

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE’DE FARKLI BÖLGELERDEN ALINAN BAZI SIZMA
ZEYTİNYAĞI ÖRNEKLERİNİN ANTİOKSİDAN VE HÜCRE KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sakou SEYDOU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE’DE FARKLI BÖLGELERDEN ALINAN BAZI SIZMA ZEYTİNYAĞI ÖRNEKLERİNİN ANTİOKSİDAN VE HÜCRE KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Sakou SEYDOU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Eş Danışman: Prof. Dr. Mücahit Taha ÖZKAYA

Sızma zeytinyağlar, Akdeniz diyetinde önemli bir yere sahiptir. Sızma zeytinyağı tüketimi insan sağlığı üzerinde çeşitli faydalı etkilerle ilişkilendirilmektedir. Bu faydalı etkiler, doymamış yağ asitleri ve fenolik bileşikler bakımından zengin kimyasal bileşimlerine atfedilebilir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen 5 sızma zeytinyağı örneğinin (Ayvalık, İzmir sofralık, Kilis yağlık, Tavşan yüreği ve Memecik) antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerini incelemektir. İlk olarak, farklı sızma zeytinyağı örneklerinin fenolik fraksiyonları, ekstraksiyon çözücüsü olarak %80 metanol kullanılarak ekstre edilmiştir. Farklı fenolik fraksiyonların toplam fenolik bileşikleri ve flavonoidleri belirlenmiştir. Farklı natürel sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin belirlenmesi sırasında Folin Ciocalteu ve alüminyum klorür kolorimetrik yöntemiyle yapılmıştır. Daha sonra farklı sızma zeytinyağı ekstraktlarının antioksidan ve sitoprotektif aktiviteleri değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite DPPH ve ABTS antiradikal yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Öte yandan, sızma zeytinyağı örneklerinin diyabetik komplikasyonlarda rol oynayan bir enzim olan aldol redüktaz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. İzmir Sofralık, Kilis yağlık ve Memecik örneklerinin fenolik bileşik içerikleri sırasıyla; 180.12, 157.76 ve 122.04 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. En yüksek flavonoid bileşik içerikleri Kilis yağlık, Memecik ve Ayvalık örneklerinden elde edilmiştir ve bu değerler sırasıyla; 273.06, 244.93 ve 176.82 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0.82 ve 1.20 mg/mL olan Kilis yağlık ve İzmir sofralığının, DPPH radikalinin indirgenmesinde daha etkili olduğu bulunmuştur. ABTS radikalinin indirgenmesinde Memecik ve Kilis yağlık sırasıyla 0,38 ve 0,56 mg/mL IC₅₀ değerleri ile en iyi antiradikal aktiviteyi göstermiştir. Kilis yağlık, İzmir sofralık, Memecik ve Ayvalık örnekleri SOD aktivitesini sırasıyla %52.29, %43.67, %27.87 ve %19.14 oranında artırırken Tavşan yüreği özütünde inhibisyon etki göstermiştir. Tüm EVOO'lar GPX aktivitesini inhibe etmiş, Kilis yağlık ve İzmir sofralık sırasıyla %49,58 ve %39,69 ile en yüksek inhibisyon değerine ulaştığı bulunmuştur. Tavşan yüreği ve Memecik örnekleri sırasıyla %34,61 ve %30,38 ile GST üzerinde en yüksek inhibisyon değerine sahiptir. İzmir sofralık, Kilis yağlık ve Memecik örneklerinin aldol redüktaz aktivitesi üzerine inhibitör etkileri sırasıyla %79,96, %82,60 ve %84,38 olarak belirlenmiştir. Memecik, Tavşan yüreği ve Kilis yağlık örnekleri Vero hücre hatlarını hidrojen peroksidin indüklediği strese karşı sırasıyla, %12,41, %12,51, %20,78, %21,3 oranlarında koruduğu gösterilmiştir.

Haziran 2023, 144 sayfa

Anhatar kelimeler : Sızma zeytinyağı, fenolik bileşikler, oksidatif stres, antioksidan enzimler, hücre koruyucu etkisi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND CELL PROTECTIVE EFFECTS OF SOME EXTRA VIRGIN OLIVE OIL SAMPLES TAKEN FROM DIFFERENT REGIONS IN TURKEY

Sakou SEYDOU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mucahit Taha ÖZKAYA

The extra virgin olive oils occupy an important place in the Mediterranean diet. The consumption of extra virgin olive oils is associated with several beneficial effects on human health. These beneficial effects are attributable to their chemical composition rich in unsaturated fatty acids and phenolic compounds. The aim of this work is to study the antioxidant and cell protective properties of 5 extra virgin olive oil samples (Ayvalık, İzmir sofralık, kilis yağlık, Tavşan yüreği and Memecik) obtained from different regions of Turkey. Initially the phenolic fractions of different extra virgin olive oil samples were extracted using 80% methanol as extraction solvent. The total phenolic compounds and flavonoids of different phenolic fractions were determined. The determination of the total phenolic and flavonoid content of the different extra virgin olive oil samples was done by Folin Ciocalteu and the colorimetric method with aluminum chloride. Then the antioxidant and cytoprotective activities of the different extra virgin olive oil extracts were evaluated. The antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS antiradical methods. The effects of the different extra virgin olive oil samples on glutathione peroxidase (GPx), glutathione-s-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) were determined. On the other hand, the effects of the extra virgin olive oil samples were evaluated on aldose reductase, an enzyme involved in the complications of diabetes. İzmir Sofralık, kilis yağlık and Memecik samples showed the highest contents of total phenolic compounds with 180,12; 157,76 and 122,04 mg GAE/g respectively. Regarding the determination of total flavonoid compounds, the samples kilis yağlık, Memecik and Ayvalık showed the highest contents with 273.06, 244.93 and 176.82 mg GAE/g respectively. With IC₅₀ values of 0.82 and 1.20 mg/mL Kilis yağlık and İzmir sofralık were more efficient on the reduction of DPPH radical. On the reduction of ABTS radical Memecik and Kilis yağlık showed the best antiradical activities with IC₅₀ values of 0.38 and 0.56 mg/mL respectively. Kilis yağlık, İzmir sofralık, Memecik and Ayvalık samples increased SOD activity by 52.29%, 43.67%, 27.87% and 19.14%, respectively, while Tavşan yüreği showed inhibition effect. All EVOOs inhibited GPX activity, Kilis oil and İzmir table samples showed the highest percentage of inhibition with 49.58% and 39.69%, respectively. However, Tavşan yüreği and Memecik samples had the highest percentage of inhibition on GST with 34.61% and 30.38%, respectively. İzmir sofralık, Kilis yağlık and Memecik samples had the best inhibition values on aldose reductase activity with 79.96%, 82.60% and 84.38%, respectively. Memecik, Tavşan yüreği and Kilis yağlık samples protected the Vero cells lines against hydrogen peroxide induced stress with 12.41%, 12.51%, 20.78% and 21.3%, respectively.

June 2023, 144 pages

Key words: Extra virgin olive oil, phenolic compounds, oxidative stress, antioxidant enzymes, cell protective effect.

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı sağlamayı kabul ettiği için kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a içtenlikle teşekkür ederim. Bu çalışmayı gerçekleştirirken değerli bilgi birikiminiz, yardımseverliğiniz ve samimiyetinizle, her zaman pozitif ve anlayışlı yaklaşımınızla gelişimime büyük katkı sağladınız. Bu tez süresince hem akademik hem de sosyal olarak tüm karşıladığım sorunlarda her zaman yanımda oldunuz. Bu tezin başarısı için gösterilen çabalarınız için teşekkür ederim.

Çok değerli katkılarındam dolayı ve tezimin Eş Danışmanı olmayı kabul ettiği için Hocam sayın Prof. Dr. Mücahit Taha Özkaya'ya teşekkür ederim.

Tezim için TİK üyesi olduğu ve teşvik edici bir şekilde beni yönlendirdiği için değerli hocam Sayın Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK'a teşekkür ederim. Tezimin diğer TİK üyesi olan Prof. Dr. Gülçin SAGDIÇOĞLU'na desteğinden ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar deneyler ve tez yazım sırasında her türlü destek ve yardımı esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan sayın Dr. Okan ONAR'a ve laboratuvar arkadaşım Gül KOCA'ya sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Eğitim hayatım boyunca benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili annem Amina BOUNZOGOU ve Rahmetli babam Seydou ADAMOU'ya şükürleirimi sunuyorum.

Sevgili eşim Mariama BOUREİMA'ya uzun yıllar boyunca yokluğumda gösterdiği sabır ve destek için teşekkür etmek için kullanılan kelime yetersiz buluyorum. İki çocuğu babaları olmadan büyütmek zor bir görev ama sen başardın. Senin yardımın olmadan bu çalışma tamamlanamaz. Sevgili çocuklarım İman ve Rayan'a çok teşekkür ederim.

Doktora bursiyeri olduğum YURT DIŞI TÜRKLER ve AKRABA TOPLULUKLAR BAŞKANLIĞI'na her daim desteklerinden dolayı sonsuz şükranlarımı ve memnuniyetlerimi iletmek isterim

Sakou SEYDOU
Ankara, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZGELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Oksidatif Stres	4
2.2 Reaktif Oksijen Türleri	5
2.2.1 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları	6
2.2.1.1 Endojen kaynaklar	6
2.2.1.2 Ekzojen Kaynaklar	7
2.3 Reaktif Oksijen Türlerinin Biyokimyası ve Özellikleri.....	8
2.3.1 Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$).....	8
2.3.2 Hidrojen peroksit	8
2.3.3 Hidroksil radikali	9
2.4 Oksidatif Stresin Biyolojik Makromoleküller Üzerindeki Etkileri	10
2.4.1 Nükleik asitler üzerindeki etkileri	10
2.4.1.1 RNA üzerindeki etkileri.....	11
2.4.1.2 DNA üzerindeki etkileri.....	13
2.4.2 Zar lipidlerinin üzerindeki etkileri.....	14
2.4.3 Proteinlerin üzerindeki etkileri.....	16
2.5 Oksidatif Stresle Bağlantılı Patolojiler	18
2.5.1 Ateroskleroz.....	18
2.5.2 Parkinson hastalığı.....	19
2.5.3 Alzheimer hastalığı	20
2.5.4 Kanser	20
2.5.5 Diyabetes mellitus (şeker hastalığı)	22
2.6 Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Savunma Mekanizmaları.....	25
2.6.1 Enzimatik mekanizmalar	26

2.6.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)	27
2.6.1.2 Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9)	30
2.6.1.3 Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)	31
2.6.1.4 Glutasyon-S-transferaz (GST)	31
2.6.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar	32
2.6.2.1 C vitamini	32
2.6.2.2 E vitamini	33
2.6.2.3 Glutasyon	34
2.6.2.4 Selenyum	35
2.6.2.5 Doğal antioksidanlar	35
2.6.2.5.1 Karotenoidler	35
2.6.2.5.2 Fenolik bileşikler	36
2.6.2.5.3 Flavonoidler	37
2.7 Reaktif Oksijen Türlerinin Fizyolojik Etkileri)	37
2.8 Zeytinyağı	38
2.8.1 Zeytin ağacının coğrafi dağılımı.	38
2.8.2 Zeytinyağlarının sınıflandırılması ve özellikleri (IOC 2019).	40
2.8.2.1 Sızma zeytinyağlar	40
2.8.2.1.1 Natürel sızma zeytinyağı.....	40
2.8.2.1.2 Rafine zeytinyağlar.	41
2.8.3 Zeytinyağının kimyasal bileşimi	44
2.8.3.1 Sabunlaşılabilir fraksiyonu	44
2.8.3.1.1 Yağ asitler	44
2.8.3.2 Sabunlaştırılmayan kısım.....	46
2.8.3.2.1 Tokoferoller	46
2.8.3.2.2 Oleokantal.....	47
2.8.3.2.3 Steroller	47
2.8.3.2.4 Aromatik bileşikler	49
2.8.3.2.5 Pigmentler	50
2.8.3.2.6 Fenolik bileşenler	50
2.8.4 Fenolik bileşiklerin emilimi.....	53
2.8.5 Sızma zeytinyağı ve zeytinyağının biyolojik etkileri	54
2.8.5.1 Antioksidan etkileri.....	54
2.8.5.2 Antibakteriyal etkileri	55

2.8.5.3 Antikanser etkileri	56
2.8.5.4 Kalp-damar hastalıklarının üzerindeki etkileri	56
2.8.5.5 Anti-diyabetik etkileri.....	57
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	59
3.1 Materyal	59
3.1.1 Sızma zeytinyağ örnekleri	59
3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler	60
3.2 Yöntem	61
3.2.1 Sızma zeytinyağı örneklerin ekstraksiyonu	61
3.2.2 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik içeriğinin tayini.....	63
3.2.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid madde içeriğinin tayini	64
3.2.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin radikal temizlenmesine etkilerinin analizi.....	64
3.2.4.1 DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	64
3.2.4.2 ABTS radikal temizleme aktivitesi	65
3.2.5 Sızma zeytinyağı örneklerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin analizi.....	65
3.2.5.1 Sitozol izolasyonu	65
3.2.5.2 Protein tayini	66
3.2.5.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine etkilerinin analizi.....	67
3.2.5.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon peroksidaz (Gpx) enzim aktivitesi üzerine etkilerinin analizi.....	67
3.2.5.5 Sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi üzerine etkilerinin analizi	68
3.2.6 Sızma zeytinyağı örneklerinin aldoz redüktaz (AR) aktivitesi üzerine etkilerinin analizi	68
3.2.6.1 Aldoz redüktaz izolasyonu.....	68
3.2.6.2 Protein tayini	70
3.2.6.3 Aldoz redüktaz enzimin aktivite tayini	71
3.2.7 Sızma zeytinyağın hücre koruyucu etkilerinin belirlenmesi	71
3.2.8 İstatistiksel analizler	74
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	75
4.1 Sızma zeytinyağı örneklerinin ekstraksiyon verimi.....	75
4.2 Toplam fenolik içerik sonuçları	75
4.3 Toplam flavonoit içerik sonuçları.....	77

4.4 Serbest radikal temizleme aktivitesi.....	78
4.4.1 DPPH radikal temizleme aktivitesi	78
4.4.2 ABTS radikal temizleme aktivitesi.....	80
4.4.3 DPPH ve ABTS radikal süperme aktiviteleri arasındaki korelasyonlar.....	82
4.5 Sızma zeytinyağı örneklerinin antioksidan enzimler üzerindeki etkisi	85
4.5.1 Protein tayini.....	85
4.5.2 Sızma zeytinyağların süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri	86
4.5.3 Sızma zeytinyağlarının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	92
4.5.4 Sızma zeytinyağlarının glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	97
4.6 Sızma zeytinyağı örneklerinin aldoz redüktaz aktivitesi üzerine olan etkileri	103
4.7 Sızma zeytinyağlarının hücre koruyucu etkileri.....	109
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	111
KAYNAKLAR	127
ÖZGEÇMİŞ.....	144

SİMGELER DİZİNİ

AlCl ₃ :	Alüminyum klorür
CO ₂	Karbondiyoksit
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
O ₂ :	Oksidatif stres
mL :	Mililitre
M:	Molar
g:	Gram
LOO [•] :	Hidroperoksit
Nm:	Nanometre
mM:	Milimolar
μM:	Mikromolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
%	Yüzdelik oran
rpm :	Dakidaki devir sayısı
Na ₂ CO ₃ :	Sodyum karbonat
Li ₂ SO ₄ :	Lityum sülfat
°C:	Santigrad derece
Mg:	Magnezyum
NaOH:	Sodyum hidroksit
OH:	Hidroksit
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon
ONOO ⁻ :	Peroksinitrit

Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
ABTS:	Asit 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik)
ADP:	Adenozin difosfat
AR	Aldoz Redüktaz
ARI:	Aldoz Redüktaz inhibitör
ATP:	Adenosine Triphosphate
BSA:	Sığır Serum Albumin
CAT:	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DNA:	Dezoksiribonükleik
DPPH:	2,2-difenil 1-pikrilhidrazil
EcSOD:	Hücre içi Superoksit dismutaz
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü
EDTA :	Etilendiamin tetraasetik asit
eNOS :	Endotelial nitrit oksit sentaz
GA:	Gallik asit

GSH :	Glutasyon
GPX:	Glutasyon peroksidaz
GST:	Glutasyon-s-transferaz
hnRNP :	Heterojen nükleer ribonükleoprotein
HT	Hidroksitirozol
iNOS :	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İC ₅₀ :	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
IOC	Uluslararası Zeytin Konseyi
KGDH :	Ketoglutarat dehidrogenaz
LDL :	Düşük yoğunluklu lipit
LOX:	Lipoksigenaz
MAO:	Monoamin oksidaz
MeOH:	Metanol
mtDNA :	Mitokondriyal DNA
MTT:	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nDNA :	Nükleer DNA
NF-kB:	Nükleer faktör kappa B
NOS :	Nitrit oksit sentaz
OD:	Optik dansite
8-OHG:	8-hidroksiguanozin
OLC	Oleokantal
OLE	Oleuropein
OS :	Oksidatif stres
QE :	Kersetin eşdeğeri
ROT:	Reaktif oksijen türleri
RNA:	Ribonükleik asit
RSA :	Radikal süperme aktivitesi
SDH:	Sorbitol dehidrogenaz
SOD:	Süperoksit dismutaz
SH :	Sülfhidril
Tris-HCl	Tris-hidroklorür
TPC	Toplam fenolik bileşik

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ROS üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki denge	5
Şekil 2.2 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları ve insan vücudu üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3 Makromoleküllerin oksidasyonuna yol açan mekanizma.....	10
Şekil 2.4 Oksidatif stresin RNA molekülü üzerindeki oluşturulan hasarı	12
Şekil 2.5 Serbest radikal saldırısı ile oluşan DNA lezyonları.....	14
Şekil 2.6 Lipid oksidasyon mekanizması.....	16
Şekil 2.7 ROS tarafından protein fonksiyonlarının düzenlenmesi.....	17
Şekil 2.8 H ₂ O ₂ 'nin kanserin başlaması ve ilerlemesi ve metastazdaki etkisi	22
Şekil 2.9 Diyabetik komplikasyonlarda poliol yolunun rolü	24
Şekil 2.10 Aldoz redüktaz inhibitörlerinin klasik örneklerinin yapıları	25
Şekil 2.11 Ana prooksidanlar ve antioksidanlar	26
Şekil 2.12 ROS'un ana hücrel kaynakları ve oksidatif strese karşı koruyucu enzimler	27
Şekil 2.13 Üç SOD ailesini karakterize eden şerit yapılarının karşılaştırılması	29
Şekil 2.14 GST yoluyla ksenobiyotik ve glutatyon arasında konjugat oluşumu	32
Şekil 2.15 C vitamini genel yapısı	33
Şekil 2.16 E vitaminlerini içeren tokoferol ve tokotienol kimyasal yapıları	34
Şekil 2.17 Glutatyon kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.18 Karotenoidler kimyasal yapısı	36
Şekil 2.19 Fenolik bileşiklerin genel yapısı	36
Şekil 2.20 Flavonoidlerin genel yapısı.....	37
Şekil 2.21 İncelenen 5 zeytin çeşidinin meyve morfolojisi	40
Şekil 2.22 Sızma Zeytinyağında Tanımlanan Fenolik Bileşiklerin çeşitleri ve Kimyasal Yapıları.....	52
Şekil 3.1 Sızma zeytinyağı örnekleri	59
Şekil 3.2 Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması.....	61
Şekil 3.3 Sızma zeytinyağı örneklerin fenolik fraksiyonlarının elde edilmesi	62
Şekil 3.4 Sızma zeytinyağların fenolik fraksiyonların ekstraksiyon görselleri.....	63
Şekil 3.5 Sığır karaciğerden aldoz redüktaz enziminin izolasyon basamakları	69
Şekil 3.6 Aldoz redüktaz izolasyonunda işlem görselleri	70
Şekil 3.7 Hücre koruyucu deney aşamaları.....	73

Şekil 4.1 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 4.2 Toplam flavonoid madde miktar tayini için kuersetin kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 4.3 Sızma zeytinyağı örnekleri DPPH radikal temizleme eğrileri	79
Şekil 4.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin ABTS radikal temizleme eğrileri.....	81
Şekil 4.5 Kilis yağlık örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği.....	82
Şekil 4.6 Tavşan yüreği örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği.....	83
Şekil 4.7 Ayvalık örneğinin DPPH ile ABTS süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği	83
Şekil 4.8 Memecik örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktivitesi arasındaki korelasyon grafiği	84
Şekil 4.9 Ayvalık örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon eğrisi.....	84
Şekil 4.10 Sığır karaciğer dokusunda toplam protein tayini için BSA kalibrasyon grafiği	86
Şekil 4.11 SOD enzimi aktivite eğrisi.....	87
Şekil 4.12 Ayvalık örneğinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	88
Şekil 4.13 İzmir sofralık örneğinin süperoksit dismutaz enzimin üzerindeki aktivitesi .	88
Şekil 4.14 Kilis yağlık örneğinin süperoksit dismutaz enzimin üzerindeki aktivitesi ...	89
Şekil 4.15 Tavşan yüreği örneğinin süperoksit dismutaz enzimi aktivitesi üzerine olan etkisi.....	90
Şekil 4.16 Memecik örneğinin süperoksit dismutaz enzimin aktivitesi üzerine olan etkisi	90
Şekil 4.17 Memecik örneğinin süperoksit dismutaz enzimin aktivitesi üzerine olan etkisi	91
Şekil 4.18 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri	92
Şekil 4.19 GPx enzim aktivite eğrisi.....	93
Şekil 4.20 Kilis yağlık örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	93
Şekil 4.21 İzmir sofralık örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	94
Şekil 4.22 Ayvalık örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	95

Şekil 4.23 Tavşan yüreği örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	95
Şekil 4.24 Memecik örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	96
Şekil 4.25 Kersetinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	96
Şekil 4.26 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerin glutatyon peroksidaz enzimi üzerine olan etkileri	97
Şekil 4.27 GST enzim aktivite	98
Şekil 4.28 İzmir sofralık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	99
Şekil 4.29 Kilis yağlık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	99
Şekil 4.30 Ayvalık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	100
Şekil 4.31 Tavşan yüreği örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	101
Şekil 4.32 Memecik örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	101
Şekil 4.33 Kersetin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri.....	102
Şekil 4.34 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon-S-transferaz üzerine olan etkileri	103
Şekil 4.35 Aldoz redüktazın protein miktarı için BSA kalibrasyon grafiği.....	104
Şekil 4.36 Aldoz redüktaz enzim aktivite eğrisi	105
Şekil 4.37 İzmir sofralık örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	105
Şekil 4.38 Kilis yağlık örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.39 Tavşan yüreği örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	107
Şekil 4.40 Ayvalık sızma zeytinyağı örneğinin aldoz redüktaz enzimi üzerine etkisi..	107
Şekil 4.41 Memecik örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	108
Şekil 4.42 Tüm örnekler için aldoz redüktaz enzim aktivite değerleri	109
Şekil 4.43 Farklı sızma zeytinyağları örneklerinin hücre koruyucu etkileri.....	110

ÇİZGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hücre içi bazı temel reaktif oksijen türleri	5
Çizelge 2.2 Memeli hücrelerinde glutatyon peroksidaz (GPx) izoformları	30
Çizelge 2.3 Türkiye’de Zeytin çeşitler ve yetiştirildiği bölgeleri	39
Çizelge 2.4 Zeytinyağı çeşitlerine göre yağ asidi bileşimi	42
Çizelge 2.5 Zeytinyağı çeşitlerine göre yağ isterol bileşimi	43
Çizelge 2.6 Sızma zeytinyağının yağ asidi bileşimi	45
Çizelge 2.7 Sızma zeytinyağının sterol bileşimi	48
Çizelge 2.8 Farklı lezzet profillerine sahip sızma zeytinyağının aromasına katkı sağlayan odorantlar	49
Çizelge 3.1 Deney tüplerinin dolum tablosu	66
Çizelge 3.2 Hücre koruyucu deney tasarımı	73
Çizelge 4.1 Sızma zeytinyağlarının kuru ekstre miktarı ve ekstraksiyon verimi	75
Çizelge 4.2 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik madde miktarı	76
Çizelge 4.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoit madde miktarı	78
Çizelge 4.4 sızma zeytinyağlarının DPPH radikali süpürme yüzdeleri	79
Çizelge 4.5 Sızma zeytinyağı örneklerin DPPH radikal temizleme IC ₅₀ değerleri	80
Çizelge 4.6 Sızma zeytinyağların ABTS radikal süpürme yüzdeleri	81
Çizelge 4.7 Sızma zeytinyağı örneklerin ABTS radikal temizleme IC ₅₀ değerleri	81
Çizelge 4.8 Tüm örneklerle ait DPPH ve ABTS arasındaki korelasyonun R ² değerleri	85
Çizelge 4.9 Enzim deneylerde kullanılan sığır karaciğer dokusunda protein miktarı (n≤3)	86
Çizelge 4. 10 Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin aldose reductase üzerine IC ₅₀ değerleri (ortalama ± SD, n ≥ 3)	109

1. GİRİŞ

Mitokondriyal solunum zinciri başta olmak üzere, gıdaların sindirimi, alkol, ilaç metabolizması ve yağ moleküllerinin enerjiye dönüştürülmesi gibi vücudumuzdaki birçok doğal biyolojik süreçler sırasında serbest radikaller olarak adlandırılan çeşitli zararlı bileşikler üretilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak da adlandırılan bu serbest radikaller hava kirliliği, radyasyon, UV, ağır metaller ve pestisitler gibi birçok çevresel etmenden de kaynaklanabilir. ROS fizyolojik koşullar altında üretildiğinde, vücuttaki homeostazın korunmasında rol alabilir. Fizyolojik olarak, hücreler arasında belirli sinyallerin iletilmesini sağlamaktadırlar. ROS ayrıca makrofajlar tarafından patojenik organizmaları yok etmek için kullanılarak vücudun savunma sisteminde de yer alır. Bununla birlikte, büyük miktarlarda reaktif oksijen türlerinin üretimi hücrelerde oksidatif strese neden olmaktadır. ROS tarafından indüklenen oksidatif stres sonucunda, proteinler, lipitler ve nükleik asitler (DNA, RNA) gibi önemli biyolojik makromoleküllerin bozulmasına yol açmaktadır. Bu biyolojik makromoleküllerin yapılarında meydana gelen bozulma kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson) gibi çok çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına katkıda bulunabilmektedir (Arnim vd. 2010, Wang vd. 2014, Chin-Chan vd. 2015, Singh vd. 2019).

Aerobik organizmalarda bulunan çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler, organizmayı oksidatif hasardan korumak üzere görev almaktadır. Fizyolojik koşullar altında enzimatik antioksidan sistem; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), peroksiredoksin ve glutatyon S-transferaz (GST) dahil olmak üzere çeşitli enzimler aracılığıyla işlev görmektedir. NADPH, GSH ve tiyoredoksinler, hücreleri ROS hasarına karşı korumak için bu enzimlerle birlikte görev yapmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri arasında glutatyon, melatonin, C ve E vitaminleri, karotenoidler, fenolik bileşikler ve flavonoidler bulunmaktadır (Zhou vd. 2014, Küçükgoncú vd. 2017). Bazı antioksidanlar organizmalar tarafından normal fizyolojik süreçler sonucunda endojen olarak üretilirken, diğerleri gıda veya ilaçlar yoluyla dışardan alınmaktadır.

Antioksidan bileşikler açısından zengin gıdalar tüketmek, oksidatif stresin neden olduğu çeşitli hastalıkların önlenmesine veya tedavi edilmesine yardımcı olabilir. Bu antioksidan moleküller (C ve E vitaminleri, polifenoller, karotenoidler ve flavonoidler vb.) genellikle sebzeler, yumrular, tahıllar, meyveler ve bitkisel yağlar gibi gıdalarda bulunmaktadır. Son yıllarda, doğal antioksidan bileşikler, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde düşük yan etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir (Pizzino vd. 2017, Liu vd. 2018).

Sızma zeytinyağı, besleyici ve duyuşal özellikleri sayesinde Akdeniz diyetinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Sızma zeytinyağı tüketen Akdeniz toplumlarında kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanserlerin prevalansının düşük olduğu bildirilmiştir (Tripoli vd. 2005, Cicerale vd. 2010). Sızma zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler (tirozol, hidroksitirozol), özellikle sekoiridoidler, çeşitli klinik çalışmalarla desteklenen insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle özellikle ilgi çeken küçük bileşiklerdir (Francisco vd. 2019). Sızma zeytinyağı, tekli doymamış yağ asitleri (oleik asit) ve çoklu doymamış yağ asitleri (linoleik ve linolenik asitler) içeriğı ile diğer yağlardan ayrılmaktadır (Ghanbari Shendi vd. 2018). Sızma zeytinyağı yüksek oranda yağ asitleri (%98-99) ve düşük miktarda fenolik bileşikler, fitosteroller, tokoferoller ve skualen içermektedir. Bu küçük bileşenler, özellikle hidroksitirozol (HT), oleuropein (OLE), oleokantal (OLC) ve lignanlar, insan sağlığı için önemli bir rol oynamaktadır (Romani vd. 2019).

Sızma zeytinyağının içerdığı fenolik bileşikler anti-enflamatuvar, antiproliferatif, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir (Saija ve Accella 2001; Yazıhan vd. 2020). Zeytinyağı hidroksitirozol ve oleuropein, yüksek antioksidan kapasiteleri ve metal şelatlama ve serbest radikal süpürme aktiviteleri ile bilinmektedir. Hidroksitirozol, serbest radikalleri temizleme ve molekül içi hidrojen bağı ile oksijen radikallerini stabilize etme potansiyeli nedeniyle yüksek antioksidan aktivite sağlayan orto-difenolik bir grup içeren bir moleküldür (Romani vd. 2019).

Türkiye, İspanya ve İtalya'dan sonra dünyanın üçüncü büyük zeytinyağı üreticisidir (Öztürk vd. 2021). Türkiye'de yaklaşık 119 çeşit zeytin üretilmektedir (Efe vd. 2013). Zeytinyağı çeşitleri kimyasal bileşenleri ve aromaları açısından farklılık göstermektedir.

