siamandoura P, Tzia C. Comparative study of novel methods for olive leaf phenolic compound extraction using NADES as solvents. *Molecules*. 2023;28(1):353.

Singh A K, Raj V, Keshari A K, Rai A, Kumar P, Rawat A, Maurya R, Saha S. Isolated mangiferin and naringenin exert antidiabetic effect via PPAR γ /GLUT4 dual agonistic action with strong metabolic regulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;280:33–44.

Stamatopoulos K, Chatzilazarou A, Katsoyannos E. Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times. *Foods (Basel, Switzerland)*. 2013;3(1):66–81.

Şahin S, Bilgin M, Dramur M U. Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods. *Separation Science and Technology*. 2011;46(11):1829–1837.

Şahin S, Bilgin M. Study on oleuropein extraction from olive tree (*Olea europaea*) leaves by means of SFE: Comparison of water and ethanol as co-solvent. *Separation Science and Technology*. 2012;47(16):2391–2398.

Şahin S, Malik N S A, Perez J L, Brockington J E. Seasonal changes of individual phenolic compounds in leaves of twenty olive cultivars grown in Texas. *Journal of Agricultural Science and Technology. B*. 2012;2(2B):242.

Şimsek T, Erbaş M, Büyük B, Pala C, Şahin H, Altınışik B. Prevention of rocuronium induced mast cell activation with prophylactic oleuropein rich diet in anesthetized rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2018;33(11):954–963.

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. *Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA) 2019*. Yayın No: 1132. Ankara; 2019.

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. *Türkiye Diyabet Programı 2023–2027*. Yayın No: 1289. Ankara; 2023.

Taamalli A, Arraez-Roman D, Ibanez E, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS². *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(3):791–798.

Tenore G C, Caruso D, D’Avino M, Buonomo G, Caruso G, Ciampaglia R, Schiano E, Maisto M, Novellino E. A pilot screening of agro-food waste products as sources of nutraceutical formulations to improve simulated postprandial glycaemia and insulinaemia in healthy subjects. *Nutrients*. 2020;12(5):1292.

Toledano Y, Hadar E, Hod M. Safety of insulin analogues as compared with human insulin in pregnancy. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2016;15(7):963–973.

Topuz S, Bayram M. Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022;46(6):e15697.

Uzel R A. Effect of extraction method and extraction solvent on recovery of phenolic compounds from olive leaves in Kemalpaşa-İzmir (Turkey): Oleuropein recovery as a case example. *Separation Science and Technology*. 2018;53(10):1531–1539.

Verma S, Gupta M, Popli H, Aggarwal G. Diabetes mellitus treatment using herbal drugs. *International Journal of Phytomedicine*. 2018;10(1):1–10.

Vissers M N, Zock P L, Roodenburg A J, Leenen R, Katan M B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(3):409–417.

Wang B, Qu J, Feng S, Chen T, Yuan M, Huang Y, Zhang R, Ding C. Seasonal variations in the chemical composition of Liangshan olive leaves and their antioxidant and anticancer activities. *Foods*. 2019;8(12):657.

World Health Organization. *Classification of diabetes mellitus*. Geneva: World Health Organization; 2019.

Wu L, Velander P, Liu D, Xu B. Olive component oleuropein promotes β -cell insulin secretion and protects β -cells from amylin amyloid-induced cytotoxicity. *Biochemistry*. 2017;56(38):5035–5039.

Wu Y, Chu Y, Yang Q, Li M, Yu M, Deng R, Zhou Z, Fan E. Response surface methodology optimised solvothermal system enables an efficient extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Phytochemical Analysis*. 2021;32(6):1074–1081.

Xynos N, Papaefstathiou G, Psychis M, Argyropoulou A, Aligiannis N, Skaltsounis A L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2012;67:89–93.

Yoon L, Liu Y N, Park H, Kim H S. Olive leaf extract elevates hepatic PPAR α mRNA expression and improves serum lipid profiles in ovariectomized rats. *Journal of Medicinal Food*. 2015;18(7):738–744.

Yu H, Liu P, Tang H, Jing J, Lv X, Chen L, Jiang L, Xu J, Li J. Oleuropein, a natural extract from plants, offers neuroprotection in focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2016;775:113–119.

Zhang C, Zhang J, Xin X, Zhu S, Niu E, Wu Q, Wang S, Liu D. Changes in phytochemical profiles and biological activity of olive leaves treated by two drying methods. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:854680.

Zhang Z, Zhao H, Wang A. Oleuropein alleviates gestational diabetes mellitus by activating AMPK signaling. *Endocrine Connections*. 2021;10:45–53.

Zheng S, Wang Y, Fang J, Geng R, Li M, Zhao Y, Zhou H, Tong T. Oleuropein ameliorates advanced stage of type 2 diabetes in db/db mice by regulating gut microbiota. *Nutrients*. 2021;13(7):2131.

Zorić N, Kosalec I. The antimicrobial activities of oleuropein and hydroxytyrosol. In: *Promising Antimicrobials from Natural Products*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p.75–89.

Zun-Qiu W, Gui-Zhou Y, Qing-Ping Z, You-Jun J, Kai-Yu T, Hua-Ping C, Mei-Lan L, Qian-Ming H. Purification, dynamic changes and antioxidant activities of oleuropein in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food Biochemistry*. 2015;39(5):566–574.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Muhammed	Uyruğu	T.C.
Soyadı	TÜRKMEN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Edebali Anadolu Lisesi	2015
Ön Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2021
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2022
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Gerontoloji Bölümü	2025
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2025

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dil Deneyimi

Yabancı Dilleri	Sınav türü
İngilizce	YÖKDİL

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Ülkemizde Yetiştirilen Bazı Zeytin Çeşitlerine Ait Yaprakların Oleuropein Miktarlarının Belirlenmesi, Saflaştırılması, <i>In Vitro</i> Antioksidan ve Antidiyabetik Etkilerin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi	2022-2025
Tarihsel ve Tescilli Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Çölyak Hastalığına Yol Açan İmmünojenik Epitoplar Bakımından Karşılaştırılması	1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Destekleme Programı- TÜBİTAK	2023-2025
Bitkisel Süt Bazlı Kefir Üretiminde Kinoa, Susam, Pirinç ve Yulaf Sütünün Kullanım Olanaklarının Araştırılması	2209-A- Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı- TÜBİTAK	2020-2022