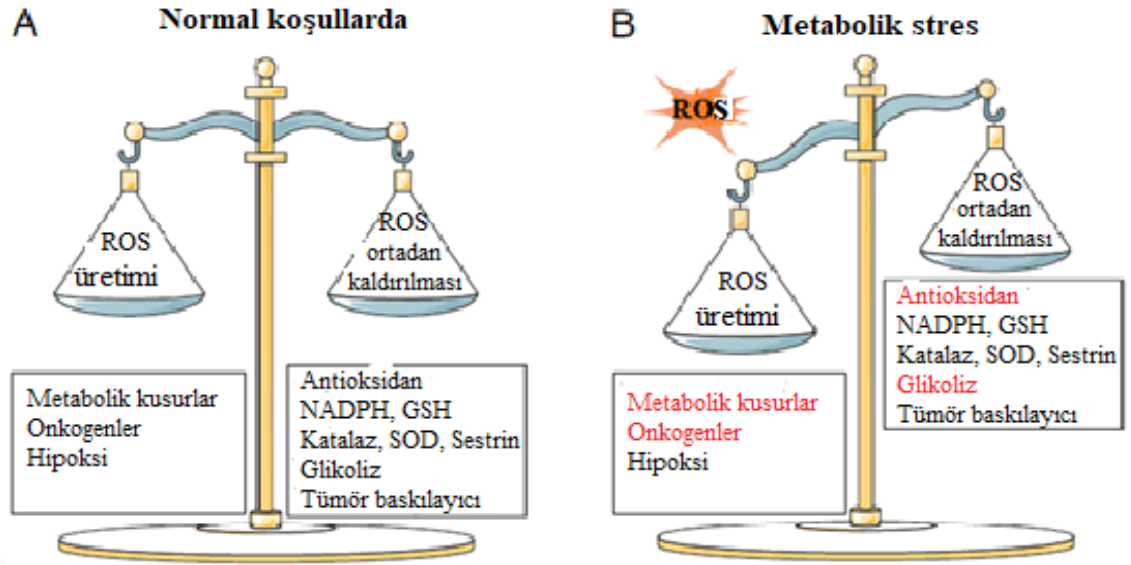
Bu farklılıklar temel olarak iklim koşulları, yağış, ekstraksiyon yöntemi ve toprak türü gibi çeşitli parametrelerden etkilenmektedir (Ingelese vd. 2011, Deiana vd. 2018, Fentes vd. 2019). Zeytinyağının kimyasal bileşimini, depolama süresini de etkilemektedir (Ghanbari shendi vd. 2018). Zeytinyağlarının kimyasal bileşimini, özellikle de fenolik bileşiklerin, yağ asitlerinin ve sterollerin içeriğini etkileyen bu faktörler, biyolojik özelliklerini de etkilemektedir. Türkiye'de birçok zeytin ve zeytinyağı çeşidi olmasına karşın, zeytinyağların biyolojik özellikleri üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle Türkiye'de üretilen farklı zeytin çeşitlerinden elde edilen sızma zeytinyağı örneklerinin fenolik bileşenlerini ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Yukarıda sözü edilen bilgiler ışığında gerçekleştirilen mevcut tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen beş çeşit sızma zeytinyağının (Ayvalık, İzmir sofralık, Tavşan yüreği, Kilis yağlık ve Memecik) antioksidan aktiviteleri ve hücre koruma potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada öncelikle beş tip sızma zeytinyağının fenolik fraksiyonları, metanolün farklı konsantrasyonları ile ekstre edilip uygun metanolik ekstre ile devam edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen fenolik fraksiyonların toplam fenolik ve flavonoid içeriği analiz edilerek buna göre çalışma planı yapılması hedeflenmiştir. Radikal süpürme aktivitelerinin araştırılması için sızma zeytinyağı örneklerinin DPPH ve ABTS sonuçlarına bakılacak, antioksidan savunma sisteminde ve birçok patolojinin gelişiminde veya tedavisinde rol oynayan glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki sızma zeytinyağı örneklerinin etkileri incelenecektir. Ayrıca, diyabetik komplikasyonlarda glikoz moleküllerinin sorbitole dönüşümünü katalize eden aldoz redüktaz (AR) enziminin aktivitesi üzerindeki etkileri ile birlikte, sızma zeytinyağından elde edilen fenolik fraksiyonların normal böbrek epitel hücre hatları (Vero) üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Oksidatif stres

Fizyolojik koşullar altında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Ancak bu dengeyi bozabilecek ve hücrenin ROS'unun artmasına neden olabilecek birçok neden vardır. Bu sürece "oksidatif stres" denir. Oksidatif stres, pro-oksidan / antioksidan sistem arasındaki hücresel homeostazdaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu dengesizlik, antioksidan sistemin zayıflamasına veya bozulmasına yol açan metabolik strese neden olmaktadır. Metabolik stres, ROS'ta bir artış ve antioksidanlarda, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi bazı antioksidan enzimlerde ve bazı metabolik yollarda azalma ile karakterize edilir (Şekil 2.1). Bu nedenle meydana gelen metabolik dengesizlik, çeşitli patolojilerin ortaya çıkma riskini artırmaktadır. Oksidatif stresin, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve belirli nörodejeneratif veya yaşa bağlı hastalıklar gibi birçok hastalığın etiyolojisinde rol oynadığına inanılmaktadır. Bu hastalıklar, serbest radikallerin hücresel işleyişte önemli bir rol oynayan bazı makromoleküllere verdiği büyük hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stresin iletkenleri, reaktif oksijen türleridir. Reaktif oksijen türleri, endojen veya ekzojen kaynaklardan kaynaklanabilir. Endojen kaynaklar, mitokondriyal solunum zincirinde ROS oluşumunu içerir. Ekzojen kaynaklara gelince, bunlar özellikle radyasyonlar, kimyasal maddeler ve UV ışınlarıdır.



Şekil 2.1 ROS üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki denge (Zhao vd. 2017).

2.2 Reaktif oksijen türleri

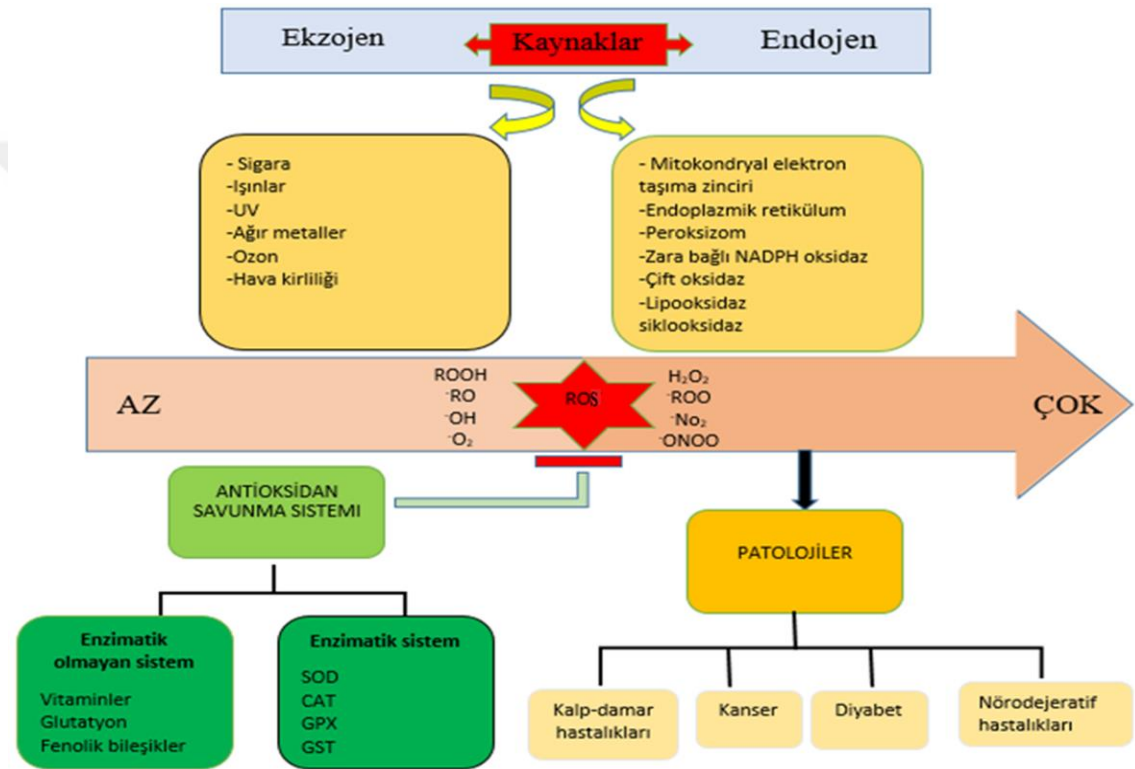
Aerobik ökaryotik organizmalarda, hayatta kalabilmeleri için oksijen üretimi gereklidir. Bu oksijen üretimi, enerji durumunda, mitokondri zarının içinde gerçekleşir. Bununla birlikte, bu enerji üretim mekanizması, hücrenin normal işleyişini de engelleyebilecek serbest radikallerin oluşumu ile bağlantılıdır. Reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan serbest radikaller, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$), Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet -}$) ve nitrik oksittir.

Çizelge 2.1 Hücre içi bazı temel reaktif oksijen türleri (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Peroksil radikali ($RO_2^{\bullet}$)	Ozon, (O_3)
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)	Singlet oksijen (O_2)
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet -}$)

2.2.1 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

Reaktif oksijen türleri genellikle hava kirlilik, sigara dumanı gibi dış (ekzojen) etkenlerin etkisiyle veya antioksidan mekanizmalar baskılanırsa hücre içi metabolizmanın bir sonucu olarak içsel (endojen) olarak üretilmektedir (Şekil 2.2). Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve diyabet gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.2 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları ve insan vücudu üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi (Sharifi-Rad vd. 2020).

2.2.1.1 Endojen kaynaklar

Yukarıda belirtildiği gibi, reaktif oksijen türleri endojen veya eksojen kaynaklardan gelebilir. Mitokondri, endojen ROS oluşumuna katkıda bulunan başlıca unsurdur. Mitokondri tarafından tüketilen O_2 'nin yaklaşık %1'inin O_2^- üretmek için kullanıldığı tahmin edilmektedir. O_2 'nin O_2^- 'ye indirgenmesi mitokondrinin iç membranında bulunan elektron taşıma zincirinde gerçekleşir (Starkov vd. 2004; Sabharwal ve Schumacker

2014). Reaktif oksijen türleri bağışıklık savunma süreci sırasında da üretilir. Bu süreçte, patojenik maddeler veya bazı patojenik bakteriler, NADPH-oksidad gibi enzimlerin aktivitesi yoluyla ROS üreten nötrofiller tarafından ortadan kaldırılır. NADPH-oksidad enzim sisteminin aktivasyonu reaktif oksijen formlarının üretimiyle sonuçlanır. Krebs döngüsünün önemli bir enzimi olan α -ketoglutarat dehidrojenaz (α -KGDH) da ROS üretebilir (Vera adam-vızı 2005).

Bu durum özellikle kompleks I'in inhibisyonu için geçerlidir ve kompleks I aktifken üretilen oksidatif stres oluşumunu önleyebilir. Endojen ROS üretimi ayrıca endoplazmik retikulum, peroksisom, membrana bağlı NADPH oksidad (NOX) izoformları 1-5, çift oksidad (Duox) kompleksleri 1 ve 2 ve nitrik oksit sentaz (NOS1-3) izoformları 1-5'te de meydana gelebilir (Sharifi-Rad vd. 2020).

2.2.1.2 Ekzojen Kaynaklar

Ekzojen ROS kaynakları çevresel tetikleyicileri içerir. Sigara dumanı, UV radyasyonu, ağır metaller, toksinler, pestisitler veya insektisitlere maruz kalmak, hücrelerde artan ROS üretimini teşvik ederek oksidatif strese neden olmaktadır (Mahajan vd. 2018; Oke vd. 2019). Ultraviyole radyasyon (UVA) riboflavin, porfirinler ve NADPH-oksidadı aktive ederek oksidatif reaksiyonlara neden olur ve bunun ana sonucu 8-okso-guanin üretimidir, dolayısıyla DNA ve RNA moleküllerini etkilemektedir. UV maruziyeti ayrıca hücre içi glutatyon (GSH) seviyelerinde düşüşe yol açarak glutatyon antioksidan enzimlerinin aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (Marchitti vd. 2011). Ancak, maruziyet durdurulduktan sonra normale dönüş gözlenir. İyonlaştırıcı radyasyon, ikincil oksidatif aktiviteye sahip redoks reaksiyonları yoluyla Fe ve Cu metal iyonlarıyla hücresel düzeyde reaksiyona girebilmektedir (Spitz ve Hauer-jensen 2014). Fibroblastların alfa partiküllerine maruz bırakılmasının hücre içi oksijeni artırdığı ve bu seviyede peroksit üretimini hızlandırdığı gösterilmiştir. Demir, nikel, bakır ve kurşun gibi ağır metaller Fenton ve Haber-Weiss tipi reaksiyonlarda serbest radikaller üretir. Bu metaller ayrıca benzer etkilere sahip hücresel bileşiklerle reaksiyona girerek tiyol radikalleri de üretebilmektedir.

2.3 Reaktif oksijen türlerinin biyokimyası ve özellikleri

Günümüzde reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan serbest radikallerin varlığına dair kanıtlar 20. yüzyılın başlarına kadar elde edilmemiştir (Meo ve Paola 2020). Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve genellikle dikkate değer reaktivite sergileyen kimyasal türlerdir (atomlar, moleküller veya iyonlar).

2.3.1 Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit anyonu, oksidatif stres oluşumunda en çok rol oynayan reaktif oksijen türlerinden biridir. Süperoksit anyonu esas olarak mitokondrinin iç membranındaki elektron taşıma zincirinde üretilmektedir. Süperoksit anyonunun oluşumunda rol alan kompleksler başlıca kompleks I ve kompleks III'tür. Süperoksit anyonu endoplazmik retikulumda ve nadiren ksantin oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz ve aldehit oksidaz gibi diğer enzimler tarafından da üretilmektedir (Halliwell 2006). Halliwell ve Gutteridge (2015) de süperoksit anyonunun nörotransmitterler, tiyoller veya indirgenmiş koenzimler gibi çeşitli biyolojik bileşikler tarafından üretilbileceğini bildirmiştir. Süperoksit anyon üretimi doku iskemisi durumunda gözlenir, bu durumda ubiquinon elektronları artık sitokromlar tarafından desteklenmez ve O_2 'nin $O_2^{\bullet-}$ 'ye indirgenmesine yol açmaktadır. ATP'ye bağlı pompanın işlevsizliği hücre içi hiperkalsemiye neden olur ve bu da bir proteaz aracılığıyla ksantin oksidazın aktivasyonuna yol açarak önemli ölçüde süperoksit anyon üretimine sebep olmaktadır (Olivier 2016).

2.3.2 Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksitin çoğu süperoksit anyonunun indirgenmesi sırasında oluşur. Bu indirgenme, süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen bir enzimin etkisiyle süperoksit anyonunun parçalanmasıyla sonuçlanır. Hidrojen peroksit aynı zamanda bielektronik bir indirgemeden de kaynaklanabilir ve peroksizomda ve monoamin oksidaz yoluyla

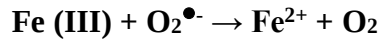
mitokondrinin dış zarında bulunan oksidazlar gibi enzimlerin aktivitesinden kaynaklanabilir (Cadenas ve Davies 2000).

Hidrojen peroksit, oksijenin radikal olmayan reaktif türlerinden biridir. Süperoksit anyonuna kıyasla zayıf reaktiftir. Hidrojen peroksit, metaller, demir iyonu ve hidroksil radikali varlığında fenton reaksiyonu ile oluşumuna izin veren membranlar, özellikle mitokondriyal membranlar boyunca çok iyi bir difüzyona sahiptir ((Nordberg ve Arnér 2001, Alix Poinso. 2016). Peroksizomda bulunan bir enzim olan ksantin oksidaz, süperoksit anyonunun üretiminde rol oynar (Ohara vd. 1993, Kooij 1994). Süperoksit anyonunun (O_2^-) hidrojen peroksit dönüşümü protonların varlığında süperoksit dismutaz (SOD) tarafından gerçekleştirilmektedir.

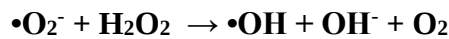
2.3.3 Hidroksil radikali

Hidroksil radikali ($\cdot OH$), genellikle hidrojen peroksitin ($HOOH$) fotolizi sırasında oluşan bir oksidandır. Bu yüksek reaktif bileşiğin birikimi, genel olarak vücutta ve özellikle hücrelerde oksidatif stresin artmasına katkıda bulunmaktadır. Hidroksil radikallerinin oluşumu, kardiyovasküler sistemin geçici iskemik tedavisi sırasında perfüzyonla da indüklenebilir (Wu vd. 1996). Hidroksil radikallerinin oluşumu miyokardiyal hipoksi sırasında da meydana gelebilir. Hidroksil radikali en reaktif serbest radikaldır, son derece kısa bir yaşam süresine sahiptir ve yalnızca oluştuğu ortamda biyolojik hasara neden olmaktadır (Poinso 2016). Hidroksil radikali üretiminin ana yolları Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlar, $Fe(II)$ veya $Cu(I)$, $Co(II)$, $Ti(III)$ veya $Cr(V)$ gibi metallerin varlığında hidrojen peroksitin ayrışmasından kaynaklanmaktadır.

Hidroksilin oluşumun sırasında gerçekleştirilen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:

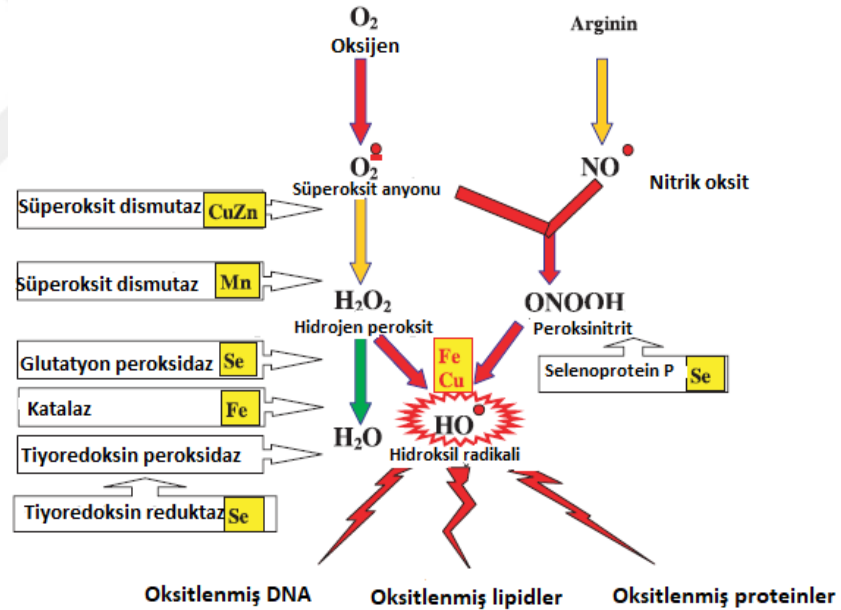


Reaksiyonun sonucu:



2.4 Oksidatif stresin biyolojik makromoleküller üzerine etkileri

Hücre membranı lipidleri, proteinleri ve DNA'sında oksidatif hasarın sürekli olarak meydana geldiğine dair önemli deneysel kanıtlar bulunmaktadır. Oksidatif strese bağlı olarak hücresel homeostazdaki bozulmalar proteinler, lipidler ve nükleik asitler (DNA ve RNA) gibi makromoleküllerin oksidasyonuna yol açmaktadır. Bu da yapılarında, aktivitelerinde veya fiziksel özelliklerinde değişikliğe neden olmaktadır. Oksidatif stresin biyolojik olarak aktif bu makromoleküller üzerinde neden olduğu değişiklikler çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Nükleer ve mitokondriyal DNA'da, 8-OHdG veya 8-okso-7,8 dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG) serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın baskın formlarından biridir. Bu oksidatif hasar biçimleri, tip 2 diyabet gibi bazı hastalıklarda oksidatif stresin varlığını kanıtlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Tabak vd. 2011).



Şekil 2.3 Makromoleküllerin oksidasyonuna yol açan mekanizma (Favier 2003)

2.4.1 Nükleik asitlerin üzerindeki etkiler

Nükleik asitler, protein sentezinin gerçekleştiği yapı taşlarıdır. DNA önce mRNA'ya kopyalanır, bu da proteinleri oluşturan amino asitlere çevrilmektedir. DNA, hücrenin

proteinlerini sürekli sentezlemesini sağlar ve replikasyonu, genetik bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlamaktadır.

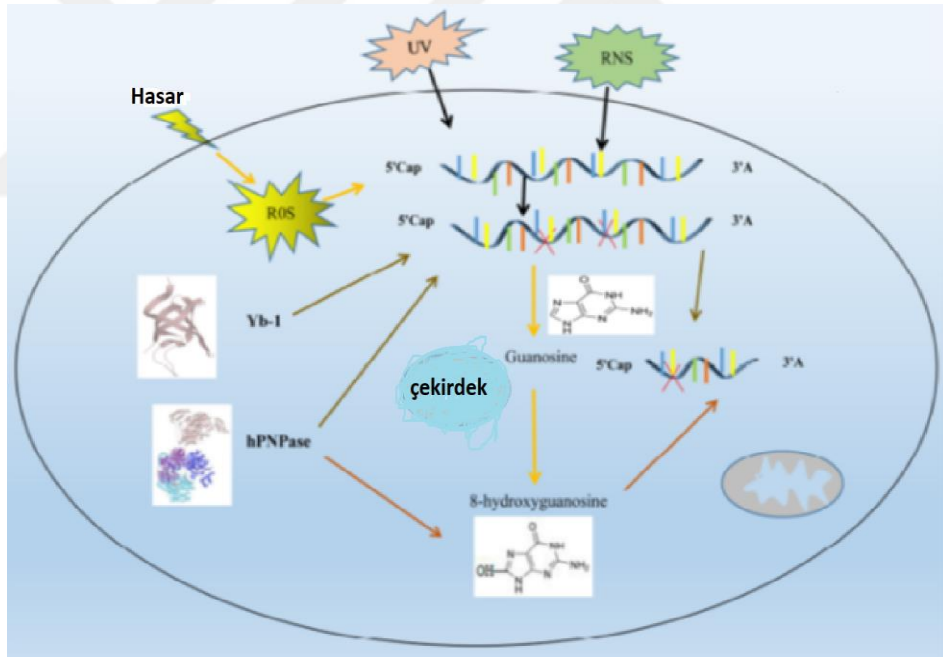
2.4.1.1 RNA üzerindeki etkiler

RNA, genetik bilginin tercüme edilmesinde ve proteinlerin biyosentezinde önemli bir rol oynar. Bir hücrede RNA, DNA'dan daha fazladır ve hücredeki toplam nükleik asidin %80-90'ını oluşturur. Çalışmalar bu molekülün oksidatif strese en çok maruz kalan biyolojik moleküllerden biri olduğunu göstermiştir (Liu vd. 2012, Kong ve Lin 2010). Tek sarmallı bir molekül olan RNA molekülü, çift sarmallı bir molekül olan DNA molekülüne kıyasla oksidatif strese karşı daha savunmasız görünmektedir. Örneğin, DNA'nın iki ipliğinin nükleotid bazları birbirini tamamlar, bazlar hidrojen bağlarıyla korunur ve yapıları nispeten karardır ve bozulmaya dayanıklı olurken (Vologodskii 2016), oysa RNA genellikle tek iplikli ve yapısal olarak kararsızdır (Sankaran 2016). Escherichia coli'de yapılan bir çalışma, RNA'da H₂O₂'nin neden olduğu 8-okso-G içeriğinin yükselmesinin, DNA'daki 8-hidroksideoksiguanozin (8-okso-dG)'den daha yüksek olduğunu göstermiştir. RNA molekülünün DNA molekülünden daha fazla oksidatif strese maruz kalmasının nedenlerinden biri sitoplazmada yer almasıdır. Hücre içi ortamda ROS ve RNS'deki artış, hücre içi 8-hidroksiguanozinde (8-OHG) bir artışa yol açmaktadır. RNA molekülünün DNA molekülünden daha fazla oksidatif strese maruz kalmasının nedenlerinden biri sitoplazmada yer almasıdır. RNA molekülünün bu hücre içi konumu, onu ultraviyole ışınlarına, reaktif oksijen türlerine (ROS) ve reaktif nitrojen türlerine (RNS) karşı daha savunmasız hale getirmektedir (şekil 2.5). Hücre içi ortamda ROS ve RNS'deki artış, hücre içi 8-hidroksiguanozinde (8-OHG) bir artışa yol açar. 8-hidroksiguanozindeki bu artış, yüksek reaktif hidroksil radikalleri tarafından RNA moleküllerindeki guanozinin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır.

Polinükleotid fosforilaz (PNPas), 8-hidroksiguanozin seviyesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Böylece bu enzim, hasarlı RNA'yı, bu durumda 8-hidroksiguanozinler içeren RNA ipliklerini parçalayabilir. Bu mekanizma aniden hücre içi ortamdaki 8-OHG seviyesinin düşmesine katkıda bulunur ve hücrenin ömrünü uzatmaktadır (Liu vd. 2012, Li vd. 2020). PNPase enziminin inaktivasyonundan sonra

hasarlı RNA içeriğinin arttığı ve hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir (Wu ve Li 2008). Polinükleotid fosforilazın yanı sıra insan y-box bağlayıcı protein 1 (Yb-1) ve heterojen nükleer ribonükleoprotein (hnRNP) gibi proteinler de hücredeki hasarlı RNA miktarının azalmasına katkıda bulunmaktadır (Maughan ve Shuman 2015).

RNA'ya oksidatif hasar, kanser, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı, Alzheimer) ve ateroskleroz gibi patolojilerde rol oynamaktadır. RNA oksidasyonu, birçok nörodejeneratif hastalığın bir belirticinin yanı sıra, hastalığın alevlenmesine yol açabilen artan oksidatif stresin bir göstergesidir. Bununla birlikte, bu hastalıklarda oksidatif RNA hasarının moleküler mekanizması keşfedilmeyi beklemektedir, okside RNA ile hastalık patojenitesi arasındaki doğrudan nedensel ilişki belirsizdir (Simms ve Zaher 2016).



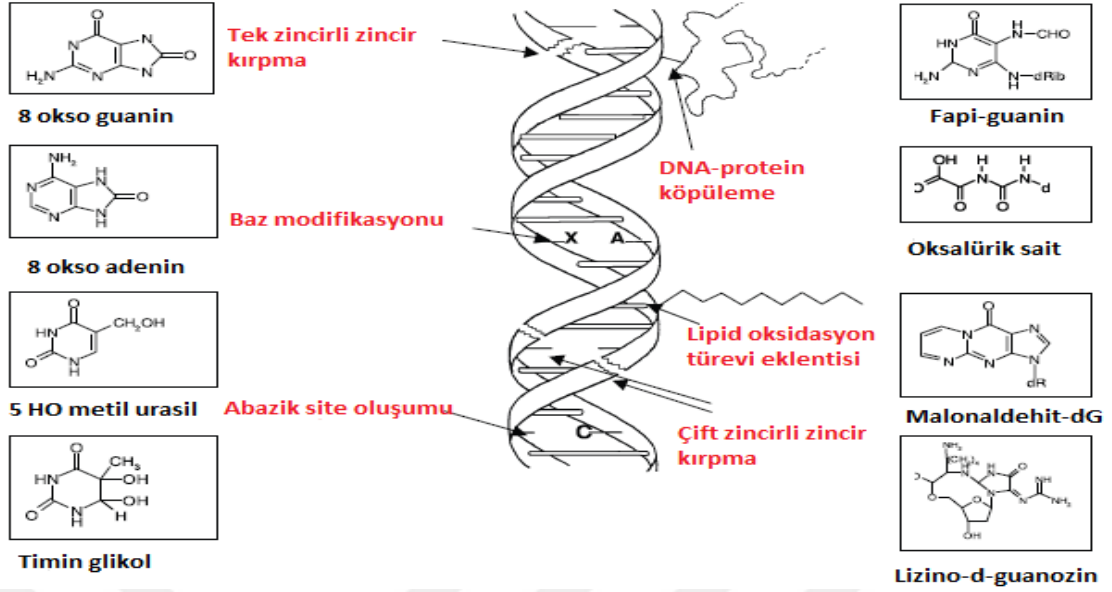
Şekil 2.4 Oksidatif stresin RNA molekülü üzerindeki oluşturulan hasarı (Li vd. 2020).

UV: ışınlar, RNS: reaktif nitrojen türleri, ROS: reaktif oksijen türleri. Hücre içi ROS'un artması, RNA'da oksidatif hasara yol açar, bu da hücre içi 8-hidroksiguanozinde (8-OHG) bir artışa yol açar, çünkü RNA'daki guanozin, bir C8 oluşturmak üzere yüksek oranda reaktif hidroksil radikalleri tarafından oksitlenebildiği için -OH eklenti radikali oluşmaktadır. hPNPaz, hasarlı RNA'yı bozabilir ve 8-OHG içeriğini azaltabilir, böylece RNA hasarını azaltır. Yb-1, hasarlı RNA'yı susturarak RNA hasarını hafifletir. RNA molekülleri mavi çizgilerle gösterilmiştir. kırmızı X, hasarlı RNA'yı temsil eder..

2.4.1.2 DNA üzerindeki etkiler

DNA hasarı, hücrelerdeki DNA molekülünde fiziksel veya kimyasal bir değişikliğe neden olmaktadır. DNA, kimyasallar, radyasyon, serbest radikaller ve topolojik değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli dışsal ve iç kaynaklı saldırılardan zarar görebilir ve her biri farklı hasar biçimlerine neden olabilir (Curtin 2012). Endojen veya eksojen ajanların neden olduğu bu fiziksel veya kimyasal modifikasyon, genetik bilginin iletimini etkileyebilir (Srinivas vd. 2019). DNA molekülü, oksijenle reaktif türlerin ana hedefidir. Oksijen reaktif türlerin neden olduğu oksidatif stres, DNA molekülünde mutasyonlara neden olmaktadır. Meydana gelen bu mutasyonlar, kanser, Alzheimer hastalığı, kalp damar hastalıkları gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Hidroksil radikalının kanser hücrelerinde birikmesi DNA molekülüne zarar vermektir. Çalışmalar, mitokondriyal DNA'nın oksidatif strese nükleer DNA'dan daha duyarlı olduğunu göstermiştir. mtDNA ROT'ların meydana getirdiği hasarlara karşı nDNA'dan 2-3 kat daha duyarlıdır (Wei ve Lee 1998, Sawyer ve Houten 1999). Bu durum, ökaryotlarda oksidatif stresin en yoğun olduğu organel mitokondri olduğundan kaynaklanmaktadır. Öyleyse mitokondriyal DNA sürekli oksidatif strese maruz kalmaktadır.

Oksidatif stresin DNA molekülü üzerinde yarattığı modifikasyonlar esas olarak en reaktif ROS'lardan biri olan hidroksil radikalinden kaynaklanmaktadır. DNA molekülünü etkileyen beş tip hasar, hücrede OH radikalının aşırı üretiminden kaynaklanabilir. Bunlar arasında oksitlenmiş bazlar, abazik siteler, zincir içi eklentiler, zincir kırıkları ve DNA-protein köprüleri bulunmaktadır (Cadet vd. 2002). DNA molekülünü oluşturan azotlu bazlar, serbest radikallerin oluşturduğu hasara karşı hassastır. Guanin özellikle en hassas olanıdır. Böylece bu azotlu bazların oksidasyonu, 8 okso adenin, formimido urasil, 5 hidroksi sitozin, 5 hidroksi metil urasil, timin diol ve oksazolon gibi aniden modifiye edilmiş bazlar oluşturan çok sayıda bazın modifikasyonuna neden olmaktadır (Favier 2003). Serbest radikallerin saldırısı, aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi DNA molekülünde başka doğrudan veya dolaylı hasarlara da sebep olmaktadır.



Şekil 2.5 Serbest radikal saldırısı ile oluşan DNA lezyonları (Favier 2003).

2.4.2 Zar lipidlerinin üzerindeki etkiler

Oksijen reaktif türlerin lipid membranlarda birikmesi, peroksit miktarında bir artışa yol açmaktadır: buna lipid peroksidasyonu denir. Lipidlerde hidrojen süperoksit birikiminin neden olduğu lipid peroksidasyonu, hücre ölümüne yol açabilir. Bu, belirli enzimlerin, özellikle glutatyon peroksidazın etkisiz hale getirildiği ve artık hidrojen peroksidi H_2O veya O_2 'ye dönüştürmeyi başaramadığı durumlarda gözlemlenebilir. Membran lipidlerinin peroksidasyonu, lipid çift katmanlarının fiziksel özelliklerini değiştirebilir, böylece lipid-lipit etkileşimlerinde, membran geçirgenliğinde, iyonik gradyan ve membran akışkanlığında bir değişikliğe yol açmaktadır (Mario 2016). Lipitlerin aşırı oksidasyonu, hücre zarlarının fiziksel özelliklerini değiştirir ve proteinlerin ve nükleik asitlerin kovalent modifikasyonuna uğrayabilir. Aslında, membran lipidlerinde yapılan bir değişiklik, genlerin düzenlenmesi ve ekspresyonunda yer alan sinyalleri dolaylı olarak etkiler ve aniden DNA ve RNA moleküllerinde mutasyonlara yol açmaktadır.

Reaktif oksijen türleri esas olarak membran lipoproteinlerine ve fosfolipidlere saldırmaktadır. Lipidlerin veya lipoproteinlerin oksidasyonu sıklıkla LDL oluşumuna yol açar ve bu da okside olabilir ve aterosklerotik plakların oluşumuna neden olabilir. Öte

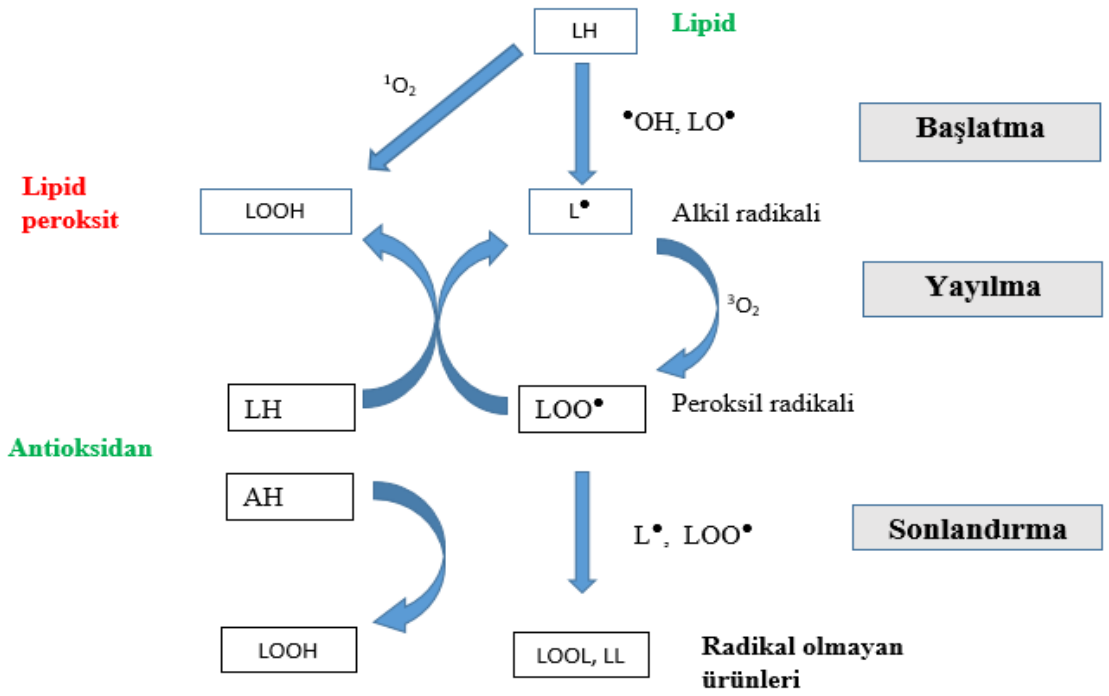
yandan, zar fosfolipidlerinin oksidasyonu, hücre zarlarının akışkanlığını değiştirir ve reseptörlerin yanı sıra zar taşıyıcılarının işleyişini bozmaktadır (Favier 2003).

Doymamış yağ asidi molekülleri ile yüksek reaktivitesi ile bilinen hidroksil radikali, lipid peroksidasyonuna yol açan bir zincir reaksiyonuna sebep olmaktadır. Bu reaksiyon zinciri, başlatma, yayılma ve sonlandırma içermektedir (Şekil 2.6).

Başlatma reaksiyonu, bir alkil radikalinin oluşumuna yol açan iki çift bağ arasında bulunan karbon üzerindeki yağ asidinden bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlamaktadır. Bu durum, serbest radikallerin redoks potansiyeli çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA'lar) daha yüksek olduğunda ortaya çıkmaktadır. Hidroksil ($\bullet\text{OH}$) veya hidroperoksi ($\text{LOO}\bullet$) radikalleri, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu başlatmaktadır.

Yayılma adımı, başlatma sırasında oluşan alkil radikalinin bir peroksil radikaline dönüştürülmesine karşılık gelmektedir. Bu dönüşüm, alkil radikalinin $^3\text{O}_2$ ile reaksiyonundan kaynaklanmaktadır.

Sonlandırma aşamasında, alkil ve peroksil radikallerinin oluşum hızı maksimuma ulaşmıştır. Bu aşamada lipid radikallerinin kombinasyonu radikal olmayan ürünlerin (LOOL, LL) oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.6 Lipid oksidasyon mekanizması (Cillard ve Cillard 2006)

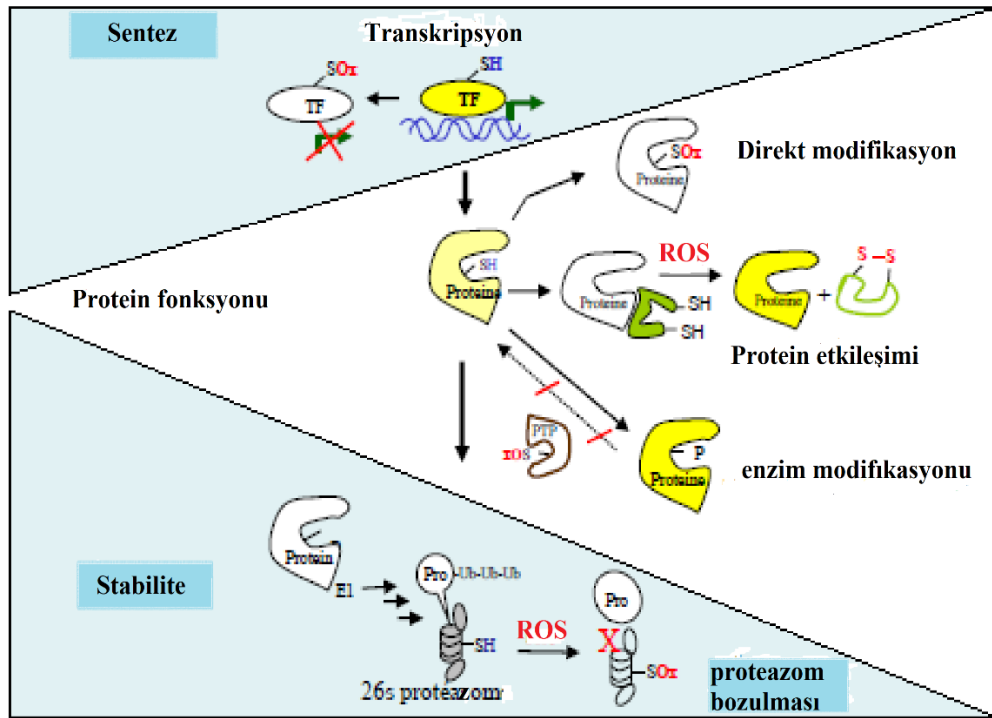
2.4.3 Proteinlerin üzerindeki etkiler

Proteinler hücrelerin hayatında çok önemli rol oynamaktadırlar. Hücrelerin işleyişinde işlev gören çoğu enzimlerin alt yapısı proteinlerdir. Proteinler, çok hassas olan veya serbest radikallerin neden olduğu hasara maruz kalan makromoleküllerdir. Karşılaşılan hasar özellikle sülfhidril (SH) grupları içeren proteinlerde sıktır. Oksidatif stres, protein zincirlerinin yapısında değişikliklere yol açarak çoğu zaman işlevlerini kaybetmelerine neden olabilir. En çok etkilenen bileşenler, polipeptit zincirleri ve ayrıca onları oluşturan bazı amino asitlerdir. Fizyolojik koşullar altında, ROS'un ana hedefleri kükürt amino asitleri (sistein, metionin) (Brot ve Weissbach 2000, Finkel 2000), bazik amino asitler (arginin, lisin) (Stadtman, 1993) ve amino asitler aromatiklerdir (fenilalanin, tirozin, triptofan) (Armstrong ve Swallow 1969, Huggins vd. 1993). Oksidatif stres sırasında üretilen serbest radikaller, polipeptidin modifikasyonuna neden olur ve karbonil proteinleri vermektedir. Proteinlerin bu karbonilasyonu, peptit bağının karbonu üzerinde bir hidrojen atomunun yırtılmasıyla gerçekleşmektedir. Lizin, histidin, arginin gibi

polipeptit zincirini oluşturan bazı amino asitlerin deaminasyonu da karbonil gruplarının oluşumuna yol açabilmektedir (Stadtman 1991).

ROS'lar, protein sentezinin başladığı mekanizma olan transkripsiyon dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla protein fonksiyonlarını değiştirebilir. Transkripsiyon düzeyinde yapılan bu modifikasyon, sentezlenen proteinlerin fonksiyon ve stabilitesini etkiler (Şekil 2.7).

ROS, oksidasyonu (SOx) aktiviteyi engelleyebilen sistein (SH) kalıntılarına sahip nükleer faktör-κB (NF-κB), AP-1, HIF-1α ve p53 gibi birçok transkripsiyon faktörü üzerinde etkilidir. Oksidatif strese en duyarlı amino asitler olan sistein, tirozin ve metioninin oksidasyonu, TRX, RAS ve Akt proteinlerinin doğrudan modifikasyonuna yol açmaktadır. Ros ayrıca ASK1-TRX, JNK-GST, P53-JNK ve Nrf2-keap1 gibi etkileşimli protein kompleksinin ayrışmasına da neden olmaktadır (Thomas-schoemann 2012).



Şekil 2.7 ROS tarafından protein fonksiyonlarının düzenlenmesi (Trachootam vd. 2009)

2.5 Oksidatif stresle bağlantılı patolojiler

Oksidatif stres birçok hastalığın nedeni olabilir. Oksidatif stres bu nedenle kanser, diyabet, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı ve ateroskleroz gibi hastalıkların oluşumunda rol oynayabilir. Bu hastalıklar çoğunlukla pro/antioksidan dengesinin bozuk olduğu yaşlılarda görülmektedir.

2.5.1 Ateroskleroz

Oksidatif stres, ateroskleroz patogenezinde iyi bilinen bir bileşendir. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, dislipidemi, diyabet ve arteriyel hipertansiyon gibi aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olan bir risk faktörüdür (Förster vd. 2017) Ateroskleroz, intimanın kalınlaşmasına neden olan yağ asitlerinin birikmesinden kaynaklanan bir hastalıktır. Bu lipid birikintileri, düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu veya iltihaplanma nedeniyledir. Modifiye edilmiş lipoprotein partikülleri, endotelial hücrelerde hücre adhezyon moleküllerinin (vasküler hücre adezyon molekülleri-1 [VCAM-1], P ve E-selektinler gibi) ekspresyonunu artırarak, endotelial hücrelerde lökositlerin (esas olarak monositler ve T hücreleri) toplanmasını sağlamaktadır. Monosit kemoatraktan proteinler (MCP-1), eotaksin ve interferon (INF)- γ gibi kemoatraktan proteinlerin etkileşimi ile bu inflamatuvar hücreler intimaya göç etmektedir. Köpük hücreleriyle birlikte intimaya göç eden T hücreleri ve mast hücreleri, inflamasyonu ve ROS oluşumunu destekleyen çeşitli sitokinler salgılamaktadır. Bu hücreler tarafından ROS ile birlikte salınan büyüme faktörleri, aterosklerotik plak gelişimine yol açan düz kas hücre göçünü ve kollajen birikimini uyarmaktadır (Kattoor vd. 2017).

NADPH Oksidaz, NADPH, ksantin oksidaz ve endotelial nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin artan aktivitesi, damar duvarında süperoksit anyonunun aşırı üretimine sebep olmaktadır (Poznyak vd. 2020). Bu anyon, reaktif oksijen türlerinin en tehlikeli elementi olarak kabul edilir. Endotel duvarlarında süperoksit anyon birikimi, aterosklerotik plakların oluşumuna yol açmaktadır.

Endotel duvarındaki nitrik oksitteki artış, özellikle endotelyal nitrik oksit, ateroskleroz oluşumunu destekleyen bir faktör olarak kabul edilebilir. Endotelyal nitrik oksit sentazın (eNOS) aktivasyonu, artan endotelyal nitrik oksit mevcudiyeti, apoptoz, yapışma molekülü ekspresyonu ve endotelyal pro-trombotik aktivasyona neden olmaktadır (Stancu vd. 2012, Kratzer vd. 2014). Artan nitrik oksit üretimi, yüksek dansiteli lipidlerin (HDL) oksidasyonundan kaynaklanabilir. Benzer şekilde, çok sayıda çalışmada, oksitlenmiş düşük dansiteli lipoproteinlerin (oxLDL) proinflamatuvar yanıtlara dahil edilmesinin, bu nedenle endotelyal disfonksiyon gelişimine ve ateroskleroza yol açan aterosklerotik plakların oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Ryoo vd. 2004, Pirillo ve Catapano 2013).

2.5.2 Parkinson hastalığı

Parkinson hastalığı (PH), bazal gangliyonun substantia nigra pars compacta'da (SNpc) dopaminerjik nöronların kaybının neden olduğu yetersiz dopamin seviyeleri ile karakterize edilen nörodejeneratif bir bozukluktur. Parkinson hastalığının bir tezahürü sırasında, protein agregasyonu, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres (OS) ve nöro-enflamasyon gibi, sonuçta nöronal hücrelerin ölümüne yol açan olaylar gözlemlenebilir (Caruana vd. 2016). Reaktif oksijen üretiminin şiddetlenmesi veya hücre içi antioksidan savunmasındaki bir başarısızlık nedeniyle oksidatif stresin neden olduğu nöronal hasarın birikmesi, Parkinson hastalığının nedeni olabilir. Dopamin metabolizmasındaki bir dengesizlik, ROS oluşumuna katkıda bulunabilir ve böylece dopaminerjik nöronlara zarar vermektedir. Dopamin ayrıca monoamin oksidaz (MAO) yoluyla oldukça reaktif bir metabolit olan 3,4-dihidroksifenilasetaldehit üretebilir. Dopaminin oksidasyonu ile ilişkili DOPAL birikimi, mitokondriye zarar veren ROS üretimini arttırmaktadır (Meiser vd. 2013, Burbulla vd. 2017, Coelho vd. 2019) .

PARK geni gibi belirli genlerdeki bir mutasyon da Parkinson hastalığının nedeni olabilir. Gerçekten de çalışmalar, Parkinson hastalığı vakalarının yaklaşık % 5-10'unun PARK genlerindeki anormalliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir (Lesage vd. 2009, Klein vd. 2012). PARK genlerinin mutasyonu, nöronlarda oksidatif strese yol açan reaktif oksijen türlerinde artışa neden olmaktadır. Zayıf dopamin salgısı da reaktif oksijen türlerinin

üretimini artırabilir. Oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon, Parkinson hastalığında görülen nöronal hücrelerin apoptozuna yol açmaktadır. Bu koşullar altında, reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondriyal membranda Bcl-2 Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlerin birikmesine neden olan nörotoksiteyi oluşturmaktadır. Bu daha sonra, mitokondriyal zarın sitokrom C'ye geçirgenliğine neden olur ve bu da sitozole salınımı nöronal hücrelerin apoptozunu tetiklemektedir (Park vd. 2020).

2.5.3 Alzheimer hastalığı

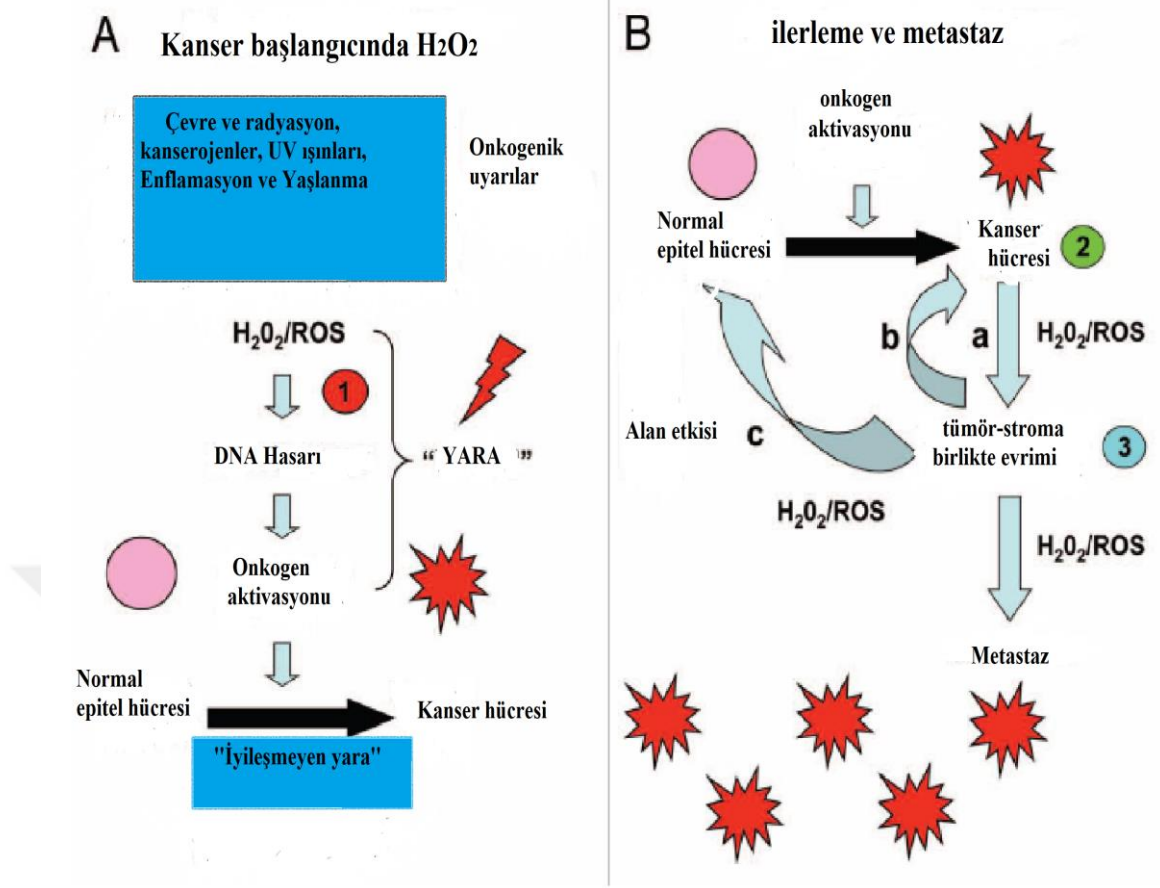
Parkinson hastalığı gibi, Alzheimer hastalığı da belirli nöronal hücrelerin kaybıyla bağlantılı bir nöronal eksiklikle ilişkilidir. Bu hastalık genellikle yaşlılarda yaygındır. Hastalığın nedenleri çok sayıdadır ve oksidatif stres ile de ilişkilendirilebilir. Aslında oksidatif stres, yaşlanmada ve Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir rol oynayan bir faktör olarak kabul edilmiştir. Yaş ve hastalıkla ilişkili mitokondriyal fonksiyon kaybı, değişen metal homeostazı ve azalmış Antioksidan savunma ile ilişkili artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, nöronlarda sinaptik aktiviteyi ve nörotransmisyonu doğrudan etkiler ve bu da bilişsel disfonksiyona neden olmaktadır. Nöronal hücreler içinde, ROS'un moleküler hedefleri arasında DNA (nükleer ve mitokondriyal), lipidler, proteinler ve kalsiyum iyonu homeostazı bulunmatadır. Bu nedenle, mitokondriyal DNA'daki mutasyonlar, nöronal hücrelerin ölümüne yol açabilen mitokondriyal disfonksiyona neden olan reaktif oksijen türlerinden kaynaklanabilir.

2.5.4 Kanser

Oksijen reaktif türler, kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Kanseri hücreleri, yüksek proliferasyonlarından dolayı, yüksek ROS konsantrasyonları gerektiren hızlandırılmış bir mekanizmaya sahiptir (Sosa vd. 2013). Oksidatif stres, kanser gelişiminin 3 aşamasıyla ilişkilidir. Bu aşamalar başlangıç (inisiyasyon), artma (promosyon) ve ilerlemedir (progresyon). Başlama sırasında oksidatif stres, belirli genlerde, özellikle tümör baskılayıcı genlerde veya onkojenlerde mutasyonlara neden olur. Örneğin, sigara içen bir kişinin akciğer kanserinde P53 ve RAS genlerinin

mutasyonu gözlenmiştir. Bu mutasyonun, 8-OHdG DNA eklentilerinin oluşumuna yol açan tütünde bulunan pro-oksidan maddeler tarafından indüklendiği düşünülmektedir. Enflamasyonla birlikte genomik olarak kararsız hücrelerin büyüdüğü görülmektedir. İlerleme safhasında ise hücreler çoğalırken, genomlarına daha fazla zarar vererek kötü huylu tümöre dönüşmektedir (Poirier 1987). Kanserin ilerlemesini destekleyen sinyal yollarının çoğalması ve çeşitlendirilmesiyle sonuçlanan promosyon aşaması, kanser hücrelerinde ROS birikimi ile de desteklenebilir. Sistein ve metiyonin gibi belirli amino asitlerin oksidasyonu, RAS-MEK-ERK1, PI3K / AKT, Keap1-Nrf2-ARE, NFkB ve JAK / STAT gibi sinyal yollarının deregülasyonuna neden olan belirli enzimlerin işleyişini etkileyebilir (Chikara vd. 2018). ROS birikimi genel olarak fosfatazların aktivitesini etkiler ve bu nedenle onları ,RAS-MEK-ERK ve PI3K / AKT sinyal bölgelerini defosforile etme veya inaktive etme yeteneğinden yoksun kılar (Lee vd. 2002). Bu sinyal yolları, kanser hücrelerinin çoğalmasını artırmaktadır.

Kanser gelişimi, özellikle ROS'un ve kanser hücrelerinin mikroçevresinin birleşik rolü ile vurgulanmaktadır. Mikro çevre, ROS üretimini birleştiren ve artıran endojen veya eksojen faktörleri içerebilir. Lisanti vd. (2011) tarafından tartışıldığı gibi ROS üretimi, aynı zamanda, başlangıçta normal epitel hücreleri düzeyinde bir etki uygulayan ve bunların ilerleyici transformasyonuna yol açan yaşlanma veya kronik inflamasyon tarafından da desteklenmektedir. Bu dönüşüm öncelikle DNA molekülünde oluşan hasarla gerçekleşir ve epitel hücreleri içinde onkogenlerin oluşumuna yol açmaktadır. Onkogenlerin etkisi, normal epitel hücrelerinin kanserleşmesine katkıda bulunur. Bu şekilde üretilen kanserli hücreler, kendilerini çevreleyen mikro çevreyi değiştirecek ve böylece bağışıklık sisteminin (şekil 2.9) kontrolünden kurtulmaktadır.



Şekil 2.8 H₂O₂ 'nin kanserin başlaması ve ilerlemesi ve metastazdaki etkisi (Lisanti vd. 2011)

2.5.5 Diyabetes mellitus

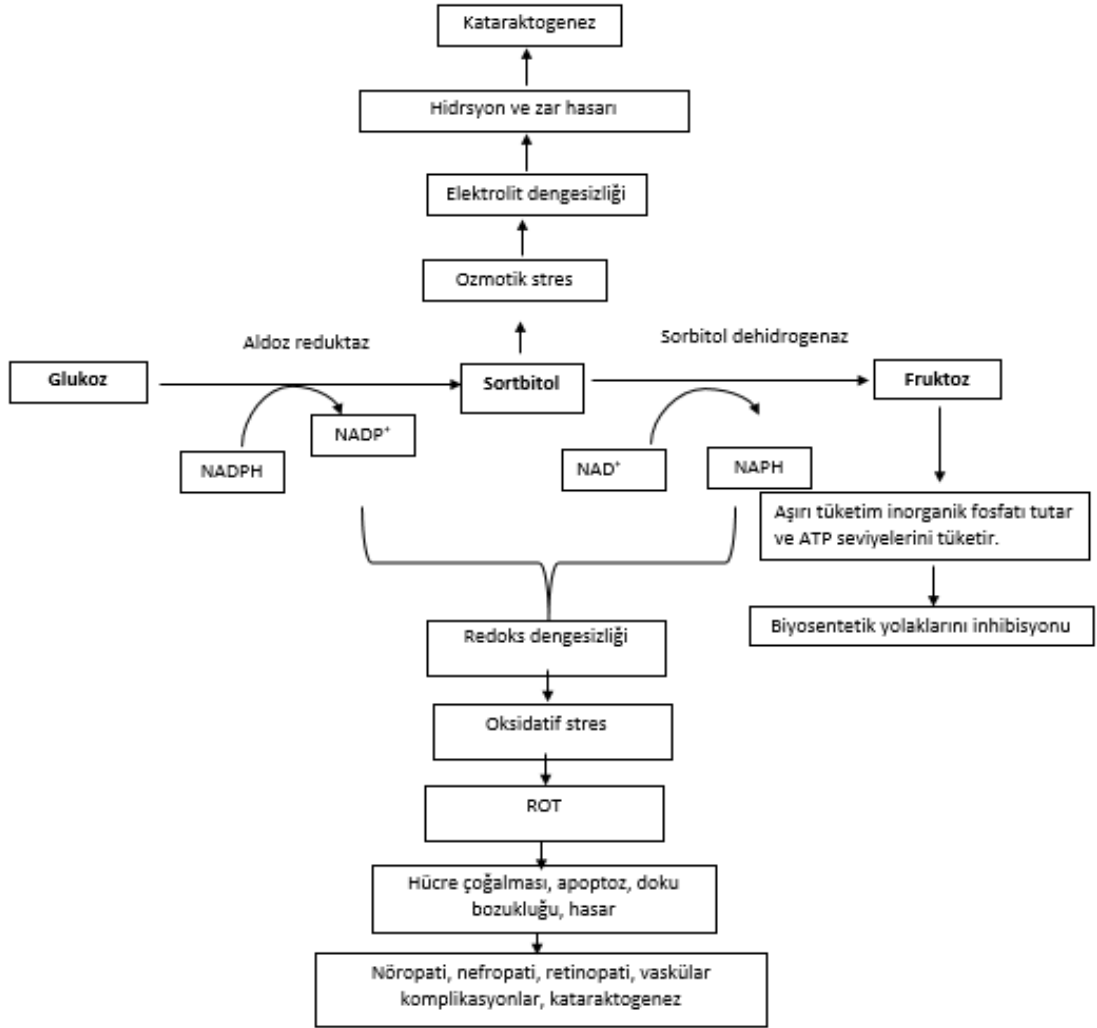
Kanser, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patoloji, gelişimlerinde oksidatif stresin müdahalesini içerdiği ortaya konulmuştur. Diyabet, dünya nüfusunun milyonlarcasını etkileyen metabolik bir hastalıktır. 2015 yılına kadar yaklaşık 415 milyon yetişkinin bu hastalıktan etkilendiği tahmin edilmektedir ve 2040 yılına kadar yaklaşık 642 milyon kişinin diyabet geliştireceği tahmin edilmektedir (Thakur vd. 2021). 2017 yılında yayınlanan Uluslararası Diyabet federasyonu raporuna göre, Dünya çapında diyabet mellitus salgını 2017 yılında 425 milyon kişiyi etkiledi ve diyabetli insan sayısının 2045 yılına kadar 629 milyona çıkması beklenmektedir. Diyabet ayrıca oksidatif stresle bağlantılı olabilen bir patolojidir. Oksidatif stresin kontrol edilmesi, diyabet tedavisinde açıkça potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, diyabet ve

diyabet komplikasyonlarının patogenezi ve ilerlemesini önlemek ve geciktirmek için yeni antioksidan dağıtım yaklaşımları ve ROS kaynaklarının kesin ilaç hedeflemesi ve redoks modifikasyonları geliştirmek gereklidir (Zhang vd. 2020). Gerçekten de, çeşitli patojenik mekanizmalar oksidatif strese bir artışa yol açar ve diyabet komplikasyonlarının başlamasında rol oynamaktadır (Defraigne 2005). Şeker hastalığının sırasında artan aldoz redüktaz (AR) ve NADPH oksidaz (NOX) aktiviteleri, ROS birikmesini teşvik etmektedir (Paul vd. 2019).

Aldoz redüktaz, glikozun sorbitole dönüşümünü katalize eden ve sorbitol dehidrojenaz tarafından fruktoza dönüştürülen bir enzimdir. Aldoz redüktazın aşırı aktivitesine bağlı olarak sorbitol birikimi, katarakt, nefropati, nöropati ve retinopati gibi diyabet komplikasyonlarına sebep olmaktadır (Kim vd. 2017). Poliol yolundaki akıştaki artış, lens liflerinde su birikmesine neden olan abartılı bir sorbitol oluşumuna yol açmaktadır. Lensin liflerinde bu su birikmesi, diyabetli kişilerde katarakt oluşturmaktadır. Bu şeker hastalarında, yüksek glikoz üretimi, glikozun glukozden sorbitole dönüşümünü katalize eden bir enzim olan aldoz redüktazın aktivitesinde bir artışa neden olmaktadır.

Bu mekanizma, iki reaksiyondan oluşan poliol yolunda meydana gelir. Bu reaksiyonlar, aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrojenaz (SDH) olan iki enzim tarafından katalize edilmektedir. Aldoz redüktaz tarafından glikozun sorbitole indirgenmesi kofaktör olarak NADPH'yi gerektirirken, sorbitol dehidrojenaz NAD⁺'dan NADPH'yi yeniden üreterek sorbitolün fruktoza indirgenmesini sağlamaktadır (Mathebula 2015). Poliol yolu, hiperglisemi durumunda bir alternatiftir, aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrojenaz yardımıyla glikozun diğer şekerlere indirgenmesini sağlamaktadır. Ancak SDH üretiminin düşük olduğu retina dokuları gibi bazı dokularda hiperglisemi sorbitol birikimini oluşturmaktadır. Bu nedenle, sorbitol ve NADPH'nin aşırı üretimi yoluyla poliollerin yolu, retinopatide anahtar rol oynayan ozmotik ve oksidatif strese neden olmaktadır (Li vd. 2019). Öte yandan, SDH'nin aşırı üretimi, 3-deoksiglukoz ve fruktoz-3-fosfat gibi glikasyon ajanları üretebilen fruktoz birikimine yol açmaktadır. SDH'nin hiperaktivitesine bağlı olarak aşırı fruktoz üretiminin, proteinlerin ani asetilasyonuna neden olan asetil-CoA üretimini arttırdığı da bildirilmiştir. Ek olarak, artan fruktoz üretimi, çoğu durumda diyabetik hastalarda yüksek olan albümin gibi belirli maddelerin

glukasyonunu arttırmaktadır (Chang vd. 2019). Tüm bu etkiler veya metabolik sonuçlar, poliöl yolunun fazına müdahale eden aldöz redüktözü birçok araştırmanın hedefi haline getirmektedir. Bu nedenle diyabet komplikasyonlarını önlemek için aldöz redüktaz inhibitörleri (ARI) adı verilen çeşitli ilaçlar araştırılmakta ve diyabet komplikasyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır.

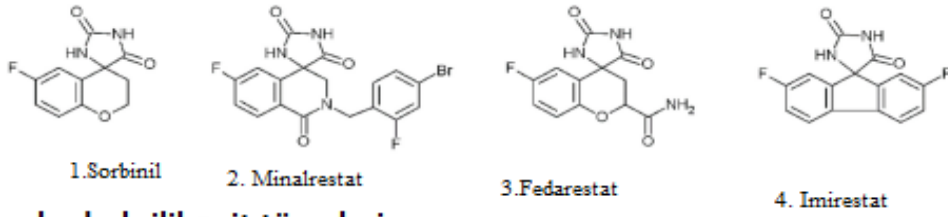


Şekil 2.9 Diyabetik komplikasyonlarda poliöl yolunun rolü (Srivastava vd. 2005).

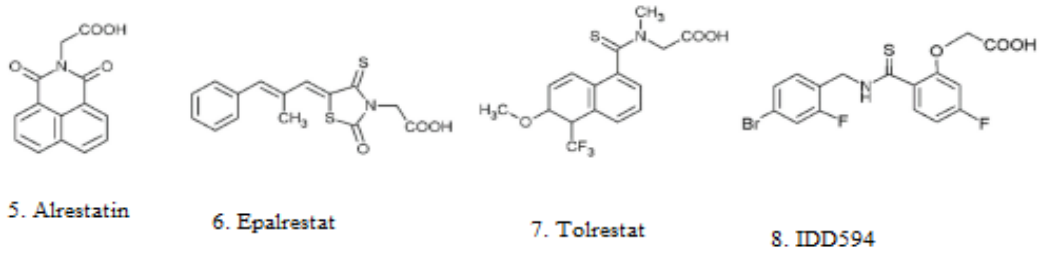
Aldöz redüktaz inhibitörleri (ARI'ler), glukoz alımının insülden bağımsız olduğu nöral, glomerüler ve retinal dokular gibi belirli dokularda diyabet komplikasyonlarını tedavi etmek için geliştirilmiştir. Ancak diğer araştırmalar, ARI'lerin kullanımının kas dokusu gibi diğer dokular üzerinde yan etkileri olduğunu göstermiştir (Zhu vd. 2013). Bu nedenle

daha az yan etkiye sahip aldoz redüktaz inhibitörlerinin keşfi elzem hale gelmektedir. Aldoz redüktaz inhibitörleri olarak en yaygın olarak kullanılan karboksilik asit türevleridir. Karboksilik asitlerin türevlerinden biri olan Tolrestat piyasaya sürülmüştür, ancak karaciğer üzerinde şiddetli ve sıklıkla öldürücü toksisitesi nedeniyle geri çekilmiştir (Zhu vd. 2013).

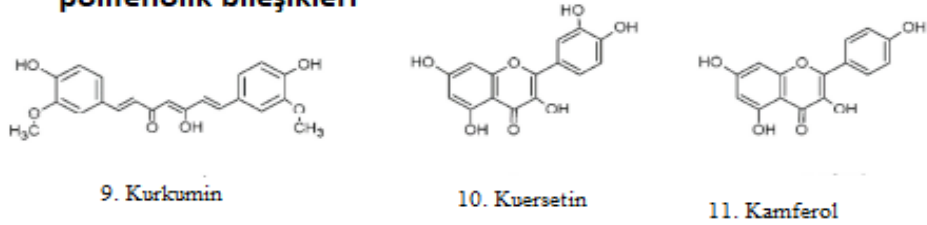
Döngüsel imidler



karboksilik asit türevleri



polifenolik bileşikler

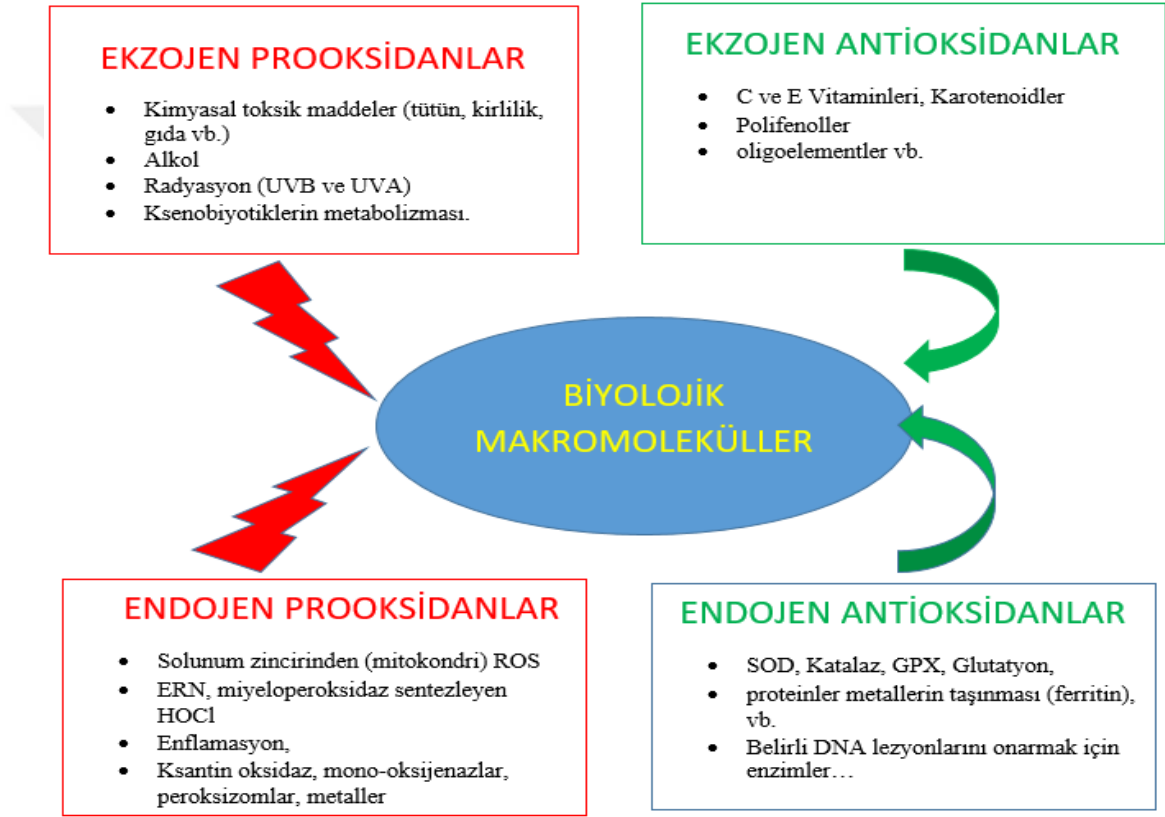


Şekil 2. 10 Aldoz redüktaz inhibitörlerinin klasik örneklerinin yapıları (Balestri vd. 2022)

2.6 Reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmaları

Canlı organizmaların serbest radikallere karşı çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Bu savunma mekanizmaları 3 veya 4 kategoriye ayrılabilir. İlk savunma hattı, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-s-transferazı içeren enzimatik mekanizma ile ilgilidir. İkinci savunma hattı, askorbik asit, glutatyon, tokoferol vb. İçeren enzimatik olmayan savunma sistemiyle ilgilidir. Bu moleküller, elektron verici güçleri

sayesinde serbest radikalleri nötralize edebilmektedir. Üçüncü savunma hattı kategorisi, biyomoleküllere ve hücre zarlarına verilen serbest radikal hasarından sonra gelmektedir. Bu mekanizma, polimerazlar, nükleazlar, proteazlar ve peptidazlar gibi belirli enzimler tarafından sağlanmaktadır (Ighodaro ve Akinloye 2017). Dördüncü savunma hattı, moleküllerin oksidasyonunu önlemek için antioksidan sinyallerin oluşturulması olabilir. Bu antioksidan potansiyeli oluşturan elementler, kimyasal yapılarına (protein veya değil) ve endojen veya eksojen kökenlerine göre (örneğin gıda katkısı) ayırt edilebilir.

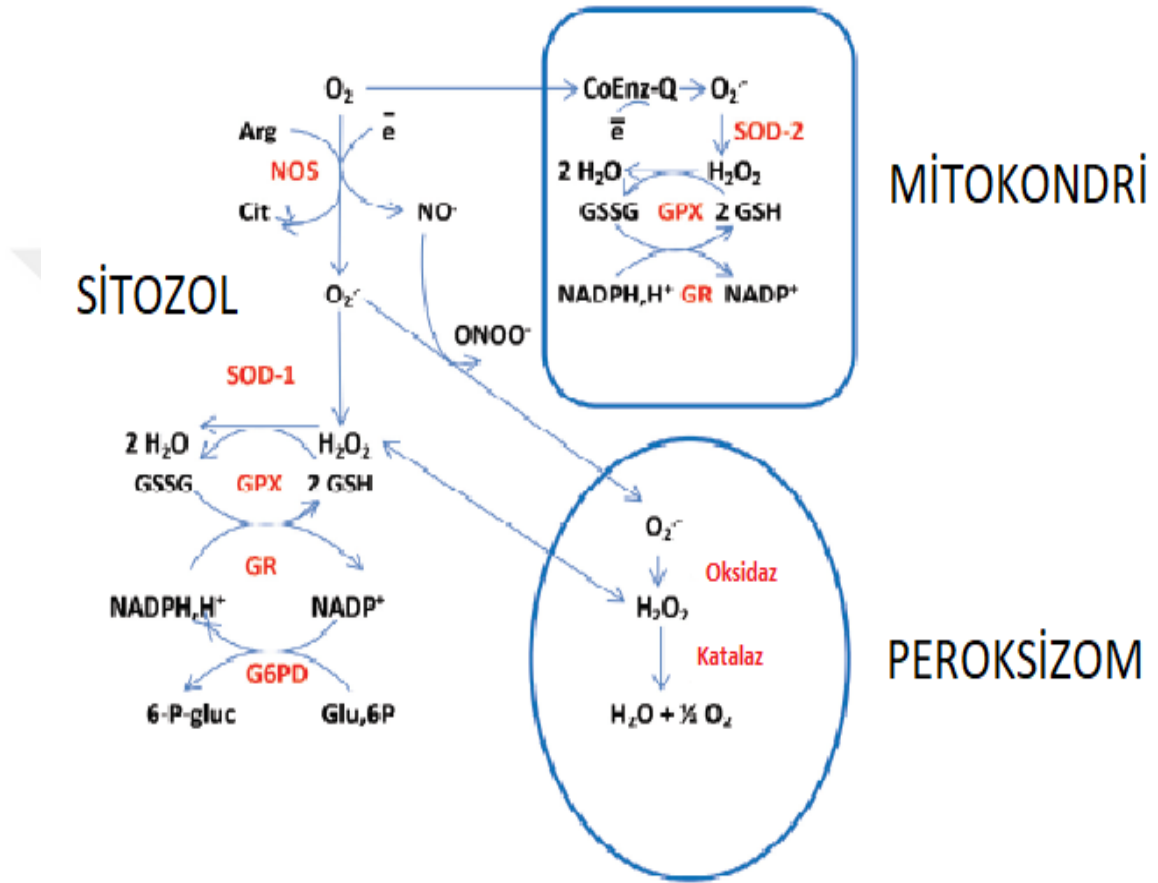


Şekil 2.11 Ana prooksidanlar ve antioksidanlar (Badouard 2006)

2.6.1 Enzimatik antioksidanlar

Antioksidan savunmanın enzimatik mekanizması, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz ve bazen glutasyon-s-transferaz gibi çeşitli enzimlerin müdahalesini içerir. Süperoksit dismutaz hem mitokondride, hem sitozolde hem de hücre dışı ortamda bulunur. Bu enzimler genellikle içerdikleri metalin türüne göre farklılık gösterir.

Glutatyon peroksidaz, mkitokondride ve sitozolde bulunur. Katalaza gelince, esasen hücrenin detoksifikasyonunu sağladığı peroksizomda bulunur. Antioksidan sistemin bu üç enzimi bir zincir halinde çalışır, süperoksit dismutaz süperoksit anyonu hidrojen peroksite, glutatyon peroksidaza ve katalaz onu H₂O'ya dönüştürür (Migdale ve Serres 2011).



Şekil 2.12 ROS'un ana hücresel kaynakları ve oksidatif strese karşı koruyucu enzimler (Baudin 2020).

2.6.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz, ilk detoksifiye edici enzimdir, süperoksit anyonunun aşırı üretimi durumunda müdahale eder. Bu enzim ailesi, oksijene reaktif türlere karşı enzimatik savunma sisteminin ilk satırında yer almaktadır. Süperoksit anyonunun hidrojen peroksite orantısızlığını katalize ederler. süperoksit dismutazlar, süperoksitin oksijen ve hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden bir enzim sınıfıdır. Süperoksit dismutaz ailesi,

ROS'un zararlı etkilerine karşı hafifletmede önemli bir fizyolojik rol oynar (Griess vd. 2017). Lokalizasyonları veya Aktif bölgelerinde bulunan metalik iyonlar açısından farklılık gösteren beş tane SOD tanımlanmıştır (Shang-Jun vd. 2012). ROS sinyalinin bölümlere ayrılması nedeniyle, hücre dışı boşluktaki tek süperoksit dismutaz olan EcSOD, hücrel sinyal iletiminde benzersiz özelliklere ve işlevlere sahiptir.

Bakır/çinko içeren hücre içi SOD: Bu tip enzim sitozolde ve ayrıca bazı bitkilerin kloroplastlarında bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, SOD1'in, ROS'un varlığı nedeniyle oksidatif stres tarafından işlevi bozulan genlerin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Xiang vd, 2019). Bu nedenle, memelilerin birçok fonksiyonel geninde hidrojen peroksite duyarlı bir protein görevi görmektedir.

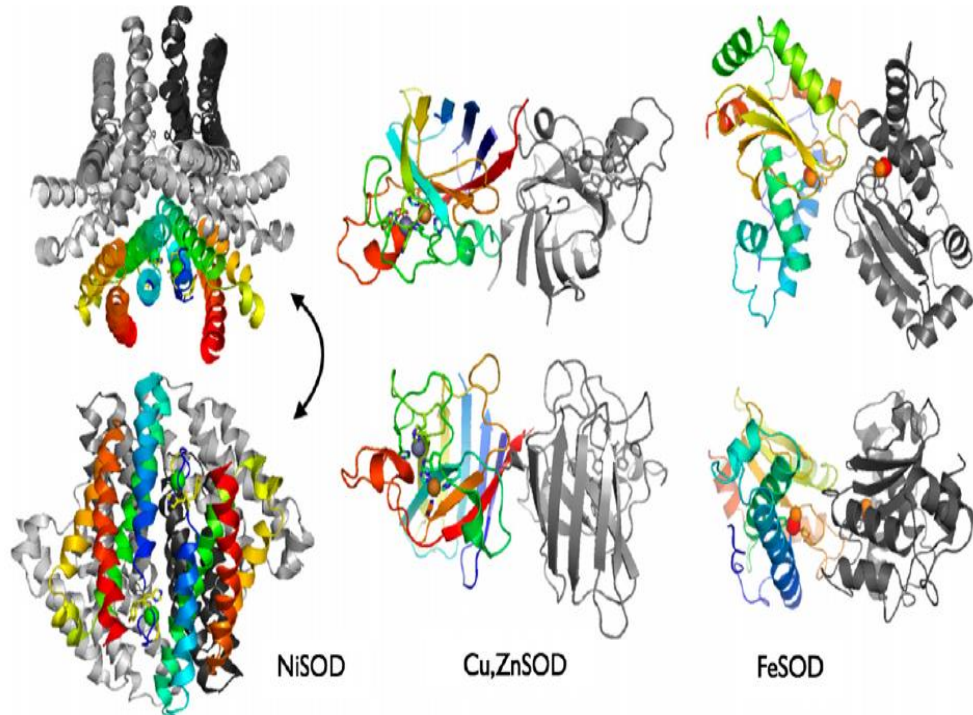
Bakır/çinko içeren hücre dışı SOD: Bu enzim hücre dışı sıvılarda ve hücreler arası boşluklarda bulunur. ECSOD, CuZnSOD tipi gibi, katalitik kofaktörler olarak bakır ve çinko kullanır, hücre dışı ortamda bulunması ve çeşitli dokuların hücre dışı matrisinde dağıtılması nedeniyle ikincisinden farklıdır (Marklund 1982). Hücre dışı SOD varlığı süt, plazma, sinovyum ve lenfte de saptanabilir. ECSOD ayrıca akciğerler, kalp, böbrekler, plazma, lenf, asit ve beyin omurilik sıvısı gibi belirli hücre tiplerine ve spesifik dokulara özel görünmekte ve SOD'nin toplam aktivitesinin %7'sini kaplamaktadır (Marklund 1982). Salgılandıktan sonra, pozitif yüklü heparin bağlama alanı (HBD) aracılığıyla hücre yüzeyi proteoglikanlarına bağlanır (Griess vd. 2017). Hücre dışı süperoksit dismutaz, hücreler arası sinyalleşmede önemli bir rol oynar. Artan hücre dışı SOD aktivitesi, oksidatif strese ve birçok patolojinin neden olduğu hasara karşı koruma sağlar. Dayanıklılık egzersizi, ROS ve oksidatif hasarla mücadele etmek için dolaşım yoluyla periferik dokulara yeniden dağıtılabilen iskelet dokusundaki EcSOD bolluğunu arttırmaktadır (Yan ve Spaulding 2020).

Manganez içeren SOD (Mn-SOD): Mn-SOD'lar bakterilerin sitozolünde, daha yüksek organizmaların mitokondrilerinde, kloroplastlarda ve ayrıca belirli ökaryotik hücrelerin sitozolünde bulunur (Keele vd. 1970). Filogenetik çalışmalar, Mn-SOD'nin yaşamın her alanında, ökaryotların mitokondrisinde ve birçok bakterinin sitoplazmasında bulunduğunu göstermektedir.

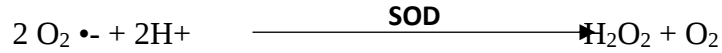
Demir içeren SOD (Fe-SOD):Fe-SOD, evrim sırasında büyük ölçüde korunan ve canlı organizmaların hayatta kalmasındaki temel rolünün altını çizen bir enzimdir. Fe-SOD geni, ilkel ökaryotlarda, bakterilerde ve bitki plastidlerinde keşfedilmiştir (Smith ve Doolittle 1992). Fe-SOD, demiri biyolojik bir ortamda tutma eğilimi nedeniyle demir şelatlama etkisine katkıda bulunur.

Nikel içeren SOD :Nikel süperoksit dismutaz, siyanobakteriler, aktinobakteriler gibi bazı mikroorganizmalarda keşfedilmiştir (Eitinger 2004). Bununla birlikte, NiSOD ilk kez streptomyces'te keşfedilmiştir. NiSOD'un sadece aktinobakteriyel türlerde değil, aynı zamanda dikkate değer patojen türleri, zorunlu hücre içi patojenler klamidya ve yeşil algleri içeren proteobakterilerde de meydana geldiği bildirilmiştir (Youn vd. 1996). NiSOD, olgun enzimde ortadan kaldırılan 14 kalıntılı bir N-terminal asit pro-dizisi içeren yaklaşık 120 amino asitlik bir proteindir (Schmidt vd. 2009).

Farklı SOD aileleri, sadece aktiviteyi destekleyen metal iyonu, hücresel lokalizasyon açısından değil, aynı zamanda protein katlanması açısından da farklılık göstermektedir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Üç SOD ailesini karakterize eden şerit yapılarının karşılaştırılması (Miller 2012)



2.6.1.2 Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksiti suya parçalayan bir antioksidan enzim ailesidir. Glutasyon peroksidaz enzimi mitokondri ve sitozolde bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz enzimler, selenyum içeren ve selenyuma bağlı olmayan enzimler olarak sınıflandırılmaktadır. Günümüzde en az 8 tane Gpx izoenzim tanımlanmıştır (Aslankoç vd. 2019). Gpx-1, Gpx-2, Gpx-3, Gpx-4, Gpx-5, Gpx-6, Gpx-7 ve Gpx-8 olarak adlandırmıştır. GPx-1 neredeyse her dokuda bulunur ve selenyuma bağlı bir şekilde çalışmaktadır. GPx-2 gastrointestinal sistemleride yer alan bir enzimdir. Gpx-2 spesifik olarak böbreklerde görev alır ve glukoprotein olarak hücreler arasındaki sıvılara salgılamaktadır. Gpx-4 enzimi ise fosfolipidlerde hidroperoksit seviyesini azalan bir enzimdir. Bu Glutasyon peroksidaz izozimi apoptotik süreçlerde ve spermatozoit olgunlaşmasında rol oynamaktadır. GPx5 ve GPx6 selenyum içermez ancak GPx6 insan gen araştırmalarında selenoprotein olarak tanımlanmıştır. GPx7 ve GPx8 selenyumdan bağımsız hidrojen peroksit temizleyicisi olarak görev yapmaktadır (Aslankoç vd. 2019). Glutasyon peroksidaz, glutasyon enzim sisteminin (glutasyon redüktaz (GR), glutasyon (GSH) ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) etkisiyle hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Farklı GPX türleri, bunların yerleri ve bunların katalizör kalıntıları aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Memeli hücrelerinde glutasyon peroksidaz (GPx) izoformları (Kim ve Jang 2019)

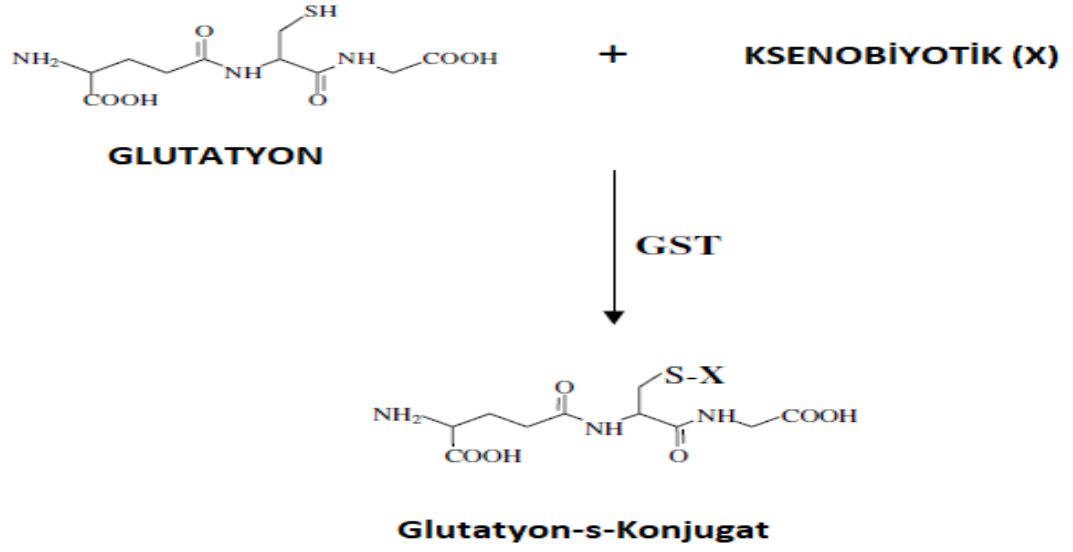
isoformlar	Lokalizasyon	Katalitik Kalıntı
GPX1	Sitozol	Selenosistein
GPX2	Gastrointestinal	Selenosistein
GPX3	Plazma	Selenosistein
GPX4	Fosfolipid hidroperoksid	Selenosistein
GPX5	epididim lümen	Sistein
GPX6	Olfaktif doku	Selenosistein
GPX7	Endoplazmik retikulum	Sistein
GPX8	Endoplazmik retikulum	Sistein

2.6.1.3 Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalaz (CAT), esas olarak peroksizomda ve mitokondri'de üretilen bir antioksidan enzimdir. Mayada, sitozolde bulunan katalaz T (CatT) ve peroksizomlarda ve mitokondride bulunan katalaz A (CatA) olmak üzere iki tip katalaz vardır. Peroksizom katalaz A (catA), peroksizomal yağ asitlerinin b-oksidasyonu sırasında üretilen H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlar ve mitokondride mitokondriyal süperoksitin su ve O_2 'ye ayrışmasını sağlar (Zadrag-Tęcza vd. 2018) Katalaz, hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunan antioksidan sistemin proteinlerinden biridir. Vücudun en büyük sindirim bezi olan karaciğer başta olmak üzere çeşitli hayvan organlarında yaygın olarak bulunur. Katalazın çeşitli tıbbi senaryolarda yer aldığı bilinmektedir ve seviyeleri bu kapasitede bir belirteç görevi görmüştür. Hatta birkaç ilaca dahil edilmiştir. (Chen vd. 2018). Hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesine sağlamaktadır. Katalaz böylece oksidatif stres durumunda hücrenin detoksifikasyonunu oynar. Yaklaşık 500 amino asitten oluşan dört polipeptit zincirinden oluşmaktadır.

2.6.1.4 Glutasyon-S-transferaz (GST)

Glutasyon-s-transferaz, hücre detoksifikasyonundaki rolü ile bilinen bir enzimdir. Glutasyon S-transferaz (GST), detoksifikasyon metabolik yolunda son ürün olan merkapturik asit oluşumundaki ilk basamağı katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir. Bu basamakta, Glutasyon (GSH) ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofilik bileşiklerin bağlanması gerçekleşmektedir. GST'ler, ksenobiyotik detoksifikasyon, oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesi, protein taşınması, hücre proliferasyonunun modülasyonu ve apoptoz sinyal yolunun indüklenmesi dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonda yer alır. Glutasyon-s-transferazın ksenobiyotik partiküllerle konjugatlar oluşturma yeteneği aynı zamanda ona antioksidan özellikler de verir. Bu enzim, reaktif oksijen türleri ile konjugatlar oluşturabilir ve hücrenin oksidatif strese maruz kalma riskini azaltır.

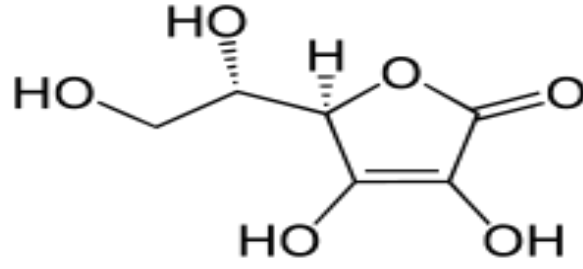


Şekil 2.14 GST yoluyla ksenobiyotik ve glutatyon arasında konjugat oluşumu (Townsend ve Tew 2003)

2.6.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.6.2.1 C vitamini

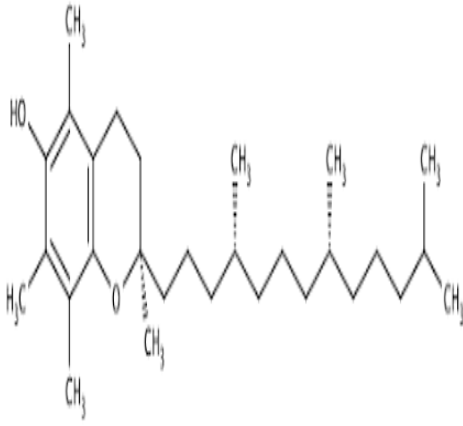
Askorik asit veya askorbat olarak da adlandırılan C vitamini, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. Bu vitamin, oksidatif stresin ana nedenleri olan serbest radikallerin toksik etkilerini nötralize etmek için elektron bağışlama kabiliyeti sayesinde antioksidan etkileri ile bilinmektedir. C vitamini çoğu memeli tarafından sentezlenebilir, ancak sentezi için gerekli L-gulonolakton oksidaz enzimine sahip olmayan insanlar diyetleriyle sağlanmalıdır (Nishikimi ve Yagi 1991). C vitamini tüm dokularda bulunur ve özellikle kornea epitelinde, kök hücrelerde ve nöronlarda bol miktarda bulunmaktadır. Glutatyondan daha yüksek bir anti-serbest radikal aktiviteye sahip gibi görünmektedir çünkü glutatyondan 100 kat daha fazla ROS ile reaktif kapasiteye sahiptir (Zhitzkovich 2020). Askorbik asit ayrıca, süperoksit dismutaz aktivitesinin hemen hemen hiç olmadığı çekirdekte O₂'nin eliminasyonunda önemli bir rol oynar gibi görünmektedir.



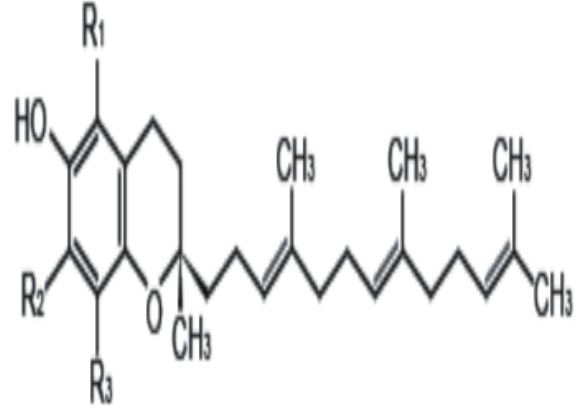
Şekil 2.15 C vitamin genel yapısı

2.6.2.2 E vitamin

E vitamini genellikle bitkilerde, özellikle sebzelerde, tahıllarda ve tohumlarda bulunur. Hem bir chonomanol halkasına hem de bir hidrokarbon zincirine sahip olan tokoferoller ve tokotrienoller içerirler. Tokoferoller ve tokotrienoller arasındaki fark, tokoferollerin doymuş bir zincire, tokotrienollerin ise çift bağ içeren bir zincire sahip olmasından kaynaklanmaktadır. E vitamini, Benzen halkalarına bağlı metil veya proton gruplarına göre α , β , γ ve δ olarak bilinir ve en yaygın ve biyolojik olarak aktif formu alfa-tokoferoldür (Brigeliuss-Flohe ve Traber. 1999). E Vitamini, serbest radikalleri temizleme özelliği sayesinde antioksidan bir rol oynar, böylece mitonkondriyal disfonksiyonu ve bazı nörodejeneratif hastalıklar sırasında görülen nörotoksik etkileri azaltmaktadır (Numakawa vd. 2006, Park vd. 2019). Tokotrienoller, lipitten zengin biyolojik membranlarda güçlü antioksidan kapasite sergiler ve beyin gibi lipitten zengin organlarda ROS'a karşı korumada etkili oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle tokotrienoller, nöronları oksidatif stresle ilişkili hasara karşı koruyacaktır. Birincil hipokampal nöronların α -tokotrienol ile tedavisi, ROS'un toplam ve mitokondriyal birikimini önler ve α -tokotrienol, antiapoptotik Bcl-Xl'in işlevlerini geliştirmek için Bcl-xL'nin glutamat kaynaklı post-translasyonel bölünmesini zayıflatır (Park vd. 2017). E vitamini, çok sayıda enflamatuvar veya oksidatif bileşen patolojisinin tedavisinde kullanılmaktadır. Tip 2 diyabet tedavisinde E vitamini takviyesi, antoksidan özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir (Vincenzo vd. 2019).



Tokoferol

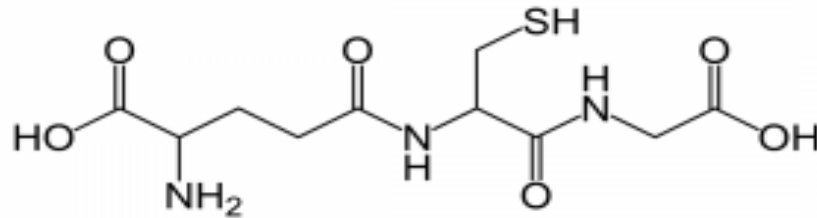


Tokotrienol

Şekil 2.16 E vitaminlerini içeren tokoferol ve tokotienol kimyasal yapıları

2.6.2.3 Glutasyon

Glutasyon, vücut tarafından doğal olarak üretilen bir proteindir. Üç amino asitten oluşan bir tripeptittir: glutamat (glutamik asit), sistein ve glisin. Glutasyon, tüm hücrel bölmelerde bulunan önemli bir bileşendir. Reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. Glutasyon endojen antioksidanlardan biridir, hidrojen peroksiti detoksifiye eder ve glutasyon peroksidazın etkisiyle lipidlerin peroksidasyonunu önlemektedir. indirgenmiş glutasyon, protonları lipidlere bağışlar ve onları reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasardan korumaktadır. H_2O ve O_2 'ye indirgemek için bir elektron H_2O_2 bağışlayabilir. Glutasyon, glutasyon peroksidaz (Gpx) ve glutation-s-transferaz (GST) gibi antioksidan savunmada yer alan belirli enzimler için bir kofaktör görevi görmektedir.



Şekil 2.17 Glutasyon kimyasal yapısı

2.6.2.4 Selenyum

Selenyum (Se), insanlar ve hayvanlar için temel bir elementtir. Antioksidan metabolizmada, tiroid hormonu üretiminde ve bağışıklık sisteminin korunmasında temel bir rol oynayan selenoproteinlerin bir bileşeni olarak hareket eder (Rayman 2012). Bilinen işlevleri olan selenoproteinler, çeşitli biyolojik işlemlerde kritik bir rol oynar ve bunların birçoğu antioksidan savunmada yer almaktadır. Örneğin, ilk tanımlanan selenoprotein olan sitozolik glutatyon peroksidaz dahil olmak üzere dört glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit, serbest yağ asidi hidroperoksitleri ve fosfolipid hidroperoksitleri azaltarak hücreleri peroksidatif hasara karşı korumaktadır. Selenyum, süperoksit dismutaz, katalaz ve askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır ve hidrojen peroksit ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonunu azaltmaktadır (Silva vd. 2018). Selenyum glutatyon peroksidaz enzimin bir ko-faktörüdür. Böylece glutatyon peroksidaz bir antioksidan enzim olarak yapısında bulunan selenyum kalıntı da antioksidan aktivitesine katkıda bulunmaktadır. Selenyum, çeşitli antioksidanların yapısal yönüne katılmasıyla ayırt edilir. Glutatyon peroksidaz dışında selenosistein oluşumuna katkıda bulunur ve antioksidan savunmada görev alan bir enzim olan tioredoksin redüktaz tarafından kullanılmaktadır. Vücutta selenyum eksikliği, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stresin neden olabileceği hastalık riski ile ilişkilidir (Brenneisen vd. 2005).

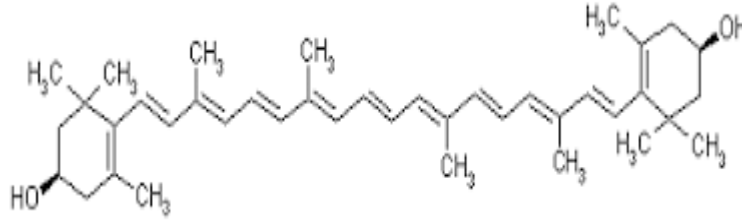
2.6.2.5 Doğal antioksidanlar

Antioksidanlar, pro-oksidanlarla savaşarak vücudun oksidatif dengesini korumaya yardımcı olan bileşiklerdir. Bu bileşikler veya moleküller endojen (vücut tarafından üretilir) veya eksojen (gıda veya ilaç olarak sağlanır) kökenli olabilir.

2.6.2.5.1 Karotenoidler

Karotenoidler, hidroksil, süperoksit ve peroksil radikalleri ile reaksiyona giren singlet oksijeni (bozulma olmadan) inaktive ederek lipidleri peroksidatif hasara karşı korur. Fenolikler ve diğer antioksidanlara kıyasla karotenoidler, peroksil radikallerinin özellikle

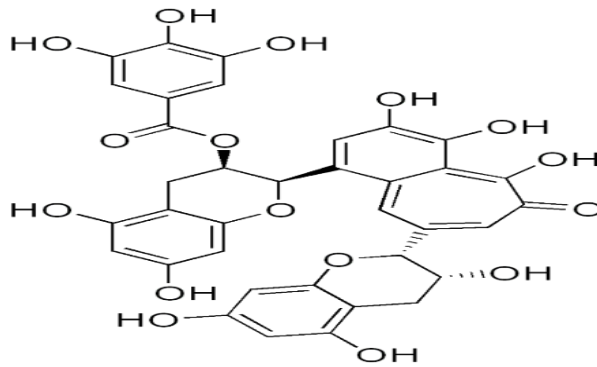
iyi söndürücüleri değildir, ancak diğer fenoliklerin ve antioksidanların çoğunun nispeten etkisiz olduğu tekli oksijeni söndürmede olağanüstüdürler (Nunes vd. 2012).



Şekil 2.18 Karotenoidler kimyasal yapısı

2.6.2.5.2 Fenolik bileşikler

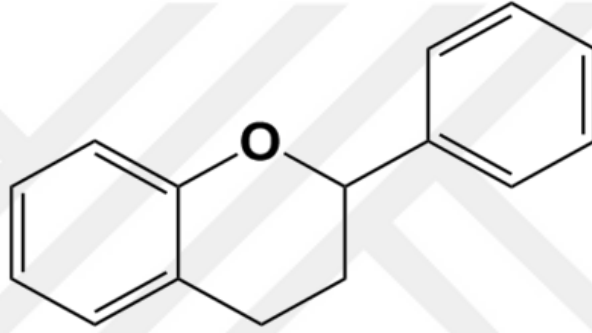
Polifenoller, birkaç fenol grubunun ve altı üyeli bir hidrokarbon halka yapısının varlığı ile karakterize edilir. Fenol gruplarının, hidrokarbon zincirinin ve ek fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlı olarak polifenoller ayrıca flavonoidler, izoflavonoidler, curcuminoidler, tanenler ve stilbenoidler dahil olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır. Bu bileşikler, güçlü antienflamatuar ve antioksidan özellikleriyle bilinir. Polifenollerin antioksidan özellikleri, ROS moleküllerini süpürme, prooksidan genlerin ekspresyonunu inhibe etme ve SOD'lar ve katalazlar gibi antioksidan genlerin ekspresyonunu artırma kapasitesinde bulunmaktadır.



Şekil 2.19 Fenolik bileşiklerin genel yapısı

2.6.2.5.3 Flavonoidler

Flavonoidler, fenolik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır ve güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidlerin antioksidan özelliği, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri açısından incelenen ilk etki mekanizmasıdır. Flavonoidlerin, singlet oksijen ve çeşitli serbest radikaller dahil olmak üzere çoğu oksitleyici molekül için oldukça etkili süpürücüler olduğu gösterilmiştir (Bravo 1998). Flavonoidler, C-4'te bir karbonil karbonunun, C-3'te bir OH grubunun, C-2 ve C3 arasında doymuş bir tek bağın varlığına dayalı olarak flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanollere bölünmektedir.



Şekil 2.20 Flavonoidlerin genel yapısı

2.7 Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik etkileri

Oksijen reaktif türler canlı organizmalar için tehlikeli olarak görülse de fizyolojik roller de oynamaktadırlar. Fizyolojik koşullar altında, ROS ve RNS orta konsantrasyonlarda üretilir ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşim yoluyla hücre sinyalizasyonu, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz ve gen ekspresyonunda önemli roller oynar. Ayrıca ROS, onları patojenleri öldürmek ve enfeksiyonlarla savaşmak için kullanan fagositler tarafından üretilir (Poljsak vd. 2013). Fagositler, fagositoz sürecinde ve mikrop ve bakteri gibi yabancı cisimlerin uzaklaştırılmasında serbest radikaller kullanmaktadır. Serbest radikaller, ikinci haberciler olarak hareket ettikleri belirli sinyalleşme mekanizmalarında yer almaktadırlar. Örneğin hidroksil radikali, guanilat silazın aktivasyonunu ve siklik guanozin monofosfatın oluşumunu indükler (Mittal ve Murad 1977). Serbest radikaller, nötrofiller tarafından bağışıklık savunma sisteminde kullanılabilir. Bakteriyel

enfeksiyonda nötrofiller, süperoksit anyonu üretmek için NAPH oksidaz kullanarak bakterileri öldürür. Öte yandan, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve asit hipoklorür gibi bazı oksijen-reaktif türlerin fagositik hücrelerin aktivasyonunu tahmin ettiğine inanılmaktadır. Oksijen reaktif türler, düşük dozlarda, insülin salınımına neden olan sinyal molekülleri olarak hizmet ederek kan şekerinin düzenlenmesinde rol oynayabilir (Czech vd. 1974).

2.8 Zeytinyağı

Dünya genelinde zeytin ağacı yetiştiriciliği son yıllarda çok önemli bir evrim geçirmiş, zeytin ağacı artık dünyanın neredeyse tüm bölgelerinde yetiştirilmektedir. Dünyada, yaklaşık her yıl 3 milyon ton zeytiyağı üretilmektedir (Durlu vd. 2018). Zeytinyağı tüketimi son yıllarda büyük bir artış göstermektedir. Ancak dünya çapında zeytinyağı üreten ülkeler az görülmektedir. Söz konusu ülkelerin büyük kısmı güney Asya'da ve akdeniz kenarında yer alan ülkelerdir.

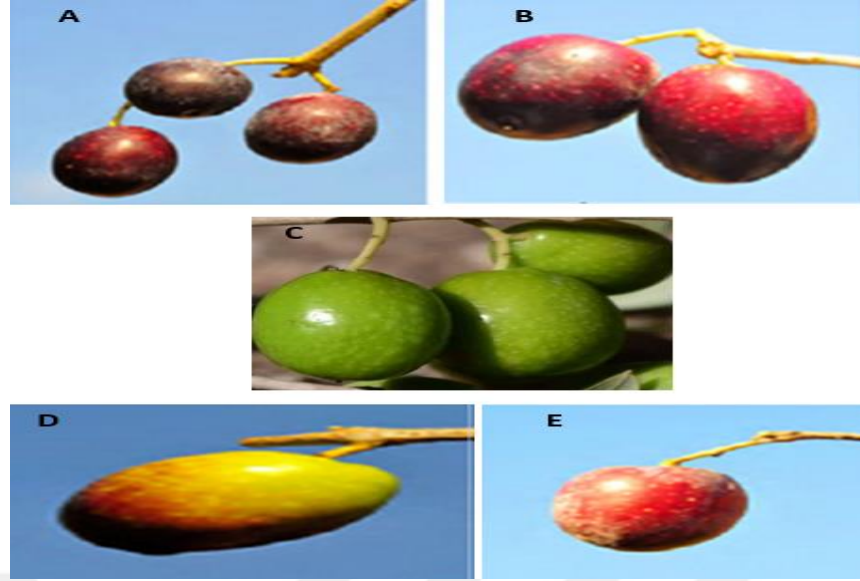
2.8.1 Zeytin ağacının coğrafi dağılımı

Zeytin ağacı, Güney Asya'dan Güneydoğu Anadolu bölgesine kadar Yukarı Mezopotamya'ya özgü bir ağaçtır. Yıllar içinde zeytin ağacının dağılımı Tunus'tan Fas, Mısır, Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya kadar uzanmıştır. Zeytin ağaçları ayrıca Pakistan'da, Çin'in bazı bölgelerinde ve İran'da da bulunur. Günümüzde dünyada yaklaşık 40 ülkede zeytin yetistirildiği rapor edilmiştir (Durlu Özkaya ve Özkaya 2017). Zeytin ağacı her iklimde yetişebilen bir ağaçtır. Zeytin ağacı su ihtiyacı ortalama 600-1000 mm olmasına rağmen 100 mm / yıl kayıt yapabilen neredeyse çöl iklimlerine uyum sağlayabilmektedir. Zeytin ağacının ekonomik olarak yetiştirilme sınırları deniz seviyesinden 600 m'nin üzerinde, -7 derecelik sıcaklıklar ve yüksek yeraltı suyudur. Zeytin ağacı yavaş gelişen bir bitkidir ve uzun süre yaşayabilir, bir zeytin ağacının ortalama yaşı 300-400 yıldır.

Akdeniz ile sınırlarını paylaşan tüm ülkeler gibi Türkiye de önemli sayıda zeytin ağacına sahiptir. Türkiye'de zeytin yetiştiriciliği Akdeniz iklimine benzer iklime sahip yerlerde yapılmaktadır. Böylece Marmara (Çanakkale, Bursa, Bilecik, Sakarya, Kocaeli, İstanbul, Yalova, Tekirdağ, Eskişehir), Ege (Balıkesir, Manisa, İzmir, Aydın, Muğla), Akdeniz (Antalya, Isparta, Bureldur, İçeldur, Adana , Osmaniye, Hatay, Kahramanmaraş, Karaman) bölgeleri ve Anadolu'nun Güneydoğu bölgesi (Gaziantep, Kilis, Adıyaman, Şanlıurfa ve Mardin) zeytin yetiştiriciliğine uygundur. Bu bölgeler Türkiye'deki zeytin üretiminin sırasıyla% 14,2,% 65,7,% 16 ve % 3,8'ini temsil etmektedir (Durlu vd. 2018). Türkiye, dünyada zeytin gen kaynakları açısından en zengin ülkelerden biridir. Dolayısıyla Türkiye’de birçok zeytin çeşidi vardır.

Çizelge 2.3 Türkiye’de Zeytin çeşitler ve yetiştirildiği bölgeleri (Dıraman 2007)

Zeytin çeşidi	Yetiştirildiği Bölge
Ayvalık, Çakır, Çekişte, Çilli, Domat, Edincik su, Erkence, İzmir Sofralık, Kiraz, Memecik, Memeli, Uslu	Ege Bölgesi
Çelebi, Gemlik, Karamürsel Su, Samanlı	Marmara Bölgesi
Büyük Topak Ulak, Sarı Haşebi, Sarı Ulak, Tavşan Yüreği	Akdeniz bölgesi
Saurani, Halhalı, Sayfı, Karamani, Elmacık, and Haşebi	Doğu Akdeniz Bölgesi
Eğri Burun, Halhalı, Kalembezi, Kan çelevi, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Yağ çelevi	Güney Anadolu Bölgesi
Samsun Tuzlamalık, Trabzon Yağlık, Hastos, Butko, Otur	Karadeniz Bölgesi



Şekil 2.21 İncelenen 5 zeytin çeşidinin meyve morfolojisi (Öztürk vd. 2021; <https://img.fidandeposu.com/tavsan-yuregi-zeytin-fidani-zeytin-fidani-1202-50-B.jpg>). A: Ayvalık; B: İzmir sofralık; C: Tavşan yüreği; D: Memecik; E: Kilis yağlık

2.8.2 Zeytinyağlarının sınıflandırılması ve özellikleri (IOC 2019)

2.8.2.1 Sızma zeytinyağlar

Natürel zeytinyağları, zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) meyvesinden sadece mekanik veya diğer fiziksel yollarla, özellikle ısı koşullar altında, yağda değişikliğe yol açmayan ve yıkama, dekantasyon, santrifüj ve filtrasyon dışında herhangi bir işleme tabi tutulmamış yağlardır.

2.8.2.1.1 Natürel sızma zeytinyağı

Natürel sızma zeytinyağı: Oleik asit olarak ifade edilen serbest asitliği 100 gramda 0.80 gramdan fazla olmayan ve diğer fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelen sızma zeytinyağıdır.

Sıradan sızma zeytinyağı: Oleik asit olarak ifade edilen serbest asitliği 100 gramda 3,3 gramdan fazla olmayan ve diğer fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelen sızma zeytinyağıdır.

Sızma zeytinyağı: Serbest asitliği, oleik asit olarak ifade edilen, 100 gramda 2.0 gramdan fazla olmayan ve diğer fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelen sızma zeytinyağıdır.

Lampante sızma zeytinyağı: Oleik asit olarak ifade edilen serbest asitliği 100 gramda 3,3 gramdan fazla olan ve/veya fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelen sızma zeytinyağıdır.

2.8.2.1.2 Rafine zeytinyağlar

Rafine zeytinyağı: Sızma zeytinyağından, başlangıçtaki gliserid yapısında değişikliğe yol açmayan rafinasyon yöntemleriyle elde edilen zeytinyağıdır. Oleik asit olarak ifade edilen, 100 gramda 0.30 gramdan fazla olmayan bir serbest asitliğe sahiptir ve diğer fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelir.

Rafine pirina yağı: Ham pirina yağından, başlangıçtaki gliserid yapısında değişikliğe yol açmayan rafinasyon yöntemleriyle elde edilen yağ. Oleik asit olarak ifade edilen, 100 gramda 0.30 gramdan fazla olmayan bir serbest asitliğe sahiptir ve diğer fiziko-kimyasal ve organoleptik özellikleri bu standartta bu kategori için belirlenenlere karşılık gelir.

Çizelge 2.4 Zeytinyağı çeşitlerine göre yağ asidi bileşimi (IOC 2019)

	Yağ asitler													Toplam transoleik izomerler (%)	Total translinoleik + translinoleik izomerler (%)	Stigma stadiyenler mg/kg (2)
Sızma zeytinyağı çeşitleri	Miristik (%)	Linoleik (%)	Araşidik (%)	Eicosenoik (%)	Behenik (%)	Lignoserik (%)	palmitik	Palmitoleik	heptadecanoik	heptadecenoik	stearik	Oleik	linoleik			
Natürel sızma zeytinyağı	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,2
Sızma zeytinyağı	≤ 0,03		≤ 1,00	≤ 0,50		≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,2
Lampante zeytinyağı	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,3
rafine zeytinyağı	≤ 0,03		≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,3
Rafine + sızma zeytinyağı	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,3
Ham prina yağı	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,6
Rafine zeytin-prina yağı	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5
Zeytin ezmesi yağı.	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	7,50-20	0,30-3,50	≤ 0,40	≤ 0,60	0,50-5	55,00-83	2,50-21	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5

Çizelge 2.5 Zeytinyağı çeşitlerine göre yağ isterol bileşimi (IOC 2019).

Sızma zeytinyağı çeşitleri	İsterol bileşimi						Toplam sterols (mg/kg)	Eritrodiol ve uvaol (%)
	Kolesterol	Brasikasterol (%)	kampesterol (%)	Stigmasterol (%)	App β -sitosterol (%)	Delta-7-stigmastenol (%)		
Natürel sızma zeytinyağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
Sızma zeytinyağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
Lampante zeytinyağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	> 4,5
rafine zeytinyağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
Rafine + sızma zeytinyağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
Ham prina yağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	> 4,5
Rafine zeytin-prina yağı	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	> 4,5
Zeytin ezmesi yağı.	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< Camp	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	> 4,5

2.8.3 Zeytinyağının kimyasal bileşimi

Zeytinyağı, çoklu doymamış yağ asitleri olarak bol miktarda oleik asit, tekli doymamış yağ asidi, linoleik ve linolenik asitler ile karakterizedir. Bu yüksek tekli doymamış yağ asitleri içeriği onu diğer bitkisel yağlardan ayırmaktadır. Zeytinyağı ayrıca fenolik bileşikler, vitaminler ve diğer küçük bileşikler içermektedir. Zeytinyağı kimyasal bileşimi ikiye ayrılır: Sabunlaşabilir kısmı gliseritler ve yağ asitleri içerir, Sabunlaşırılmayan kısmını ise aromatik bileşikler, pigmentler ve fenolik bileşikler içermektedir.

2.8.3.1 Sabunlaşılabilir fraksiyonu

2.8.3.1.1 Yağ asitler

Sızma Zeytinyağı, yağ asitleri açısından oldukça zengindir. Tekli doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir. Zeytinyağlarındaki başlıca yağ asitleri oleik (% 55–85), palmitik (% 7.5–20), linoleik (% 7.5–20), stearik (% 0.5–5), palmitoleik (% 0.3–3.5) ve linoleniktir (0.0–1.5%) asitler bulunmuştur (Lerma-Garcia 2012). Zeytinyağı ayrıca bazı eser miktarda araşidonik asit, miristik asit ve margarik asit içerebilir. Oleik asit, besleyici zenginliği ve oksidatif stabiliteyi desteklemesi nedeniyle zeytinyağlarındaki en önemli yağ asitlerinden biridir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarı ile doymuş asitlerin miktarı arasındaki oran, zeytinyağının oksidatif stabilite derecesini göstermektedir. oran yüksek olduğunda, yağın oksidatif stabilitesi düşüktür. Zeytinyağının yağ asidi bileşiminin çeşitlerine ve saklama sürelerine göre değiştiği bildirilmiştir (Kelebek vd. 2015, Amanpour vd. 2017) . Bu çalışmaya göre Memecik çeşidinde bulunan oleik asit miktarı, iki yıllık depolama süresince ayvalık çeşidinde bulunandan daha fazladır. Palmitik asit miktarı ise ayvalık çeşidinde memecik çeşidine göre daha yüksekti. Oleik asit bileşimi depolama süresine bağlı olarak bu şekilde azalmaktadır. Bazı Cezayir zeytinyağı çeşitleri (Azeradj, Chemlal, Limli) üzerinde yapılan bir araştırma, depolamanın ilk yılında, oleik asit seviyesinin% 62,28 ile% 77,03 arasında olduğunu, ikinci depolama yılında ise 73,33 ve% 60 arasında olduğunu göstermiştir. Dört Yunan sızma zeytinyağı çeşidi üzerinde yapılan bir araştırma, yağ asidi bileşiminin çeşide göre değiştiğini bildirmektedir. Bu çalışma Koroneik Megaritik,

Amfissis ve Manaki çeşitleri ile ilgilidir. Zeytin çeşidi yağ asit bileşimini, yani oleik asit (Amfissis için %75,36'dan Megaritiki için %65,81'e) ve linoleik asit (Manaki için %13,35'ten Koroneiki için %6,70'e) büyük ölçüde etkilemiştir (Revelou vd. 2021). Gürdeniz vd. (2008), 7 çeşit Türk zeytinyağı üzerinde yaptığı çalışmada, hasat döneminin yağ asidi bileşimini de etkilediğini eklemiştir. Böylece Erkence ve Gemlik-Erdmit çeşitleri birinci hasatta sırasıyla %66.44 ve %72.05, ikinci hasatta %63.57 ve %72.95 oleik asit içermektedir. Linoleik asit bileşimi ise Erkence ve Gemlik-Erdmit için birinci hasatta sırasıyla %14.95 ve %8.88, ikinci hasatta %16.89 ve %7.41'dir. Özcan vd. (2019) tarafından Ayvalık, Gemlik, Domat, Çilli, Çöpaşı ve Söbüaşı zeytinyağı çeşitleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada yağ asidi bileşiminin çeşide göre değiştiği gösterilmiştir. Bu araştırmaya göre zeytinyağında bulunan başlıca yağ asitleri oleik, linoleik ve palmitik asitlerdir. Ayrıca oleik, linoleik ve palmitik asit içerikleri sırasıyla Çilli (%68,53), Söbüaşı (%17,93) ve Gemlik (%19,47) çeşitlerinde belirlenmiştir.

Çizelge 2.6 Sızma zeytinyağının yağ asidi bileşimi (IOC 2021)

Yağ asitler	Sembol	Değişebilirliğin sınırı
Miristik asit	C14 : 0	$\leq 0,03$
Palmitik asit	C16 : 0	7,00 – 20,0
Palmitoleik asit	C16 : 1	0,3 – 3,5
Heptadekanoik asit	C17 : 0	$\leq 0,4$
Heptadesenoik asit	C17 : 1	$\leq 0,6$
Stearik asit	C18 : 0	0,5 – 5,0
Oleik asit	C18 : 1	55,0 – 85,0
Linolenik asit	C18 : 2	2,5 – 21,0
Linolenik asit	C18 : 3	$\leq 1,0$
Araşidik asit	C20 : 0	$\leq 0,6$
Gadoleik asit	C20 : 1	$\leq 0,5$
Behenik asit	C22: 0	$\leq 0,2$
Lignoserik asit	C24 : 0	$\leq 0,2$

2.8.3.2 Sabunlaştırılmayan kısım

2.8.3.2.1 Tokoferol

Tokoferoller, bitkisel yağlarda, özellikle zeytinyağında bulunan bileşiklerdir. Tokoferolün moleküler yapısı, metillenmiş bir kroman halkasının 2. pozisyonuna bağlı uzun zincir ile karakterize edilir. Tokoferol, sızma zeytinyağında izomerik formlarda (α , β ve γ -tokoferol) bulunur (Boscou vd. 2006). Bu izomerik formlar, yalnızca aromatik halka üzerindeki metil gruplarının sayısı ve konumu bakımından farklılık gösterir. Sızma zeytinyağındaki tokoferol bileşimi, olgunlaşma aşaması, çeşit ve tarımsal iklim koşulları gibi birçok faktörden etkilenir (Tura vd. 2007, Kalogeropoulos vd. 2014). Hırvatistan'da yetişen iki çeşit sızma zeytinyağı (Oblica ve Leccino) üzerinde yapılan bir araştırma, çeşide bağlı olarak tokoferol konsantrasyonunda farklılık olduğunu göstermektedir. Oblica çeşidinde tokoferol içeriği 269 ile 444 mg/kg arasında değişirken, Leccino çeşidinde 403 ile 784 mg/kg arasında değişmektedir. α -tokoferol, toplam tokoferolün %97'sini temsil eder ve içeriği her iki çeşitte de olgunlaşma derecesi ile azalır. α -tokoferol içeriği de depolama süresiyle birlikte azalır çünkü 12 aylık depolamanın ardından içeriği %27 oranında azalmıştır (Špika vd. 2015). Türk zeytinyağı çeşitleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, zeytinyağında en bol bulunan tokoferol izomerinin α -tokoferol (18.22-36.02 mg/100 g) olduğu görülmüştür. En yüksek α ve γ tokoferoller sırasıyla Söbüaşı çeşidi (36,02 mg/100g) ve Gemlik çeşidi (8,12 mg/100g) zeytinyağlarında gözlenmiştir (Özcan vd. 2019).

Tokoferoller biyolojik etkileri ile bilinir ve insan sağlığına faydalıdır (Psaltopoulou vd. 2011, Nocella vd. 2018).Tokoferollerin yararlı sağlık etkileri, gen ekspresyonunu, sinyal iletimini ve hücresel fonksiyonların modülasyonunu düzenleme yetenekleriyle de açıklanabilir. Bu yararlı etkiler, belirli kanser türlerinin, kalp hastalıklarının ve diğer kronik durumların önlenmesi ile bağlantılıdır (Shahidi ve Carmago 2016).

2.8.3.2.2 Oleokantal

Dekarboksimetil ligstrosid aglikon olarak da adlandırılan Oleokantal (OLC), ilk olarak sızma zeytinyağında Montedoro vd. (1993) tarafından rapor edilmiştir. OLC veya decarboxymethyl ligstroside aglycone, bazı sızma zeytinyağların tüketimiyle ilişkili boğaz tahrişinden ve keskinliğinden sorumludur. Diğer fenolik sekonder metabolitlerde olduğu gibi, sızma zeytinyağdaki oleocanthal konsantrasyonu da oldukça değişkendir, 0,2 mg/kg kadar azdan 498 mg/kg'a kadar çıkabilir. Sızma zeytinyağının tüm fenolik bileşikleri gibi OLC içeriği de ekstraksiyon yöntemi, çeşit, coğrafi bölge, meyvelerin olgunlaşma derecesi ve yetiştirme teknikleri gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Cicerale ve Keast 2010). Böylece Gomez-Rico vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmaya göre OLC konsantrasyonunun iki hasat döneminde olgunlaşma ile birlikte %20 ve %54 oranında azaldığı bildirilmiştir. Dider çalışmada, zeytinyağı çeşitleri coratina ve Oliarola sırasıyla $78,2 \pm 0,5$ mg/kg ve $21,0 \pm 0,8$ mg/kg OLC içeriği içerir. Taggiasca ve Seggianese çeşitlerinden üretilen sızma zeytinyağlarda sırasıyla $8,3 \pm 4,0$ mg/kg ve $53,0 \pm 12,0$ mg/kg OLC konsantrasyonu bildirilmiştir (Franconi vd. 2006). Oleocanthal'ın sağlık yararları vardır. Bir anti-inflamatuar olarak kabul edilir. Sızma zeytinyağında bulunan oleocanthal, anti-inflamatuar etkileriyle bilinen ubuprofen'i taklit eder (Beauchamp vd. 2005). OLC 'ın siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek anti-inflamatuar aktivite gösterebildiğine dair iyi kanıtlar vardır. OLC 'ın farklı kanser türlerinin önlenmesindeki potansiyelini göstermiştir (Parkinson ve Keast 2014). OLC, insan MCF10A hücrelerinin normal büyümesini etkilemeden insan meme kanseri hücrelerinin (MDA-MB-231, MCF-7 ve BT-474) büyümesini inhibe etmiştir. Başka bir çalışmada Fogli vd (2016), OLC'ın A375 ve 501Mel hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre büyümesi inhibisyonunu indüklediğini göstermiştir.

2.8.3.2.3 Steroller

Bitki sterolleri veya fitosteroller, bitkilerde biyosentez yoluyla oluşan bir grup doğal kimyasal bileşiklerdir. steroller hayvanlar aleminde olduğu kadar bitkiler aleminde de mevcuttur. Hayvanlarda kolesterol formundadırlar. Steroller, yağlı maddelerin küçük bileşenleri arasındadır, 27 ila 29 karbon atomlu tetrasiklik bileşiklerdir. Bitkiler birkaç

çeşit sterol içermektedir. Bitki aleminde en bol bulunan steroller, en bol bulunan steroller β -Sitosterol olup, bunu Kampesterol ve Stigmasterol izlemektedir (Fois ve Narce 2003). Bitki sterolleri hem serbest hem de bağlı formda bulunur. Serbest formlar bitki hücreleri için önemlidir, çünkü hücre zarının yapısının ayrılmaz bir parçasıdır ve bitkinin sıcaklık değişimlerinde yapısını korumasına yardımcı olan kohezyon ve akışkanlığının sağlanmasına katkıda bulunurlar. Embriyonik büyüme ve lipid birikiminde yer alırlar ve sinyal iletimi, hücre farklılaşması ve hücre yapısının yeniden düzenlenmesi ile bulaşıcı hastalıklara karşı savunma için önemlidirler. Bitkisel bir ürün olarak zeytinyağı da çeşitli steroller içermektedir (çizelge 2.7). Steroller zeytinyağındaki sabunlaşmayan fraksiyonun çoğunluğunu oluşturmakta olup ana steroller β -sitosterol, $\Delta(5)$ -avenasterol, kampesterol ve stigmasteroldür ve bunların çoğu yüksek değişkenlik göstermektedir (Öztürk vd. 2021). Yorulmaz ve Konuskan (2017), sarı Hasebi ve Halhali zeytinyağı çeşitlerindeki toplam sterollerin sırasıyla 358 mg/kg ve 1092.33 mg/kg olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 2.7 Sızma zeytinyağının sterol bileşimi (IOC 2021)

Sterols	Değer aralığı
kolesterol	< 0.5
Brassikasterol	≤ 0.1
Campesterol	≤ 4.0
Stigmasterol	$\leq 1.4\%$
Delta-7-stigmastenol	$\leq 0.3\%$
Delta-7-stigmastenol	0.5-0.8%
beta-sitosterol	$\geq 25\%$
delta-5-avenasterol	en çok temsil edilen 2.
delta-7-avenasterol	Not defined
delta-5-23-stigmastadienol	> 93.0
Total sterol (mg/kg)	≥ 1000
Erythrodiol + uvaol	≤ 4.5

2.8.3.2.4 Aromatik bileşikler

Zeytinyağında aromatik bileşiklerin mevcudiyeti birkaç çalışma ile rapor edilmiştir (Servili vd. 2003, Cavalli vd. 2004). Aromatik bileşikler, gıdaların aroması, kokusu ve lezzetinden sorumlu bir bileşendir (Grosch 2004). Sızma zeytinyağı, herhangi bir rafinasyon işleminden geçmemiş bir yağ olduğu için çeşitli aromatik bileşikler içermektedir. Sızma zeytinyağının aromatik bileşikleri genellikle aldehitler, alkol, ketonlar ve esterlerin bir karışımından oluşmaktadır. Oluşumu, sızma zeytinyağı ekstraksiyon işlemi sırasında meydana gelen hücre yırtılması sırasında enzimatik reaksiyonlar ve özellikle oto-oksidasyon ile sağlanmaktadır. Zeytinyağında aromatik bileşiklerin sentezi, esas olarak LOX ve hidroperoksit-liyaz enzimlerinin aktivasyonunu içeren lipoksijenaz (LOX) yolu yoluyla da gerçekleşebilir. Sızma zeytinyağında bulunan uçucu bileşikler, esas olarak, lipoksijenaz yolu yoluyla çoklu doymamış yağ asitlerinden biyolojik olarak üretilen C-6 ve C-5 bileşikleridir (Kesen et al, 2014). Bu süreçte dahil olan yağ asidi çoğunlukla oleik asittir. Aromatik bileşikler heksanal, (E)-3-heksenal, (Z)-3-heksenal, (E)-2-heksenal, heksil asetat, (Z)-3-heksenil asetat, heksan-1-ol, (E) -3-heksen-1-ol, (Z)-3-heksen-1-ol ve (E)-2-heksen-1-ol ve benzerleri sızma zeytinyağında bulunan diğer bileşikler arasındadır (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.8 Farklı lezzet profillerine sahip sızma zeytinyağının aromasına katkı sağlayan odorantlar (Boskou vd. 2006)

Bileşik	Koku açıklaması	Bileşik	Koku açıklaması
3-Metilbütanal	Malt gibi	(z)-3-Nonenal	Yağimsı
Etil-2-metilpropanoat	Malt gibi	Nonanal	Sabun, portakal gibi
(z)-3-Hekzenal	Yeşil ,elma gibi	2-feniletanol	Tatlı, bal gibi
Hekzenal	Yeşil çimensi	Etil sikloheksanoat	Meyvemsi
Etil-2-metil-bütanoat	Meyvemsi	(Z)-2-nonanal	Yağimsı
(E)-2-Hekzenal	Yeşil, acımsı	(E,Z)-2-6-Nonadienal	Hıyar gibi
(Z)-3-Hekzenol	Yeşil yaprak	(E)-2-Nonenal	yağimsı
Heptanal	yağimsı	2,4-Nonadienal	kızartılmış

Çizelge 2.8 Farklı lezzet profillerine sahip sızma zeytinyağının aromasına katkı sağlayan odorantlar (Boskou vd. 2006) (devam)

Bileşik	Koku açıklaması	Bileşik	Koku açıklaması
1-okten-3-one	Mantarımsı,taopraklı	Dekanal	Sabun, portakal gibi
Oktanal	Sabun, portakal gibi	(E,E)-2,4-Nonadienal	Kızartılmış
(Z)-3-Heksenil asetat	Meyvemsi	2-Dekenal	Yağımsı
Fenilasetaldehit	Tatlı, bal gibi	(E)-2-Dekenal	yağımsı
(E)-2-Oktenal	yağımsı	2,4-Dekadinal	Kızartılmış
Guaiakol	yanmış	(E,E)-2,4-dekadial	Kızartılmış
Etilfuran	Tatlı, yeşil	Dekenal	Metal
1-penten-3-one	Keskin, acı	Trideken	Acı

2.8.3.2.5 Pigmentler

Sızma zeytinyağında bulunan pigmentler, yeşil veya sarı renginin temelidir. Bu pigmentler genellikle feofitin (a ve b) formunda bulunan klorofil ve lutein ve β -karoten olarak bulunan karotenoidlerdir. klorofil, heofitin A ve B formunda bulunur. Pheophytin A en çok sızma zeytinyağında bulunur (Gandul-Rojas ve Mínguez-Mosquera 1996, Psomiadou ve Tsimidou 2001). Sızma zeytinyağının diğer bileşenleri gibi, pigmentlerin içeriği de belirli parametrelerden etkilenebilir. Bu nedenle pigmentlerin konsantrasyonu önemli ölçüde iklim koşullarına, hasat zamanına ve çeşide bağlı olabilir (Cristina ve valentina 2017) Sızma zeytinyağında bulunan karotenoidler, violaksantin, neoksantin, luteoksantin, antheraksantin, mutoksantin ve β gibi bazı ksantofilleri içerebilir. - kriptoksantin (Boskou vd, 2006).

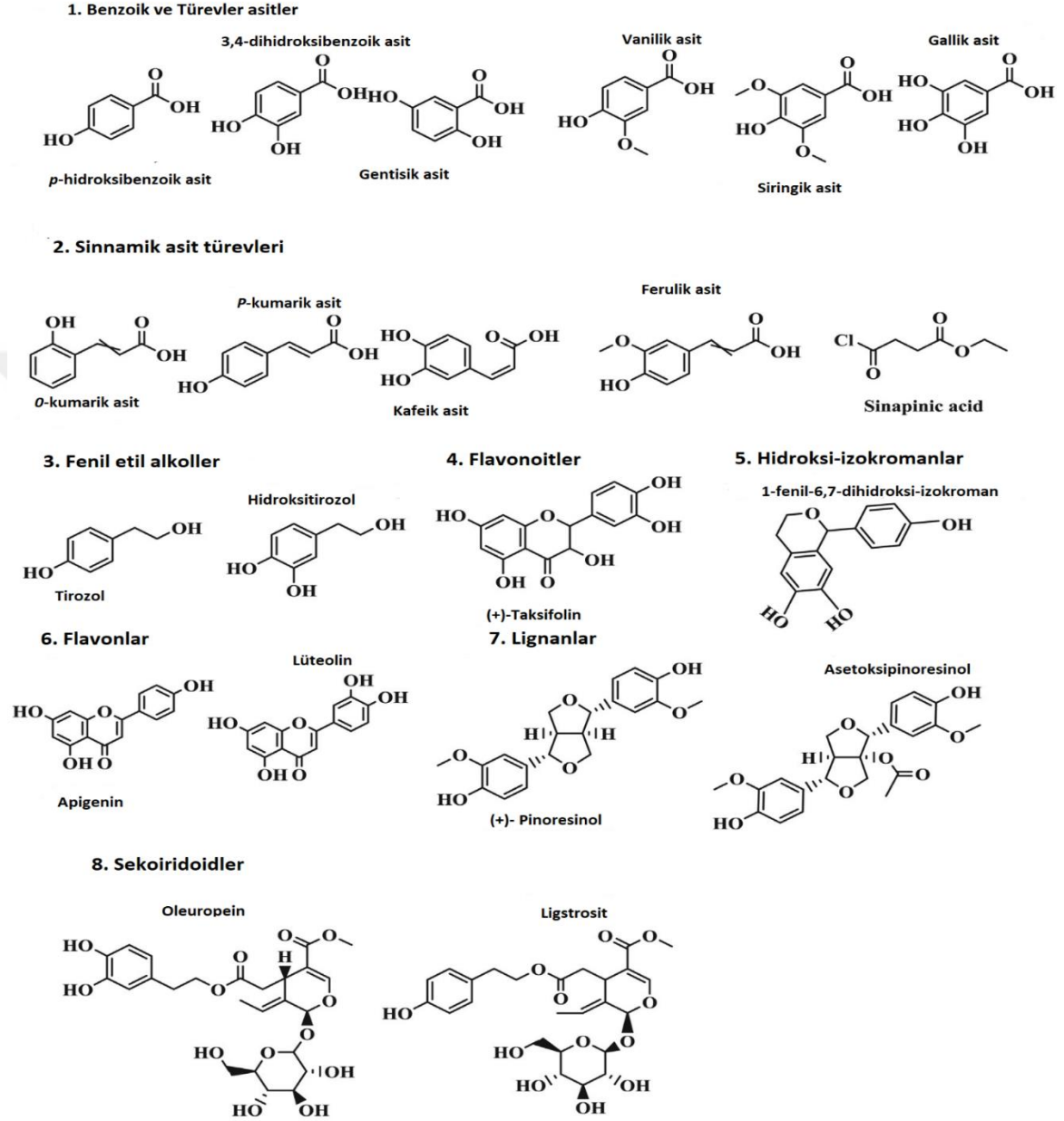
2.8.3.2.6 Fenolik bileşenler

Fenolik bileşikler bitkilerde doğal olarak bulunan kompleks bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitki dokularından ikincil metabolitlerin bir sınıfını oluşturur. Bu bitkiye özgü

bileşikler genellikle şikimik asit yolunda l-fenilalanin ve l-tirozinden sentezlenir. Sızma zeytinyağı, fenolik bileşiklerdeki zenginliği ile diğer yağlardan ayrılmaktadır. Bu fenolik bileşikler, tüketimiyle ilişkili çeşitli faydalardan kısmen sorumludur. Sızma zeytinyağı, fenolik asitler, fenolik alkoller, hidroksi-izokromanlar, flavonoidler, sekoiridoidler ve lignanları içeren farklı sınıflarda fenolik bileşik içerir (Servili vd. 2004). Fenolik bileşikler, sızma zeytinin acılık, keskinlik ve burukluk gibi duyusal özelliklerine katkıda bulunmaktadır (Bendini vd. 2007). Fenolik bileşikler çevrelerindeki diğer bileşiklerle yüksek reaktiviteye sahiptirler, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar ile bağ oluşturabilirler (Palafox-carlos vd. 2011). Fenolik bileşiklerin bu reaktif özellikleri, bitkileri UV radyasyonuna, patojen istilalarına, mantarlara, bakterilere ve virüslere karşı korumada önemli bir rol oynamalarını sağlar (Denny ve Buttriss 2007). Antioksidan özellikleri nedeniyle oksidasyonu engeller veya geciktirirler. Zeytinyağının renk, acılık ve aroma ve tat gibi duyusal özelliklerini etkilerler.

Zeytinyağında en iyi bilinen fenolik bileşik hidroksitirozoldür. Hidroksitirozol (HT), moleküler ağırlığı 154,16 g/mol olan ve feniletıl-alkol yapılı amfipatik bir fenoldür. Ayrıca International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından 3,4-dihydroxyphenolethanol (DOPET) veya 3,4-dihidroksiphenolethanol (3,4-DHPEA) veya 4-(2-Hidroxyethyl)-1,2-benzenediol olarak da adlandırılır (Robles-Almazan vd. 2017). HT, antioksidan özelliklere sahip fenolik bir bileşiktir. Zeytin yaprağı ve yağda bulunan doğal bir bileşiktir. Hidroksitirozolün besin kaynağı esas olarak sızma zeytinyağıdır. Hidroksitirozolün kökeni, zeytinlerin olgunlaşması ve depolanması sırasında meydana gelen oleuropeinin hidrolizidir (Charoenprasert ve mitchell 2012). Sızma zeytinyağıdaki çoğu fenolik bileşik gibi, hidroksitirozol içeriği de yağın yeri, türü, kalitesi ve ekstraksiyon işlemine bağlı olarak değişebilir (Romero vd. 2004). Bu bileşik, insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri ile bilinir ve yüksek biyoyararlanıma sahiptir. Bu biyoyararlanım, HT ve metabolitlerinin böbreklerde ve karaciğerde birikmesinin yanı sıra kaslar, testisler, karaciğer ve beyin gibi dokularda (HT kan-beyin bariyerini geçebilir) çok iyi dağılım kapasitelerine sahip olmasını sağlamaktadır (D'Angelo vd. 2001). Antioksidan etkilerinin yanı sıra antiinflamatuvar etkileri de vardır (Reis vd. 2018) ve kardiyoprotektif, immünomodülatör, sitoprotektif, nöroprotektif ve kemoprotektif bir ajan olarak kabul edilir. Sızma zeytinyağında bulunan hidroksitirozol antikanser görevi görebilir. HT,

meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını azaltır (MCF-7) (Chimento vd. 2014). HT, kolon ve prostat tiroid kanseri hücreleri üzerinde etkinlik göstermiştir.



Şekil 2.22 Sızma Zeytinyağında Tanımlanan Fenolik Bileşiklerin çeşitleri ve Kimyasal Yapıları (Bendini vd. 2007, Muhammad vd. 2017).

2.8.4 Fenolik bileşiklerin bağırsaklardan emilimi

Bazı fenolik bileşiklerin bağırsak sisteminden emilimi doğrudan gerçekleşmez. Bilimsel literatür, diyetteki fenolik bileşiklerin çoğunun gastrik koşullar altında stabil olduğu ve doğrudan emilebileceği, metabolize edilebileceği ve hedef dokulara dağıtılabileceği veya kolon bakterileri tarafından biyotransformasyonuna devam edilebileceği bağırsaklara ulaştığı fikrini desteklemektedir. Bu bileşikler bağırsak duvarında birikir ve bağırsak duvarını oksidatif strese ve bazı patojenik bakterilere karşı korumada önemli bir rol oynayabilir. Diğerleri ise bağırsak duvarı seviyesinde kolaylıkla asimile olmaktadır. Sızma zeytinyağının fenolik bileşiklerinin bağırsaklardaki biyoyararlanımı belirsizliğini koruyor. Birçok araştırma, sızma zeytinyağındaki polifenollerin büyük ölçüde ince bağırsakta emildiğini göstermiştir (Casas vd. 2001, Vissers vd. 2002). Hidroksitirosol ve tirosol gibi polar bileşikler bağırsaklarda kolaylıkla emilir veya diğer elementlerle birleşerek onları daha aktif hale getirmektedir. Böylelikle metilasyona, sülfasyona veya glukuronidasyona uğrayabilirler (Visioli vd. 2000). Sekoiridoidler gibi bazı fenolik komplekslerin mide koşulları altında nispeten stabil olduğu ve bağırsak duvarından kolaylıkla emildiği gösterilmiştir (Pinto vd. 2011). Bağırsaklarda birçok fenolik bileşik dönüştürülmesine rağmen, diğerleri bağırsaklara herhangi bir modifikasyon olmadan ulaşır, bu durum oleuropein glikozitlerde olduğu gibidir (Deiana vd. 2018). Yutulan polifenoller, özellikle dışkıda bulunan toksinlerin ürettiği serbest radikalleri ortadan kaldırarak anti-serbest radikal bir rol oynayabilecekleri kolon duvarı seviyesinde) birikir (Corona vd. 2009 , Manna vd. 2000). Bağırsak lümeninde sızma zeytinyağının fenolik bileşiklerinin varlığı, iltihaplanma riskini ve bağırsak lipidlerinin oksidatif bozukluğunu azaltabilmektedir (Incani vd. 2016).

Kronik kolit üzerinde Evoo ile diyet takviyesinin bağırsak iltihabından koruyucu etkileri sahip olduğu bildirilmiştir (Sanchez-Fidalgo vd. 2012). Kronik kolit ve bağırsak mukozasının kronik ve tekrarlayan iltihabı ile karakterizedir. Sızma zeytinyağı açısından zengin bir diyet, siklooksijenaz (COX)-2 ve indüklenabilir nitrik oksit sentazın (iNOS) aşırı ekspresyonunu azaltarak DSS'nin neden olduğu kronik kolitte önemli koruyucu etkilere neden olmuştur. Sızma zeytinyağı, p38 MAPK'nın aşağı regülasyonu yoluyla sitokinleri modüle eder ve bu nedenle ülseratif kolit tedavisi için fonksiyonel bir gıda

yararı olarak kabul edilir. Sızma zeytinyağının bağırsak mukozası üzerindeki bu faydalı etkileri, sızma zeytinyağında bulunan biyoaktif bileşiklerin, özellikle fenolik bileşiklerin, bağırsaklara ulaşmadan emilmediğini yeterince kanıtlamaktadır.

2.8.5 Sızma zeytinyağı ve diğer zeytinyağların biyolojik etkileri

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, sızma zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin, kanser ve bazı nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere belirli hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebilen önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Sızma zeytinyağının bu hastalıkları önleyici etkisinin, antioksidan moleküller içermesiyle bağlantılı olduğu söylenmektedir. Cicerali vd (2010) tarafından yapılan bir araştırmaya göre, zeytinyağındaki fenolik bileşikler, lipoprotein plazma, oksidasyonu, DNA'ya oksidatif hasar, inflamasyon belirteçleri ve oksidasyon belirteçleri gibi faydalı etkilere sahiptir.

2.8.5.1 Antioksidan etkileri

Sızma zeytinyağındaki fenolik bileşikler, in vivo ve in vitro olarak potansiyel antioksidan aktiviteye sahip olduğu düşünülen maddeler; hidroksitirosol (HT), tirosol ve sekoiridoidlerdir (oleuropein ve ligstrosid) (Tripoli vd. 2005). Bu nedenle, EVOO'ların potansiyel antioksidan ve radikal temizleme etkileri, reaktif oksijen radikallerinden gelen hasara karşı koruma sağlayan sızma zeytinyağı numunelerinde bulunan fenolik bileşiklerin yüksek seviyelerine bağlanabilir. Sızma zeytinyağı, yüksek antioksidan aktiviteye sahip birçok fenolik bileşik içermekte olup, içerdiği çeşitli bileşenlerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğu farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Zeytinyağı temelli bir diyetin, nötrofil hücrelerini ve siklooksijenaz-2 protein ekspresyonunu baskılayarak enflamasyonu azaltması ve redoks dengesinin uyarılması yoluyla farelerde yara iyileşmesini indüklediği gösterilmiştir (Saguie ve Costa 2019). Ayrıca yapılan bir başka araştırmada da, zeytinyağının toplam fenolik fraksiyonu, esas olarak GSH'yi ve katalitik alt birimini artırarak HepG2 hücre hatlarının redoks profilini iyileştirdiği gösterilmiştir (Kouka vd. 2018). Bağırsak hücrelerinin sızma zeytinyağının fenolik özütleri ile önceden inkübasyonunun,

terbutilhidroperoksiti ve oksisterolün neden olduğu oksidatif stresi (ROS üretimi, GSH tükenmesi) ve pro-enflamatuarların serbest bırakılmasını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Incani vd. 2016, Serra vd. 2018). Zeytinyağı özütlerinin insan keratinositlerinde mitokondriyal membran potansiyeli artırılması ile ATP üretimi için mitokondriyal gradyanları koruyarak hücre canlılığını artırarak mitokondriyal işlevlerini iyileştirip oksidatif hasarı hafiflettiği de gösterilmiştir (Yazihan vd. 2020). Zeytinyağından elde edilen bileşikler (α - tokoferol, γ - tokoferol ve oleik asit), BV-2 mikrogial hücrelerde mitokondriyal ve peroksizomal disfonksiyon ile ilişkili 7-ketokolesterolün (7KC) neden olduğu yan etkileri de azalttığı rapor edilmiştir (Debbabi vd. 2016).

2.8.5.2 Antibakteriyel etkileri

Fenolik bileşikler bakımından zengin birçok doğal ürün gibi zeytinyağının da antibakteriyel aktiviteye sahip olduğuna inanılmaktadır. Fenolik bileşikler, bakterilerin dış zarında hasara neden olabilir, bu da protonlara ve potasyum iyonlarına karşı artan zar geçirgenliğine, hücre içi ATP depolarının azalmasına, proton itici gücün bozulmasına ve hücre içi proteinlerin denatürasyonuna neden olabilir (Amarti vd. 2008). Guo vd. (2020) tarafından yapılan bir araştırmaya göre, zeytinyağı polifenol ekstraktları, ATP konsantrasyonunu azaltarak, zarın depolarizasyonuna ve bakteriyel protein içeriğini azaltarak *Salmonella Typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları üzerinde etki etmektedir. Aynı şekilde, fenolik bileşikler bakımından zengin zeytinyağı özleri, üç farklı *Helicobacter pylori* suşu üzerinde antibakteriyel aktivite göstermiştir (Romero vd. 2007). Karaosmanoğlu vd. (2010) tarafından yapılan bir araştırmaya göre Erkence, Memecik ve Nizip sızma zeytinyağı çeşitleri *Escherichia coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella Enteritidis* suşları üzerinde antibakteriyel etki göstermiştir. Yaralara zeytinyağı ve limon kreması karışımının sürülmesinden oluşan, yaraların tedavisinde Türkiye'de bir bölge halkının kullandığı geleneksel bir yöntem, bakteri suşları üzerinde in vitro olarak test edilmiştir. Tek başına kullanılan zeytinyağının, krema ile karıştırıldığında daha etkili davrandığı bu çalışmadan ortaya çıkmaktadır (Sumer vd. 2013).

2.8.5.3 Antikanser etkileri

Sızma zeytinyağı özleri çeşitli kanser (meme kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri vb.) hücre hatlarının üzerine etki gösterdiğini rapor edilmiştir (Fezai vd. 2013, Battino vd. 2019, Reboredo-Rodriguez vd. 2018). Sızma zeytinyağının ekstraktı, hücre döngüsünü bloke ederek T24 ve 5637 insan mesane kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve klonojenik kapasitesini doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe etmiştir. Aynı çalışmada sızma zeytinyağının kemoterapi ilaçları ile kombinasyonunun mesane kanseri hücrelerinde kemoterapi toksisitesini azalttığı gösterilmiştir (Coccia vd. 2016). Sızma zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler, kanser önleyici etkileri ile bilinir. Antioksidan güçleri sayesinde fenolik bileşikler, hücresel DNA'daki oksidatif hasarı azaltabilir, böylece vücutta kanser gelişme riskini önleyebilir. Hidroksitirozol, tirosol ve oleuropein, sızma zeytinyağında bulunan fenolik bileşiklerdir. Hidroksitirozol, hücre ölümüne dahil olan genlerin transkripsiyonunu etkileyerek insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde antikanser aktiviteleri uygular ve kaspaz-3'ü aktive eder (Mateos ve vd. 2013). Hidroksitirozol ayrıca epidermal büyüme faktörü (EGFR) ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabilir ve kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebilir (Terzuoli vd. 2016). Hidroksitirozolün, çeşitli tümör türlerinde hücre döngüsü durmasına ve apoptoza neden olarak kanser proliferasyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir (Li vd. 2014). Hidroksitirozolün esterleştirilmiş bir formu olan Oleuropein, zeytinyağındaki ana bileşiklerden biridir. Oleuropein, kanser, oksidatif stres, iltihaplanma ile viral ve bakteriyel enfeksiyonlar üzerinde çeşitli farmakolojik aktiviteler ve faydalı etkiler göstermiştir. Hamdi ve Castellon (2005) tarafından yapılan bir araştırma, oleuropeinin, kolon kanseri hücrelerinde, bunların çoğalmasını doza bağlı bir şekilde inhibe ederek aktin filamentlerini kırabildiğini göstermiştir. Benzer şekilde, oleuropein ile kendiliğinden tümörler geliştiren sıçanların gavajını, gavajdan 9-12 gün sonra tümörün gerilemesi izlemiştir.

2.8.5.4 Kalp-damar hastalıkları üzerindeki etkileri

Akdeniz diyeti insan sağlığına olan faydaları ile bilinmektedir. Çok sayıda çalışma, sızma zeytinyağındaki polifenollerin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesindeki önemini

göstermiştir (Khurana vd. 2013, Nocella vd. 2018). Akdeniz halklarında düşük bir kalp-damar hastalık prevalansı bildirilmiştir (Guasch-Ferré vd. 2014). Hidroksitirol ve oleuropein sızma zeytinyağında bulunan bileşiklerdir, bu bileşikler LDL oksidasyonunu ve trombosit agregasyonunu ve ayrıca ateroskleroz gelişiminde rol oynayan birçok faktörü inhibe eder (Warleta vd. 2011). Sızma zeytinyağında bulunan hidroksitirosol, bir insan aort endotel hücresinde E-selektin, P-selektin, hücre içi adezyon molekülleri, vasküler hücre adezyon molekülleri gibi farklı adezyon moleküllerinin salgılanmasını azaltabilir. Bu nedenle hidroksitirosol, endotel hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu, kan kılcal damarlarının tıkanması ve kardiyak fonksiyonlarda yer alan aort ve kalp dokularındaki belirli proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek koruyucu bir rol oynar (Catalan vd. 2015, Catalan vd. 2016). Sızma zeytinyağı takviyesinin, kontrol grubuna kıyasla deneklerde öküz-LDL içeriğini azalttığı bildirilmiştir. Sızma zeytinyağı ile zenginleştirilmiş bir diyet, yüksek kardiyovasküler risk altındaki kişilerde LDL fonksiyonunu, kolesterol akış kapasitesini, metabolizmayı ve vazodilatör kapasitesini geliştirir. Sızma zeytinyağı tüketimi, yüksek kardiyovasküler risk taşıyan bazı kişilerde kan basıncı değerlerini düşürür (Davis vd. 2017). Sızma zeytinyağı endotel fonksiyonunu iyileştirir ve ateroskleroz oluşumunu önler. Sızma zeytinyağının, LDL oksidasyonunda yer alan aterosklerozla ilişkili genlerin ekspresyonunu modüle ettiği bildirilmiştir (Nocella vd. 2018). Damar sertliği ile bağlantılı enflamatuvar belirteçlerin konsantrasyonu, sızma zeytinyağı tüketicilerinde düşüktür. Bu, sızma zeytinyağının Akdeniz popülasyonlarındaki kalbi koruyucu rolünü açıklayabilir.

2.8.5.5 Anti-diyabetik etkileri

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, sızma zeytinyağının diyabet dahil birçok hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynadığını bildirmiştir. Sızma zeytinyağı, belirli karbonhidrat hidrolize edici enzimleri inhibe eden fenolik bileşikleri sayesinde antidiyabetik etkilere sahiptir (Loizzo vd. 2017). Zeytinyağının fenolik bileşikleri bu enzimleri inhibe ederek kan şekerinin yükselmesini engeller. Karbohidrat hidrolize edici enzimlerin inhibisyonu, diyabet tedavisinde yaygın bir stratejidir. İspanyol sızma zeytinyağı çeşitleri (Arbequina, Picual, Cuquillo, Cornicabra, Hojiblanca) üzerinde yakın zamanda yürütülen bir çalışma, α -glukosidaz ve α -amilaz aktivitesini inhibe ederek

önemli bir hipoglisemik etki göstermiştir (Collado- González vd. 2017). Zeytinyağında bulunan çok aktif fenolik bileşiklerden biri olan hidroksitirosol, potansiyel bir α -glukosidaz inhibitörüdür (Hdrih vd. 2015). Diyabetik fareler üzerinde yapılan in-vivo çalışmalar, sızma zeytinyağı tüketiminin kan şekerini düşürdüğünü ve β hücreleri tarafından salgılanan insülin duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Ek olarak, sızma zeytinyağı diyetleri β hücre apoptozunu azalttı, β hücre sayısını artırdı ve adacık glikoz metabolizmasını ve glikoz kaynaklı insülin sekresyonunu normalleştirmiştir (Jurado-Ruiz vd. 2019). Ek olarak, Brava Gallega çeşidi (İspanya) üzerinde yapılan bir araştırma, bu çeşit sızma zeytinyağının α -glukosidazı etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Brava Gallega sızma zeytinyağlarının fenol bakımından zengin özlerinin (143–177 μ g kuru ekstrakt/mL), bu enzimi inhibe etmede, genellikle erken başlangıçlı diyabetin klinik yönetimi uygulanan ilaç akarbozundan (IC_{50} değeri 356 μ g/mL) önemli ölçüde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. (Reboredo-Rodriguez vd. 2020) . Sızma zeytinyağının bu inhibitör etkileri, flavonoidler yani luteolin ve apigenin açısından zengin bileşiminin, α -glukosidaz inhibitörleri olarak diyabet tedavisinde olumlu etkilere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Reboredo-Rodriguez vd. 2020).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Sızma zeytinyağ örnekleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan sızma zeytinyağı örnekleri (İzmir sofralık, Ayvalık, Tavşan yüreği, Kilis yağlık, Memecik) Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilmektedir. Tavşan yüreği sızma zeytinyağı; Zeytin Akademi (Antalya), Memecik sızma zeytinyağı; Tuay Gıda (Muğla), İzmir sofralık sızma zeytinyağı; Hedef Ziraat (İzmir), Kilis yağlık sızma zeytinyağı; Fersis Gıda (Kilis) ve Ayvalık sızma zeytinyağı; Buta Assos (Çanakkale) firmalarından Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden Prof. Dr. Mücahit Taha Özkaya tarafından temin edilmiştir.



Şekil 3.1 Sızma zeytinyağı örnekleri

KY: Kilis yağlık, **İS:** İzmir sofralık, **TY:** Tavşan yüreği, **AY:** Ayvalık, **MC:** Memecik,

3.1.2 Kullanılan materyal ve cihazlar

Tez kapsamında aşağıdaki materyal ve cihazlar kullanılmıştır.

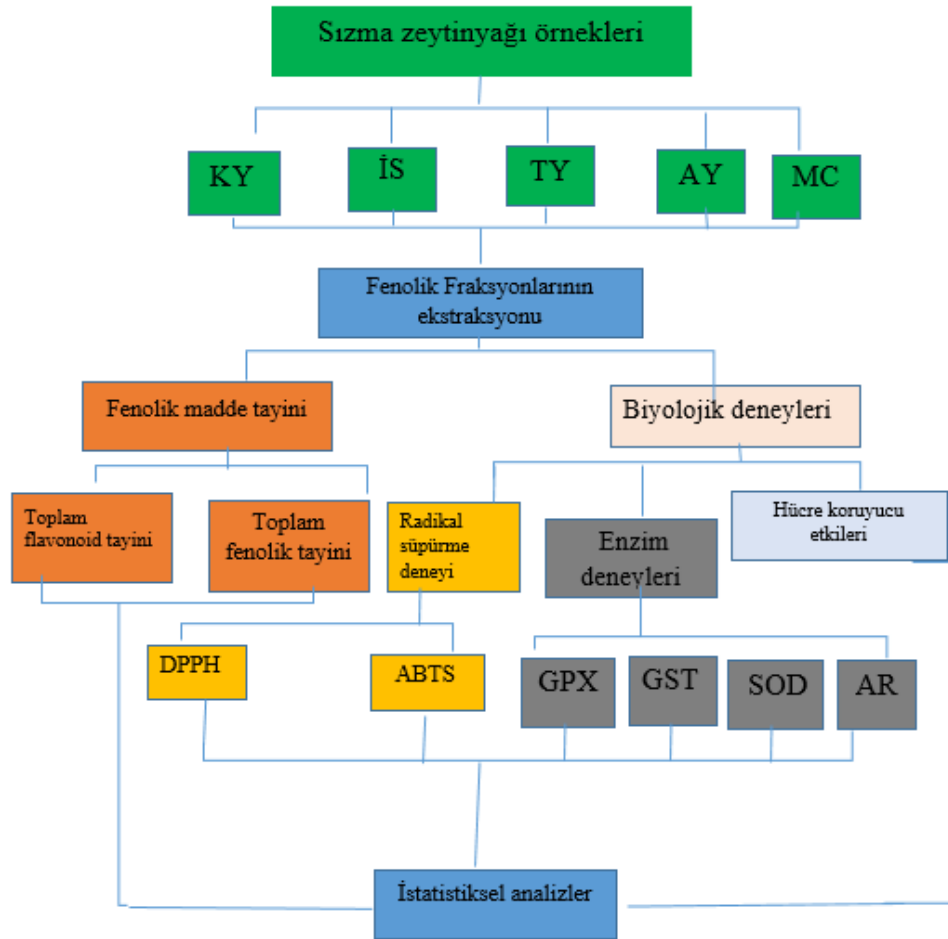
- ❖ Hassas Terazı (Mettler Toledo)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı
- ❖ Tek ve çok kanallı Otomatik Pipetler (Eppendorf)
- ❖ Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj(Sigma)
- ❖ Vorteks(Labnet)
- ❖ Spektrofotometre (Biochrom, lira)
- ❖ Derin Dondurucu
- ❖ Buzdolabı
- ❖ Etüv
- ❖ Rotari evaporatör (Büchi, R-3),
- ❖ Homojenizatör
- ❖ Otoklav
- ❖ PH metre (Hanna)
- ❖ İnkübatör (Sanyo)
- ❖ Cerrahi aspiratör (Elmaslar)
- ❖ Sıcak su banyosu (Memmert)
- ❖ Mikroplaka okuyucusu (Biotek)
- ❖ Saf su cihazı (Millipore)
- ❖ Biyogüvenlik kabini (Mikrotest)

3.1.3 Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmamız kapsamında AlCl_3 , NaNO_2 , Metanol, Etanol, Folin- Ciocalteau, Na_2CO_3 , NaOH , gallik asit, kersetin, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), ABTS, EDTA , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), NaCl (Merck), NADPH (Sigma), DL-gliserlaldehit (Sigma), KH_2PO_4 (Sigma), K_2HPO_4 (Sigma), sodyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitroblue tetrazolyum, ksantin, ksantin oksidaz, Tris-HCl tamponu, potasyum klorür, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), terbütilhidroperoksit, ditiyotritol, sığır serum albümini (BSA) (Sigma), Li_2SO_4 , DL-gliserlaldehit, L-glutamin, RPMI-1640,

Tripsin/EDTA, penisilin/streptomisin, propidium iodide, MTT Sigma-Aldrich, kristal viyole, etanol, metanol, kloroform Merck, fetal bovin serum (FBS), fosfat tamponlu salin (PBS)

3.2 Yöntem



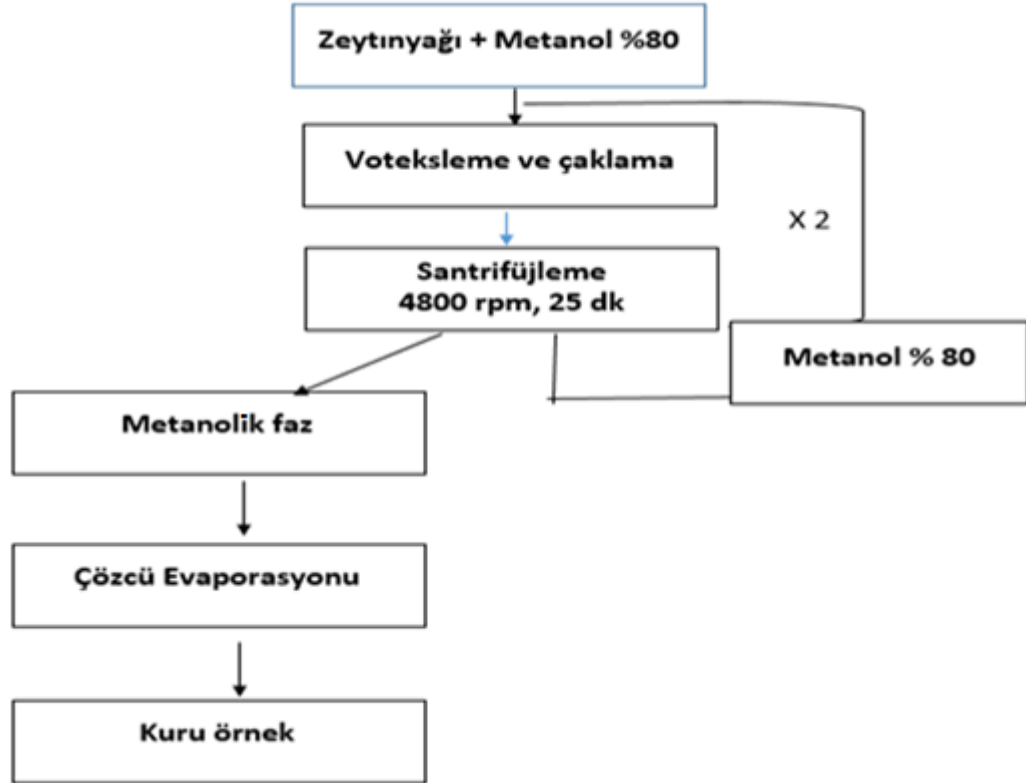
Şekil 3.2 Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması

KY: Kilis yağlık, **İS:** İzmir sofralık, **TY:** Tavşan yüreği, **AY:** Ayvalık, **MC:** Memecik, **SOD:** süperoksit dismutaz, **GPX:** Glutasyon peroksidaz, **GST:** Glutasyon-S-Transferaz, **AR:** Aldoz redüktaz.

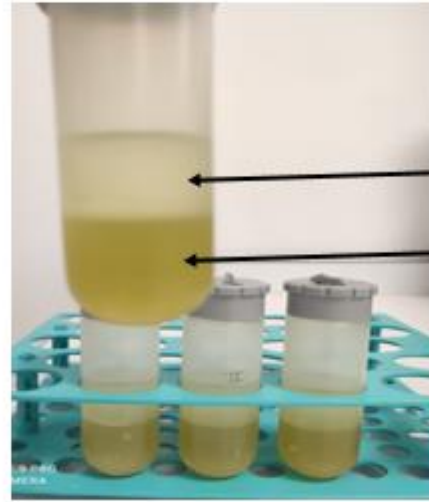
3.2.1 Sızma zeytinyağı örneklerin ekstraksiyonu

Sızma zeytinyağı örneklerinin fenolik fraksiyonları, Reboredo-Rodriguez vd. (2018) tarafından belirlenen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, her bir sızma zeytinyağı örneğinden ekstraksiyon için 10 gr tartılmış ve steril bir tüpe aktarılmıştır.

Sızma zeytinyağı içeren tüplere, 5 mL MeOH:H₂O (80:20, v/v) karışımı ilave edilmiştir. Tüpler 3 dakika boyunca vorteks yardımıyla kuvvetlice çalkalanmıştır. Son olarak, 25 dakika 4800 rpm'de santrifüjlenerek ayrılan MeOH:H₂O fazları toplanmıştır. Bu işlem her bir sızma zeytinyağı örneği için üç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra toplanan üç metanolik faz bir balon içinde birleştirilmiş ve metanol kısmı 54°C'de uygun basınç altında (337 mBar) rotary evaporatör (Büchi, R-3) kullanarak uzaklaştırılmıştır. Evaporasyon işlemi sonrasında elde edilen kuru ekstratlar tartılmış ve %80 metanol kullanılarak 5 mg/mL konsantrasyondaki stok konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen stok konsantrasyonlar daha sonra deneylerde kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3 Sızma zeytinyağı örneklerin fenolik fraksiyonlarının elde edilmesi (Reboredo-Rodriguez vd. 2018)

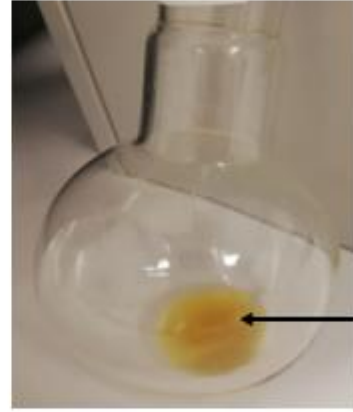


Metanolik faz

Pellet



Kuru örnek



Çözülmüş
örnek

Şekil 3.4 Sızma zeytinyağların fenolik fraksiyonların ekstrasyon görselleri

Kuru örnekler elde edildikten sonra her sızma zeytinyağı örneği için ekstraksiyon verimliliği (EV) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$EV(\%) = \frac{\text{Kuru örnek ağırlılığı}}{\text{Sıvı örnek ağırlılığı}} \times 100$$

3.2.2 Sızma zeytinyağı örneklerinin fenolik içerik tayini

Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik içerik tayini için, 100 µL hidrometanolik sızma zeytinyağı örneği (0,25; 0,5; 1; 2 ve 5mg/mL) ve standart gallik asit çözeltilerine 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş, vorteksleme işlemi sonrasında karanlık ortamdaki 3 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 500 µl % 6 (v/v) sodyum karbonat ilave

edilmiştir. 5 dakika inkübasyon sonrasında reaksiyon karışımı karıştırılmış ve distile su ilavesi ile reaksiyon hacmi 2 mL'ye tamamlanmıştır. 2 saat inkübasyondan sonra reaksiyon karışımının absorbansı köre (distile su) karşı 725 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Sızma zeytinyağı örneklerinde bulunan toplam fenolik bileşikler, 0,3; 0,150 ; 0,75 ; 0,0375 ve 0,01875 mg/mL konsantrasyonlardaki standart gallik asit çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik içerikleri, gram yağ başına mg gallik asit eşdeğeri (mgGAE/g) olarak ifade edilmiştir.

3.2.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin flavonoid madde içerik tayini

Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam favonoid içeriği, Huang vd. (2020) tarafından açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir. Bu yöntemle göre, 100 µL NaNO₂ (% 5) ve 100 µL AlCl₃ (% 10), farklı konsantrasyonlarda 100 µL sızma zeytinyağı örneği (0,25; 0,5; 1; 2 ve 5mg/mL) ve kuersetin standart çözeltilerine eklenmiştir. 10 dakikalık inkübasyondan sonra, reaksiyon karışımına 2 mL NaOH (%4) eklenerek test tüpleri karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansı köre karşı 415 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid içerikleri gram yağ başına mg kuersetin eşdeğeri (mgQEq/g) olarak ifade edilmiştir.

3.2.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin radikal temizlemesine etkilerinin analizi

3.2.4.1 DPPH aktivitesi

Sızma zeytinyağının radikal temizleme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Blois 1958). Kısaca, 5 mg DPPH 100 mL etanol içinde çözülmüştür. Karışımı 1 saat boyunca şişeye balık atıp karıştırılacaktır. DPPH stok solüsyonu, analizden önce 517 nm'de 0.990 absorbansa etanol ile seyreltilerek yaklaşması sağlanmıştır. Her bir test tüpünde, farklı konsantrasyonlarda 100 µL sızma zeytinyağı (0,25; 0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL) veya Gallik asit, 1,4 mL DPPH ile karıştırılıp ve 1 dakika çalkalanmıştır. Test tüpleri alüminyum folyo ile kapatılıp ve

karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Her çözeltinin absorbansı, spektrofotometre kullanılarak metanol (%80) ile hazırlanan kör reaktife karşı 517 nm'de ölçülmüştür. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

$$\%RSA = \frac{Ac - As}{Ac} * 100$$

Ac= kontrol absorbans değeri

As= örnek absorbans değeri

RSA (%) = radikal süpürme aktivitesi

3.2.4.2 ABTS aktivitesi

ABTS radikal süpürme aktivitesi (Wu vd. 2017, Huang vd. 2017) tarafından açıklanan yöntemle belirlenmiştir. ABTS, 1: 1 hacim oranında potasyum persülfat çözeltisi ile karıştırılıp ve oda sıcaklığında karanlıkta 12 ~ 16 saat süreyle inkübe edilerek bir radikal kation stok çözeltisi (ABTS⁺) oluşturulmuştur. ABTS⁺ stok solüsyonu, analizden önce 734 nm'de 0,700 (± 0,020) absorbansa etanol ile seyreltilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda 100 µL sızma zeytinyağı örneği (0,125; 0,25; 0,5; 0,75 ve 1mg/mL), 1400 µL ABTS⁺ stok solüsyonuyla karıştırıldı ve 10 dakika sonra 734 nm'de absorbans kaydedilmiştir. Trolox standart olarak kullanılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

$$\% RSA = [(Ac-As)/Ac]*100$$

A_C = kontrol abzorbars değeri

A_S = örnek Absorbans değeri

%RSA = Radikal süpürme aktivitesi

3.2.5 Sızma zeytinyağı örneklerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

3.2.5.1 Sitozol izolasyonu

Glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerinin tayini için sığır karaciğerinden elde edilen homojenat kullanılmıştır.

Karaciğer dokusunun ağırlığının iki katı kadar, 0,15 M potasyum klorür, 1 mM EDTA ve 1 mM ditiyotritol içeren 10 mM'lık potasyum fosfat tamponu (pH=7,0) eklenmiştir. Daha sonra, doku homojenizatör yardımıyla karıştırılıp homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C, 10,000 × g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan süpernatant alınıp temiz tüplere aktarıldı. Elde edilen süpernatant ikinci kez +4 °C, 30,000 × g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enzim aktivite tayinlerinde kullanılmak amacıyla ependorf tüpler içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Yıldırım vd. 2014).

3.2.5.2 Protein tayini

Lowry metodunda, protein standardı olarak 1 mg/mL sığır serum albumini (BSA) çözeltisinden faydalanılmış ve 0,1-1 mg/mL aralığında BSA çözeltileri hazırlanmıştır. Kullanılan Lowry reaktifi; A (%2 Na₂CO₃, 0.1N NaOH), B (%1 CuSO₄.5H₂O) ve C (%2 Na-K tartarat) tamponlarının sırayla 100:1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi ise 1:1 oranında distile su içerisinde hazırlanmıştır. Sığır karaciğerden elde edilen sitozolün protein tayini için 500 µL Kör (sadece saf su), standart protein çözeltileri (BSA) ve sızma zeytinyağı örnekleri içeren tüplere 2,5 mL Lowry reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüm deney tüplerine 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Deney aşağıdaki Çizelge'ye göre yapılmıştır:

Çizelge 3.1 Deney tüplerinin dolum tablosu

BSA konsantrasyonu (mg/mL)	Distile su	Protein	Lowry reaktifi	Folin reaktifi
Kör	500 µL	-	2.5 mL	250 µL
0,1	-	500 µL	//	//
0,15	-	//	//	//
0,2	-	//	//	//
0,5	-	//	//	//
1	-	//	//	//

Çeşitli tüplerde bulunan solüsyon karışımlarının absorbansları 660 nm'de okunmuştur.

3.2.5.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine etkilerinin analizi

Zeytinyağı örneklerinin SOD enzim aktivitesi üzerine olan etkileri, Geller ve Winge (1984) tarafından belirlenen yöntem kullanılarak kinetik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (1 mL), 200 mM Na₂CO₃ tamponu (pH 10.0), enzim kaynağı sitozol, 12,5 mM nitroblue tetrazolyum(NBT), 0,3 mM ksantin, 0,28 U / mL ksantin oksidaz ve Kuersetin sızma zeytinyağı örneklerinden (0,25; 0,5; 1; 2 ve 4mg/mL) oluşmuştur. İki dakika inkübasyondan sonra reaksiyon karışımının absorbansı kinetik olarak spektrofotometre ile 550 nm'de 5 dakika boyunca takip edilmiştir. Deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL) = (OD_{k\ddot{o}r} - OD_{test}) / (OD_{k\ddot{o}r}) \times (\text{seyreltme fakt\ddot{o}r\ddot{u}})$$

3.2.5.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine etkilerinin analizi

Glutatyon peroksidaz deneyi Kristina Radic vd. (2020) tarafından kullanılan yöntemle göre yapılmıştır. Kısaca, 20 µL sitozol, 800 µL ETDA içeren Tris-HCl tamponu (50mM), 10 µL glutatyon redüktaz (20unit/mL), 40 µL glutatyon (200mM), 100µL sodyum azid içeren tamponu (30mM), 10 µL NADPH (10mM) ve 10 µL sızma zeytin yağı örneği veya Kersetin (0,25; 0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL) ile karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon, 10 µL terbütildidroperoksit (30 mM) ilave edilerek başlatılmıştır. Absorbans, 5 dakika boyunca her dakika 340 nm olarak ölçülmüştür. Absorbans'ın düşüş oranının, örnekteki GPx aktivitesi ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir. Bir birim, 25 ° C'de dakikada 1 nmol NADPH'nin NADP⁺ 'ya oksidasyonuna neden olacak enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır

$$EA (IU/mL) = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme fakt\ddot{o}r\ddot{u}})$$
$$\epsilon_{340} = \text{NADPH için 340 nm'deki sönümleme katsayısı}$$

3.2.5.5 Sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesine etkilerinin analizi

Glutatyon-S-transferaz aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile GSH konjugatının oluşum hızı 340 nm'de ölçülerek test edilmiştir (Habig vd. 1981). Reaksiyon karışımı, 1 mL nihai hacimde sızma zeytinyağı örnekleri ve kuersetin (0.25; 0.5; 1; ve 4 mg/mL), sitozol, 20 mM CDNB (etanol içinde) ve 50 mM GSH içeren 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,5) içermiştir. Küvetteki karışımının absorbansı 2 dakika boyunca 340 nm'de ölçülmüştür. Deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesi (EA) ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

ϵ_{340} = CDNB için 340 nm'deki sönmleme katsayısı

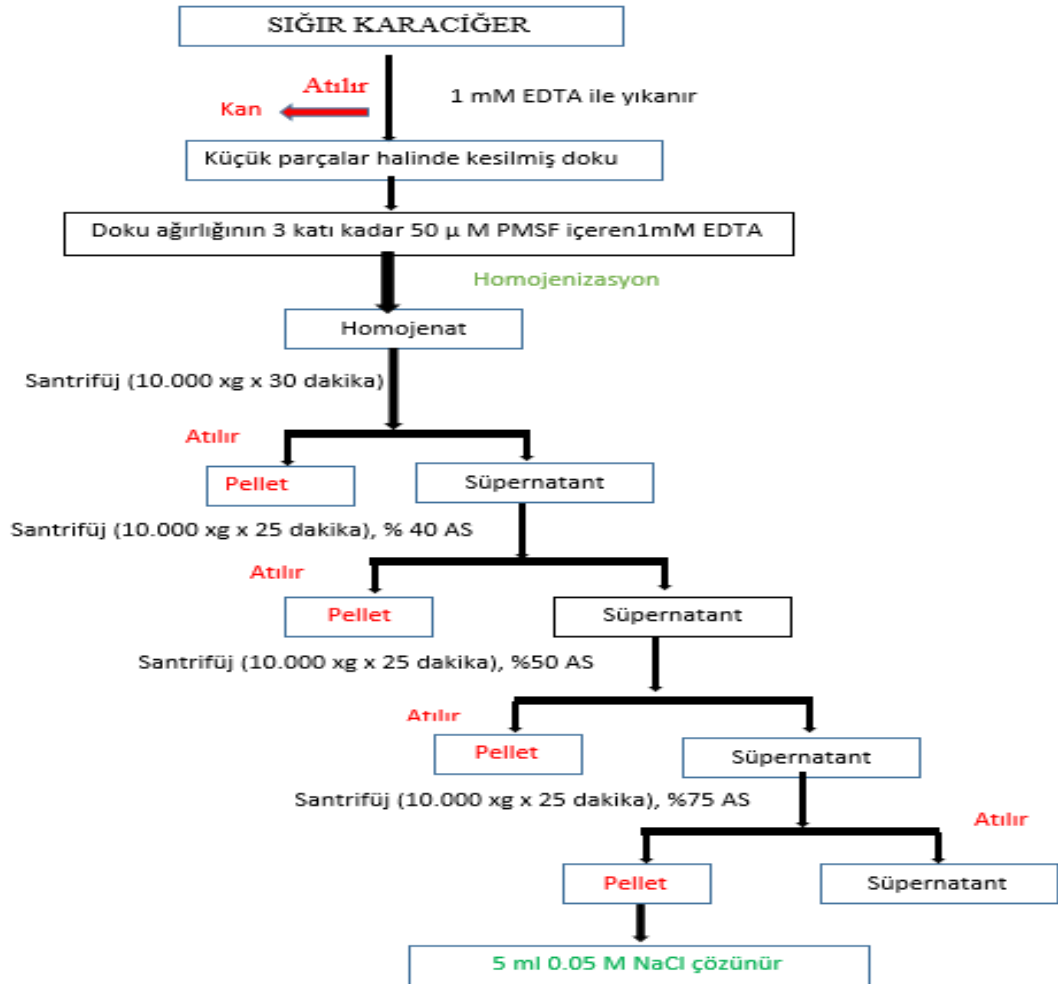
3.2.6 Sızma zeytinyağı örneklerinin aldoz redüktaz (AR) aktivitesi üzerine etkilerinin analizi

Aldoz redüktaz enzimin aktivitesi belirlemek için önce sitozolden enzimin izole edilmesi gerekecektir. AR enzimi izole edildikten sonra enzim lizatında protein miktar belirlenmiştir.

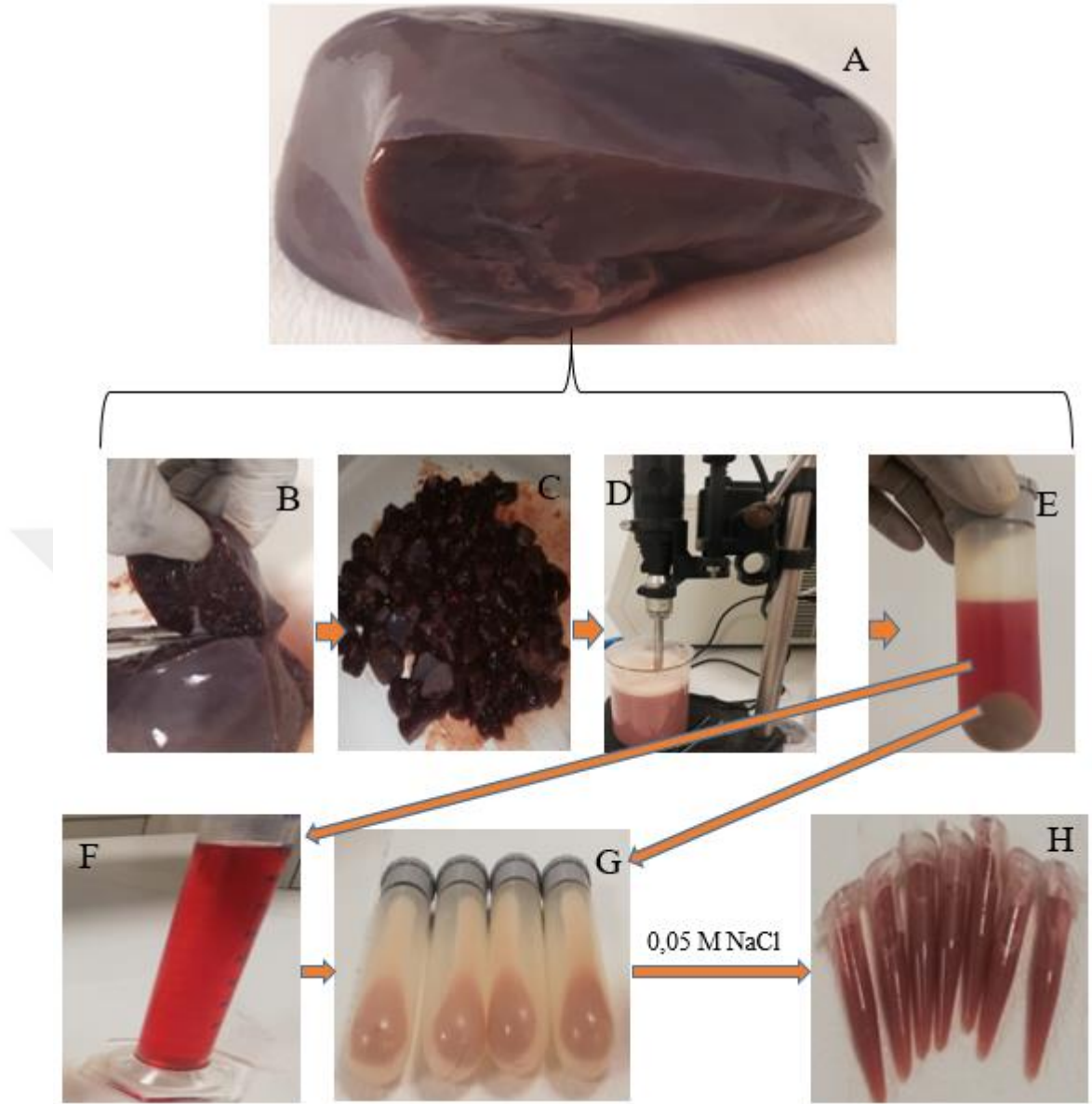
3.2.6.1 Aldoz redüktaz izolasyonu

Deneylerde kullanılan AR enzimi sığırın karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Kurban bayramında kurban kesme yerlerinden alınan sığır karaciğer dokusu, bekletilmeden sıvı azot içerisine konulmuş ve enzim izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. İzolasyon işlemi daha önce optimize edilmiş yöntem (Onay 2008, Yıldırım vd. 2014) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta, -80°C'de saklanmış karaciğer dokusu makas yardımıyla küçük parçalara kesilip 1 mM EDTA ile yıkanmış ve karaciğer dokusunun üç katı kadar 1 mM EDTA, 50 µM PMSF çözeltisi ilave edilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C'de, 10,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. %40 doygunluk için, elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 22,6 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra, +4°C'de, 10,000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. %40 doygunluktaki süpernatanı %50 doygunluğa

ulaştırmak için, elde edilen her 100 mL supernatant üzerine 5,8 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra tekrar +4°C’de, 10,000 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir. %50 doygunluktaki supernatantı %75 doygunluğa ulaştırmak amacıyla elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 15,9 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve sonra tekrar +4°C’de, 10,000 rpm’de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellet, 0,05 M sodyum klorür ile çözölerek enzim aktivite deneyleri yapılıncaaya kadar -80°C’de saklanmıştır. şekil 3.5 aldoz redüktazın izolasyonundaki farklı aşamaları özetlemektedir.



şekil 3.5 Sığır karaciğerden aldoz redüktaz enziminin izolasyon basamakları (Kurşun vd. 2021)



Şekil 3.6 Aldoz redüktaz izolasyonunda işlem göreselleri

A: Karaciğer, B: karaciğer kesimi, C: küçük parçalar halinde kesilmiş karaciğer dokusu; D: Homojenizasyon işlemi; E santrifüjlemeden sonra pellet ve süpernatant ayrılmış hali; F: Süpernatant; G: Pellet; H: Aldoz redüktaz içeren sitozol.

3.2.6.2 Protein tayini

Aldoz redüktaz enzimi için protein tayini yukarıda belirttiğimiz Lowry metodu ile yapıldı

3.2.6.3 Aldoz redüktaz enzimin aktivite tayini

Sığır karaciğer dokusundan saflaştırılmış aldoz redüktaz (AR) enziminin aktivitesi, Yıldırım vd. (2014) tarafından belirlenen yöntemle göre belirlenmiştir. Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan DL-gliseraldehit, AR enzimi tarafından gliserole indirgenmektedir. Aynı zamanda, AR enziminin kofaktörü olan NADPH da NADP⁺ 'ye oksitlenmektedir. Deney mikroparka kullanarak yapılmıştır. Her kuyucukta reaksiyon ortamı 10µL %80'lik metanol ve sızma zeytinyağı örneği, (0,25 ; 0,5, 1 ; 2 ve 4 mg/mL), 20µL AR enzimi, 20 µL NADPH (0.5 m M) ve 150µL sodyum fosfat (Na-P) tamponunun (200 mM, pH 6,2) eklenmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra üzerine 50 µL DL-GA (10 mM) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımındaki absorbans azalması 5 dakika süresince 340 nm'de takip edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden ve NADPH'ın ekstinksiyon katsayısından yararlanarak AR enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Deney tüm örnekler için en az üç kez tekrarlanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/\epsilon_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

ϵ_{340} = NADPH için 340 nm'deki sönümleme katsayısı

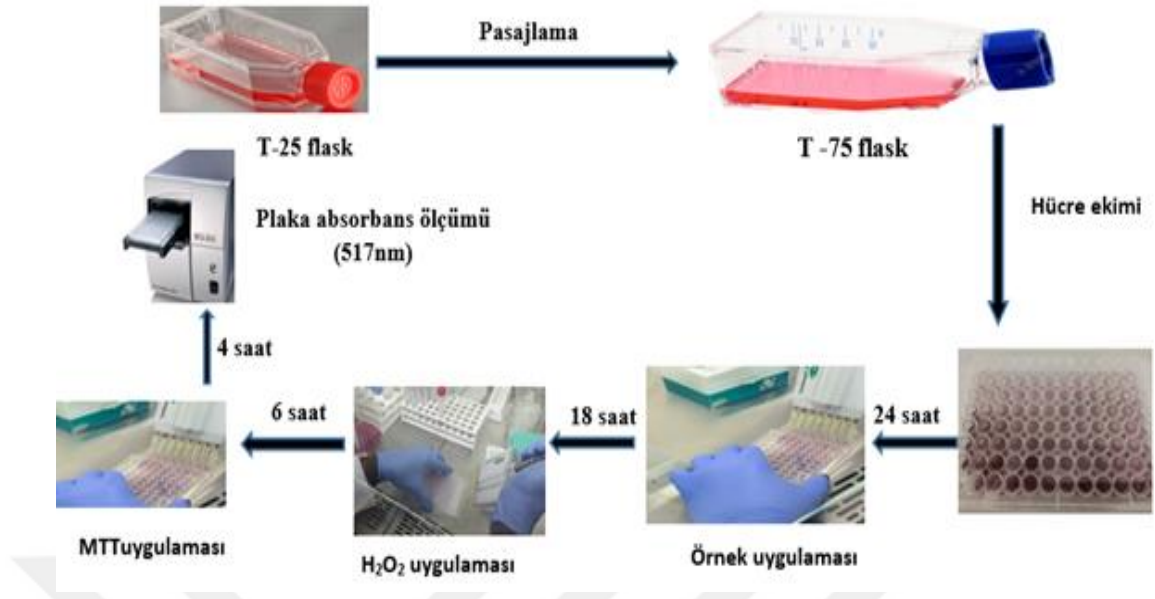
3.2.7 Sızma zeytinyağı örneklerinin hücre koruyucu etkilerinin belirlenmesi

Hücre hatı büyütülmesi : Tez çalışması kapsamında kullanılan farklı sızma zeytinyağı örneklerinin hücre koruyucu etkilerinin belirlenmesi için Vero (ATCC CCL-81) normal böbrek epitel hücre hatları kullanılmıştır. Vero hücre hatları % 10'luk FBS ve %1'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besi yerinde ekim yapılmıştır. Son ekimi yapılan hücreler %5'lik CO₂ ve 37°C ortamda inkübe edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında farklı sızma zeytinyağı örneklerinin hücre koruyucu etkisinin belirlemek amacıyla Vero hücre hattı kullanılmıştır. Vero hücreleri böbrek epitel hücre olarak glomerüler filtrasyon sırasında farklı gıda bileşiklerine maruz kalmaktadır. Sızma zeytinyağları fenolik bileşikler açısından zengin bir gıdalardan biridir. Bazı fenolik bileşik bağırsak epitel hücrelere herhangi bir modifikasyon olmadan ulaşmaktadır (Deiana vd. 2018). Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında Vero hücre hatları seçilmiştir.

Vero hücreleri T-25 flasklarda %10 fetalbovine serum (FBS), 20 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 hücre besiyerinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren koşullarda geliştirilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşarak, flask yüzeyini % 80- 90 oranında kaplayan hücreler tripsin yardımı ile toplanarak T-75 flasklara transfer edilmiş ve belli yoğunluklarda pasajlanmıştır. Pasajlama yaparken besi yeri çekildikten sonra flask yüzeyinde yapışmış hücrelerin PBS ile yıkanmıştır. Yapışmış hücreler kalkması için kültür ortamına % 0,05 Tripsin-EDTA uygulanıp 3 dakikada inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra toplanan hücrelerden canlı hücre sayımı tripan mavisi kullanarak yapılmış ve yapılacak deneye ihtiyacına göre mikro-plakalara belirli miktarlarda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Geri kalan hücreler sonraki deneyde kullanmak üzere pasajlanmıştır.

Hücre koruyucu etkileri araştırılması: 6×10^4 hücre/kuyu yoğunluğunda Vero hücreleri içeren 100 µL ortam (%10 FBS ile desteklenmiş RPMI1640) 96 oyuklu plakalara ekilecek 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edilmiştir. Ortam daha sonra aspire edilmiş ve farklı zeytinyağı örnek veya askorbik asit içeren taze ortam ile değiştirilip 18 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol gurubunda örneklerin yerine metanol içeren mediyum kullanılmıştır. Daha sonra mikro plakalar 18 saat boyunca inkübe edilmiştir. Vero hücrelerin üzerine stres indüklemek için ortama 0,8 mM hidrojen peroksit (H₂O₂) ilave edilecek ve 6 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ortama daha sonra 10 µL taze hazırlanmış MTT solüsyonu (5 mg/mL PBS) ilave edilecek ve 4 saat inkübasyona alınmıştır. Inkübasyon sonrası, besi yeri aspire edilip ve formazan mavisi kristalleri 100 µL DMSO içinde çözülmüştür. Kuyucuklarda oluşan formazan kristali her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek çözülmüştür. Oluşan mor rengin absorbansı bir mikropilaka okuyucu (BioTek) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Pozitif kontrol için askorbik asit kullanılmıştır (Nur Sazwi vd. 2013).



Şekil 3.7 Hücre koruyucu deney aşamaları

Çizelge 3.2 Hücre koruyucu etkilerin tayini için deney tasarımı

1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	4. tekrar	5. Tekrar	6. Tekrar	7. Tekrar	8. Tekrar	9. Tekrar
Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂	Hücre + örnek + H ₂ O ₂
Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂	Hücre + H ₂ O ₂
Blank (Kör)	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH	Hücre +MeOH

Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı} = (A_0 - A_1) / A_1 * 100$$

A: Kör absorbansı

A₀: Örnek ve hidrojen peroksit veya tek hidrojen peroksit içeren hücrelerin absorbansı

A₁: Negatif kontrol absorbansı

3.2.8 İstatistiksel analizler

Tez çalışma kapsamında elde edilen verilerin analizleri için GraphPad prism 8 yazılım programı kullanılmıştır. Farklı gruplar arasındaki farklılıklar student t-test ve one-way ANOVA kullanarak belirlenmiştir. Her deney en az üç tekrar yapılmıştır ($n \geq 3$). Elde edilen üç tekrarlı sonuçların ortalaması $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. P değeri $P < 0,05$ olduğunda, elde edilen deneyi sonuçları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Sızma zeytinyağı örneklerinin ekstraksiyon verimi

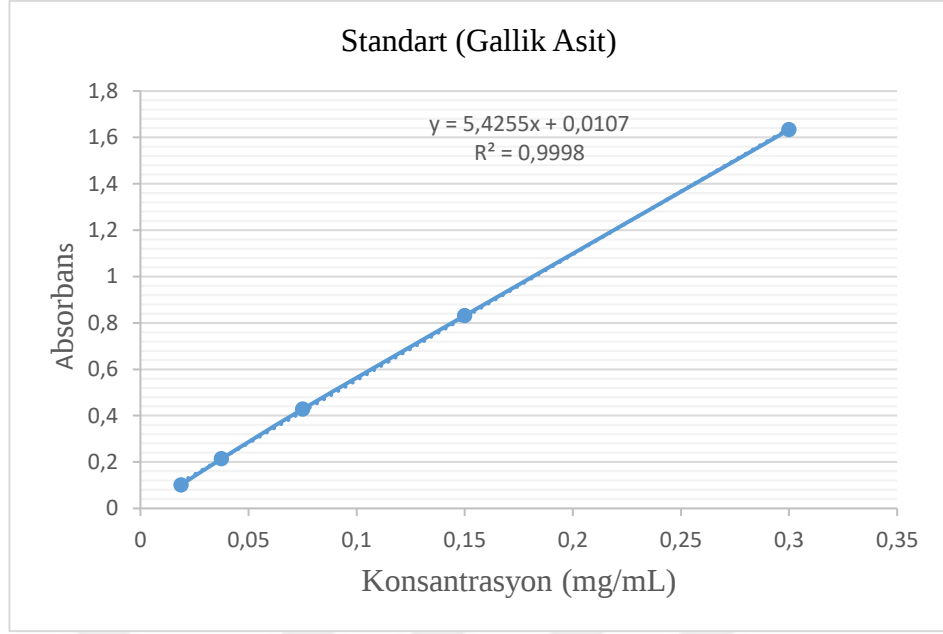
Çalışmamızda, farklı sızma zeytinyağlarının kuru ekstre miktarı ve ekstraksiyon verimi çizelge 4.1’de gösterildiği gibi hem kuru ekstre miktarı ve hem de verim değeri açısından en yüksek olan sıgma zeytinyağı çeşidi İzmir sofralıktan olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1 Sızma zeytinyağlarının kuru ekstre miktarı ve ekstraksiyon verimi

Örnekleri	zeytinyağı + metanol (W/V)	Kuru örnek (mg)	Ekstraksiyon verimi (%)
Ayvalık	10 g + 5mL	16,7	0,167
İzmir sofralık	10 g + 5 mL	62,4	0,624
Tavşan yüreği	10g + 5 mL	45	0,45
Kilis yağlık	10 g + 5 mL	47,6	0,476
Memecik	10g + 5 mL	37,4	0,374

4.2 Toplam fenolik içerik sonuçları

Sızma zeytinyağı örneklerin fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.1’de gösterildiği gibi, sızma zeytinyağının farklı örneklerinde toplam fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi için standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarından elde edilen absorban değerleri kullanarak gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (şekil 4.1). Çizilen gallik asit kalibrasyon eğrisinin lineer regresyonun denkleminin ($y = 5,4255x + 0,0107$) yardımıyla farklı sızma zeytinyağlarının fenolik madde içeriği hesaplanmıştır. Fenolik madde içeriği bir gram kuru sızma zeytinyağı ekstresinin başına, mg gallik asit eşdeğeri (mg GA E/g) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.1 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit kalibrasyon eğrisi

Sızma zeytinyağların toplam fenolik madde miktarı tayinde elde edilen veriler çizelge 4.2’de sunulmuştur. En yüksek toplam fenolik madde miktarı içeren örnekler sırasıyla İzmir sofralık ve Kilis yağlık olarak gösterilmiştir. Bu örnekler sırayla 180.12 ± 1.04 ve 157.76 ± 1.3 mg GAE/g değerine sahip olarak bulunmuştur. En düşük toplam fenolik madde miktarı ise sırayla 33.13 ± 5.88 ve 39.60 ± 1.10 mg GAE/g olmak üzere Tavşan yüreği ve Ayvalık örneklerinde görülmüştür.

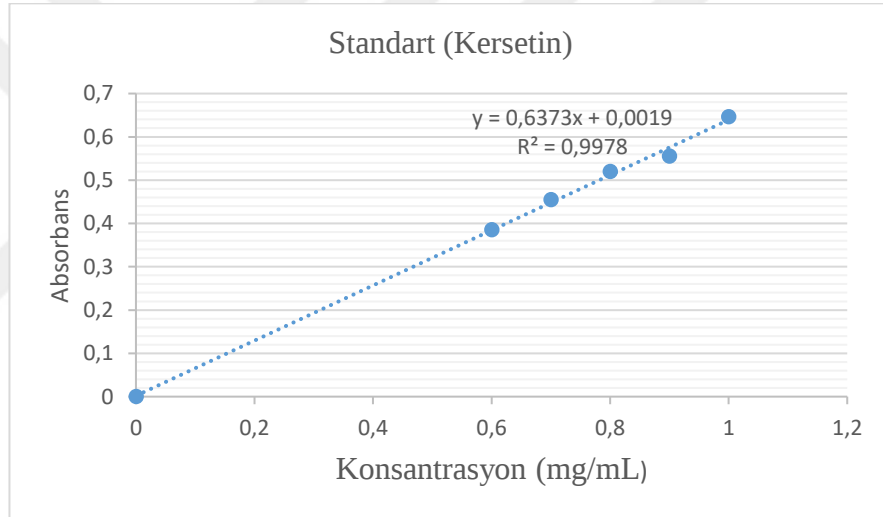
Çizelge 4.2 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam fenolik madde miktarı

Sızma zeytinyağı çeşitler	Toplam fenolik içeriği (mg GAE/g)
Ayvalık	39.60 ± 1.10^d
İzmir sofralık	180.12 ± 1.04^a
Tavşan yüreği	33.13 ± 5.88^e
Kilis yağlık	157.76 ± 1.3^b
Memecik	$122,04 \pm 0,61^c$

Tüm değerler, ortalama $\pm$ Std sapma ($n \geq 3$) olarak ifade edilmiş ve $p < 0.05$ dir

4.3 Toplam flavonoid içerik sonuçları

Sızma zeytinyağının farklı örneklerindeki toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için standart olarak kersetin kullanılmıştır. Kersetin kalibrasyon eğrisi 0,2 ila 1 mg/mL arasında değişen farklı konsantrasyonları kullanarak çizilmiştir. Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam içeriği, kersetin'in lineer regresyonun denklemi ($y = 0,6373x + 0,0019$) kullanılarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid madde içeriği bir gram kuru sızma zeytinyağı ekstresinin başına, mg kersetin eşdeğeri (mg QEq/g) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.2 Toplam flavonoid madde miktar tayini için kersetin kalibrasyon eğrisi

Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoit madde miktarı çizelge 4.3'te sunulmuştur. Toplam flavonoit miktarı tayininde en yüksek rakam gösteren örnekleri Kilis yağlık ve Memecik örnekleridir. Bu sızma zeytinyağı örnekler sırayla, $273,06 \pm 5,22$ ve $244,93 \pm 4,15$ mg QE/g toplam flavonoit içerik göstermiştir. Ayrıca tavşan yüreği toplam fenolik madde miktarı tayininde olduğu gibi düşük toplam flavonoit miktar gösterirken Ayvalık yüksek flavonoit miktarı göstermiştir.

Çizelge 4.3 Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid madde miktarı

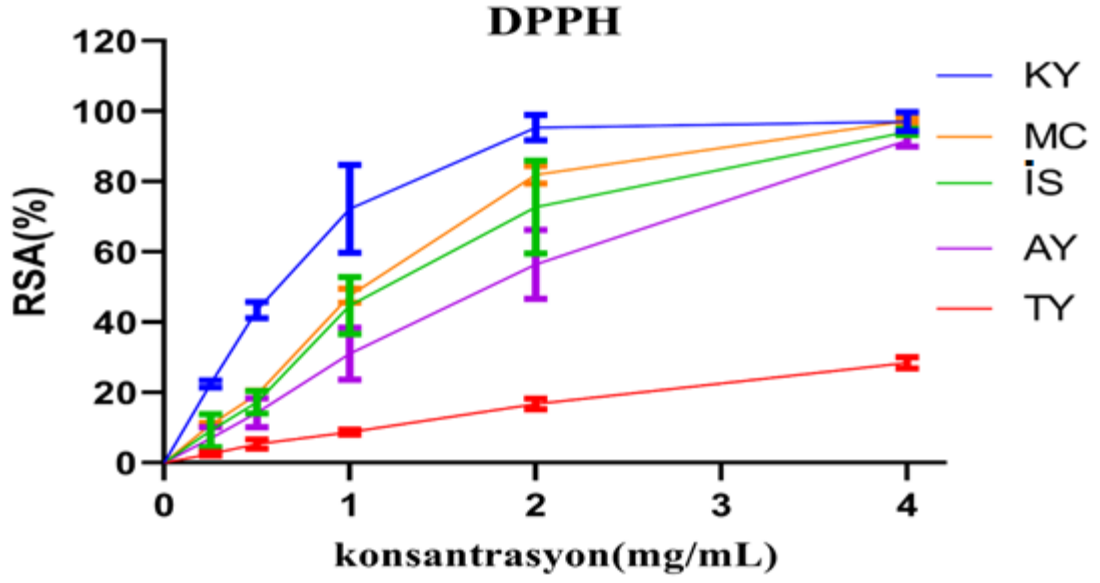
Sızma zeytinyağı çeşitler	Toplam flavonoit içeriği (mg QE/g)
Ayvalık	176,82 ± 10,14 ^c
İzmir sofralık	128,29 ± 6,64 ^d
Tavşan yüreği	45,44 ± 5,02 ^e
Kilis yağlık	273,06 ± 5,22 ^a
Memecik	244,93 ± 4,15 ^b

Tüm değerler, ortalama ± Std sapma (n ≥3) olarak ifade edilmiştir, p < 0.05dir.

4.4 Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi

4.4.1 DPPH radikal temizleme aktivitesi

Farklı sızma zeytinyağların radikal temizleme aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. En düşük konsantrasyonlar düşük süpürme aktivitesi göstermiştir. Bu nedenle sızma zeytinyağı ekstraktlarının DPPH radikalini indirgeme aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. En yüksek antiradikal aktivite gösteren sızma zeytinyağı örnekleri sırasıyla KY, MC, İS ve AY olmuştur (şekil 4.3 ve çizelge 4.4). Tavşan yüreği örneği diğer örnekler ile kıyaslandığında düşük radikal temizleme aktivite göstermiştir. Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin %50 inhibe edici konsantrasyonları (IC₅₀) Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Bu konsantrasyonlar, bir maddenin veya özütün DPPH radikalini azaltma yeteneğini ifade eder. Düşük IC₅₀ değerlerine sahip örnekler iyi bir radikal süpürme yeteneğine sahiptir. KY, IS ve MC sırasıyla 0,82 ± 0,03, 1,20 ± 0,08 ve 1,57 ± 0,02 mg/mL ile en düşük IC₅₀ değerlerini göstermiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.3 Sızma zeytinyağı örnekleri DPPH radikal temizleme eğrileri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik. Tüm değerler, ortalama $\pm$ Std sapma ($n \geq 3$) olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.4 sızma zeytinyağlarının DPPH radikali süpürme yüzdeleri

kons (mg/mL)	Radikal süpürme yüzdesi				
	Kilis yağlık	Tavşan yüreği	İzmir sofralık	Ayvalık	Memecik
0,25	22,49 $\pm$ 1,09	2,57 $\pm$ 0,53	9,14 $\pm$ 4,73	6,99 $\pm$ 3,24	10,84 $\pm$ 0,47
0,5	43,44 $\pm$ 2,28	5,33 $\pm$ 1,33	17,20 $\pm$ 3,29	14,28 $\pm$ 4,16	19,46 $\pm$ 1,13
1	72,23 $\pm$ 12,51	8,71 $\pm$ 0,77	44,74 $\pm$ 8,07	31,02 $\pm$ 7,41	47,55 $\pm$ 2,00
2	95,32 $\pm$ 3,62	16,74 $\pm$ 1,46	72,75 $\pm$ 13,21	56,46 $\pm$ 9,80	81,90 $\pm$ 2,54
4	97,02 $\pm$ 2,75	28,44 $\pm$ 1,63	94,10 $\pm$ 0,97	91,76 $\pm$ 1,83	97,28 $\pm$ 0,74

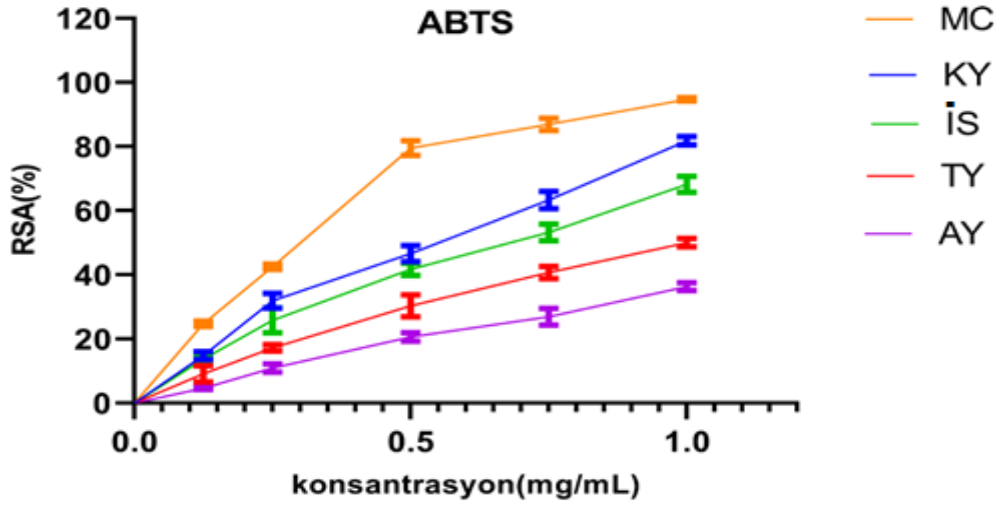
Tüm değerleri en az üç kere tekrarlanmıştır, ortalama $\pm$ std sapma ($n \geq 3$). Gruplar arasındaki farkı $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır

Çizelge 4.5 Sızma zeytinyağı örneklerin DPPH radikal temizleme IC₅₀ değerleri (n ≥3)

Sızma zeytinyağı örnekler	IC ₅₀ (mg/ml)
Ayvalık	1.83 ± 0.04
İzmir sofralık	1.20 ± 0.08
Tavşan yüreği	7.07 ± 0.41
Kilis yağlık	0.82 ± 0.03
Memecik	1,57 ± 0,02
Gallik asit	0.009 ± 0.06

4.4.2 ABTS radikal temizleme aktivitesi

Farklı natürel sızma zeytinyağlarının ABTS radikal süpürme aktivitesi Şekil 4.4 ve çizelge 4.6 ve 4.7'de sunulmuştur. Şekil 4.8 farklı natürel sızma zeytinyağı örneklerinin ABTS anti-serbest radikal aktivitesi eğrilerini göstermektedir. Çizelge 4.7 sızma zeytinyağlarının ABTS radikal süpürücü IC₅₀ değerlerini göstermektedir. MC, KY ve IS numuneleri sırasıyla 0,38, 0,56 ve 0,69 mg/mL IC₅₀ değerleri göstermektedir. DPPH radikal süpürme aktivitesinde olduğu gibi, KY, MC ve IS iyi bir ABTS radikal süpürme etkisi gösteren örneklerdir. Ancak, MC ABTS radikali üzerinde KY'den daha etkili olmuştur. Benzer şekilde, en düşük ABTS radikali süpürme aktivitesine sahip örnek AY olmuştur.



Şekil 4.4 Sızma zeytinyağı örneklerinin ABTS radikal temizleme eğrileri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik. Tüm değerleri ortalama $\pm$ std sapma ($n \geq 3$) ve $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.6 Sızma zeytinyağların ABTS radikal süpürme yüzdeleri

kons(mg/mL)	Radikal süpürme yüzdesi (%)				
	Kilis yağlık	Tavşan yüreği	İzmir sofralık	Ayvalık	Memecik
0,125	14,80 $\pm$ 1,26	9,10 $\pm$ 2,53	13,70 $\pm$ 1,15	4,67 $\pm$ 0,46	24,78 $\pm$ 0,85
0,25	31,92 $\pm$ 2,34	17,24 $\pm$ 0,97	25,80 $\pm$ 3,98	10,99 $\pm$ 1,33	42,57 $\pm$ 0,84
0,5	46,61 $\pm$ 2,53	30,35 $\pm$ 3,37	41,73 $\pm$ 1,93	20,65 $\pm$ 1,29	79,52 $\pm$ 2,36
0,75	63,39 $\pm$ 2,75	40,72 $\pm$ 1,87	53,22 $\pm$ 2,58	26,96 $\pm$ 2,62	86,98 $\pm$ 1,95
1	81,89 $\pm$ 1,33	50,05 $\pm$ 1,33	68,20 $\pm$ 2,59	36,36 $\pm$ 1,16	94,75 $\pm$ 0,52

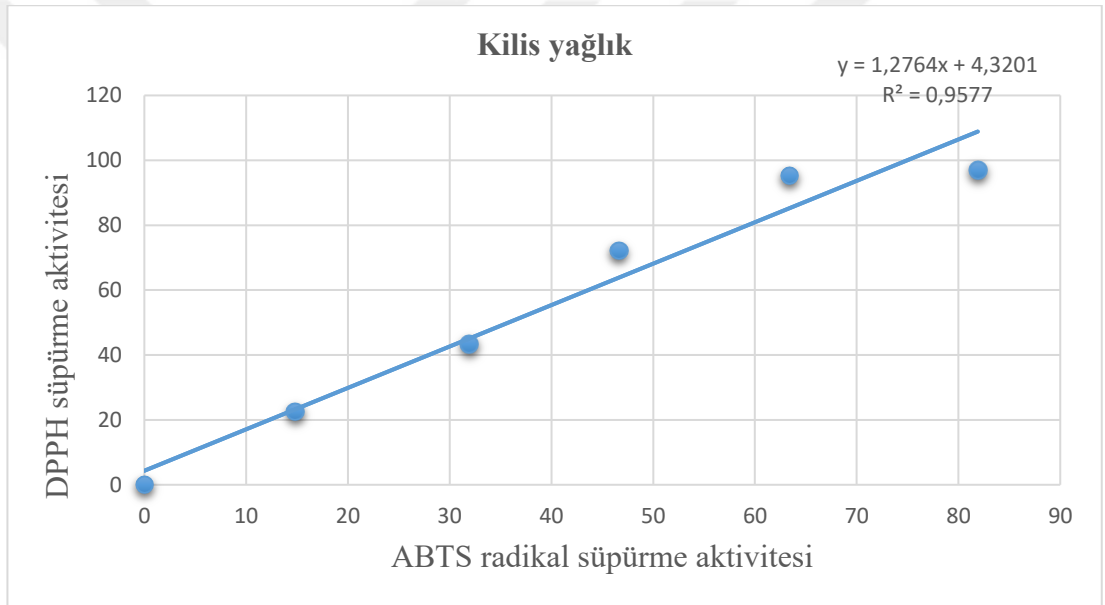
Tüm değerleri ortalama $\pm$ std sapma ($n \geq 3$) ve $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 4.7 Sızma zeytinyağı örneklerin ABTS radikal temizleme IC50 değerleri

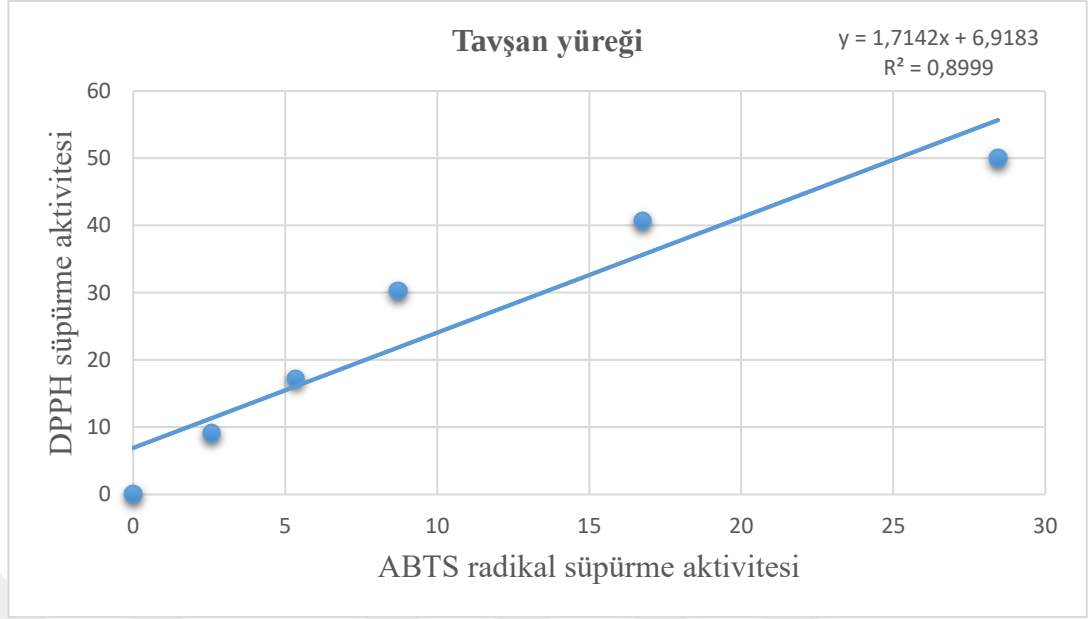
Sızma zeytinyağı örnekler	IC ₅₀ (mg/mL)
Ayvalık	1.40 $\pm$ 0.05
İzmir sofralık	0.69 $\pm$ 0.03
Tavşan yüreği	0.94 $\pm$ 0.01
Kilis yağlık	0.56 $\pm$ 0.01
Memecik	0,38 $\pm$ 0,01
Trolox	0.002 $\pm$ 0.01

4.4.3 DPPH ve ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyonlar

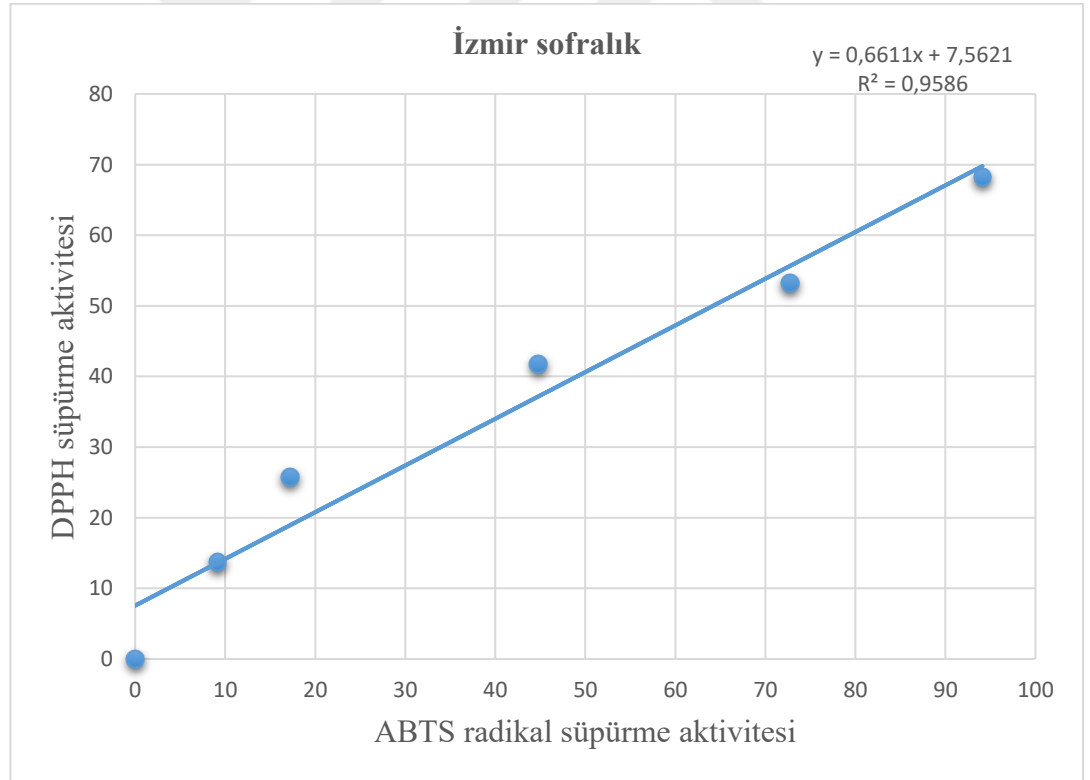
Korelasyon, radikal DPPH'nin süpürme aktivitesi ile radikal ABTS'nin süpürme aktivitesi arasında var olan bağlantıyı belirlemeyi mümkün kılmaktadır. Aşağıdaki grafikler, farklı sızma zeytinyağı örneklerinin DPPH ve ABTS radikalarının süpürme aktivitesi arasındaki korelasyonu temsil etmektedir. Tüm sızma zeytinyağı örnekleri pozitif bir lineer korelasyon göstermiştir. KY ve İS örneklerinin DPPH ve ABTS süpürme aktiviteleri sırasıyla $R^2 = 0.9586$ ve $R^2 = 0.9577$ ile iyi korelasyon göstermiştir (Çizelge 4.8).



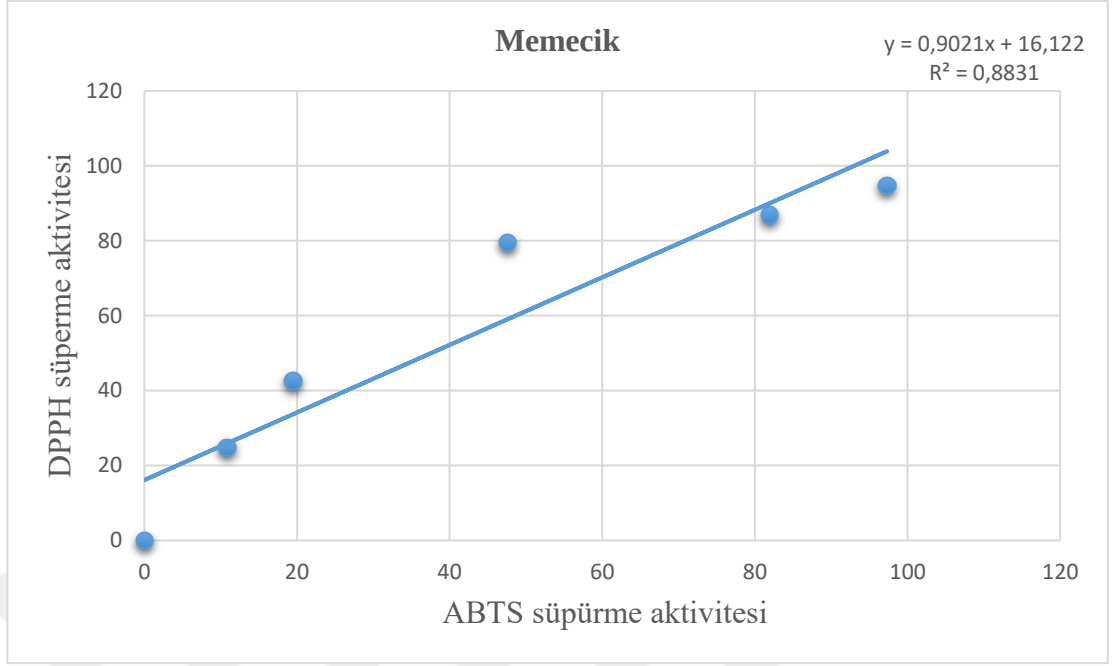
Şekil 4.5 Kilis yağlık örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği



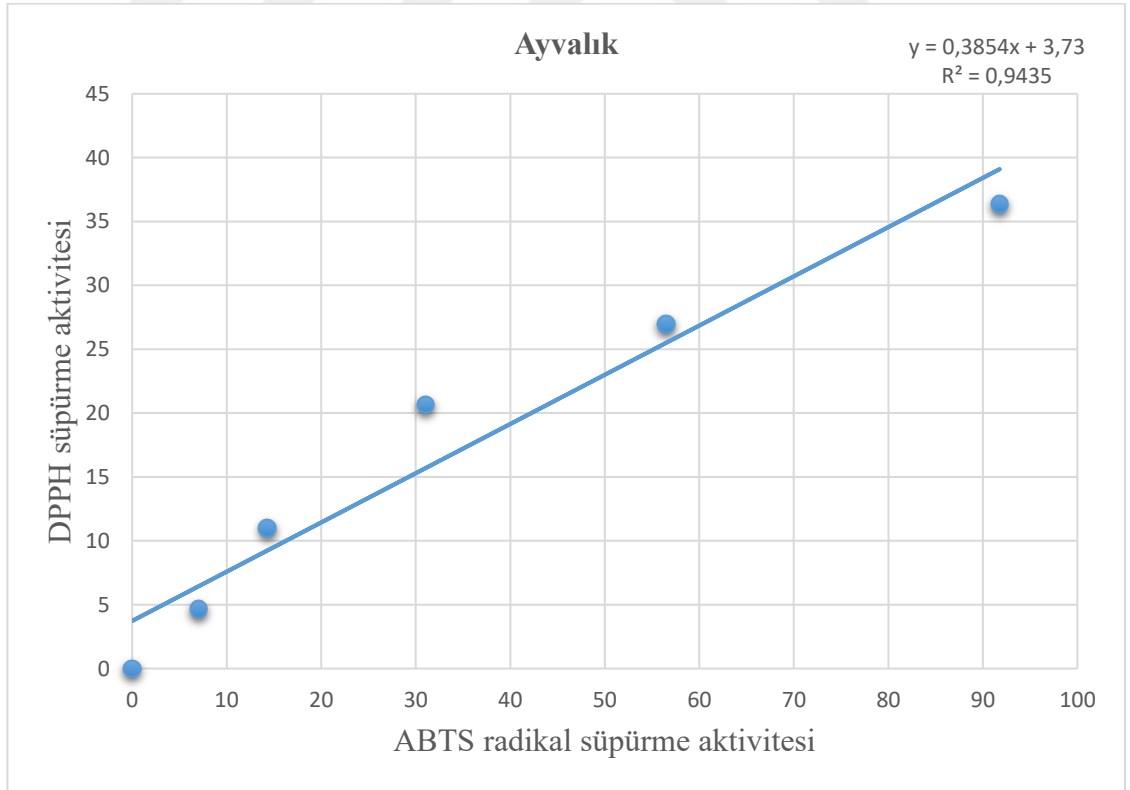
Şekil 4.6 Tavşan yüreği örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 4.7 Ayvalık örneğinin DPPH ile ABTS süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 4.8 Memecik örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktivitesi arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 4.9 Ayvalık örneğinin DPPH ile ABTS radikal süpürme aktiviteleri arasındaki korelasyon eğrisi

Çizelge 4.8 Tüm örneklerle ait DPPH ve ABTS arasındaki korelasyonun R^2 değerleri

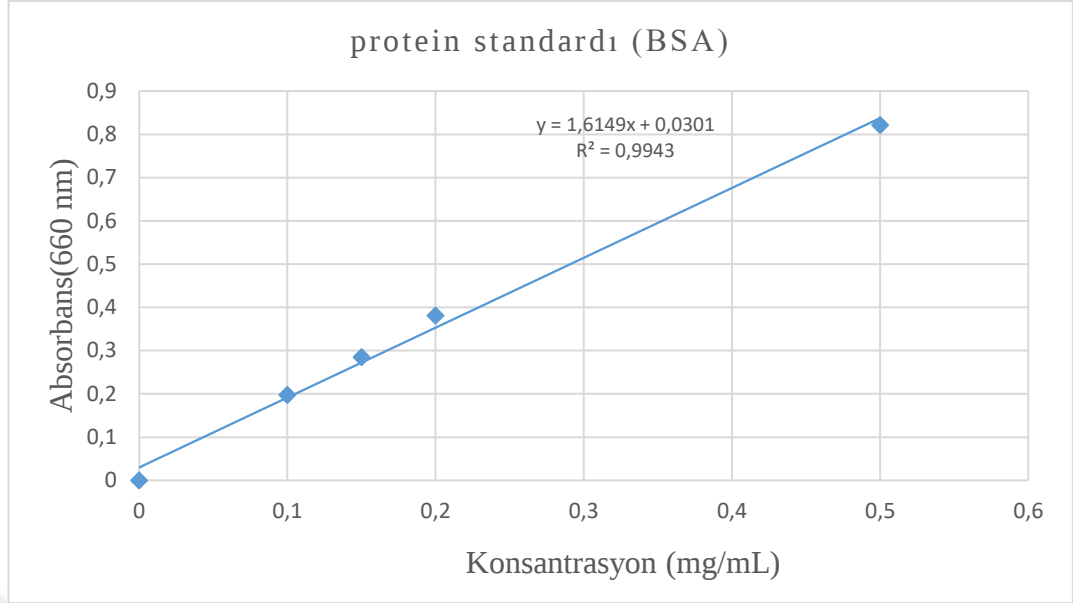
Sızma zeytinyağı örneği	DPPH ve ABTS Korelasyon
Kilis yalılık	$R^2 = 0,9577^{**}$
Tavşan yüreği	$R^2 = 0,8999^*$
İzmir sofralık	$R^2 = 0,9586^{**}$
Ayvalık	$R^2 = 0,9435^{**}$
Memecik	$R^2 = 0,8831^*$

Korelasyon (R^2) iki değişkenli bir analiz kullanılarak belirlenmiştir. Farklılıkları değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.5 Sızma Zeytinyağı Örneklerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkileri

4.5.1 Protein tayini

Enzim deneylerinde enzim kaynağı olarak sığır karaciğerinden izole edilen sitozol kullanılmıştır. Enzim deneylerin başlamadan önce sitozol'daki protein tayini Lowry yöntemi kullanarak yapılmıştır. Protein standardı olarak sığır karaciğer albumin (BSA) kullanılmıştır. Protein miktarı belirlemek üzere sitozol potasyum fosfat tamponu ile 20 kat seyreltilmiştir. Sekil 4.10'da sunulan kalibrasyon grafiği kullanarak sığır karaciğer dokusunda bulunan protein miktarı belirlenmiştir. Çizilen BSA kalibrasyon grafiği kullanarak sitozoldaki protein miktarı belirlenmiştir. 20 kat seyreltilmiş sitozollerinin protein miktarı $940,55 \pm 1,23 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplamıştır (Çizelge 4.9).



Şekil 4.10 Sığır karaciğer dokusunda toplam protein tayini için BSA kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.9 Enzim deneylerde kullanılan sığır karaciğer dokusunda protein miktarı (n≤3)

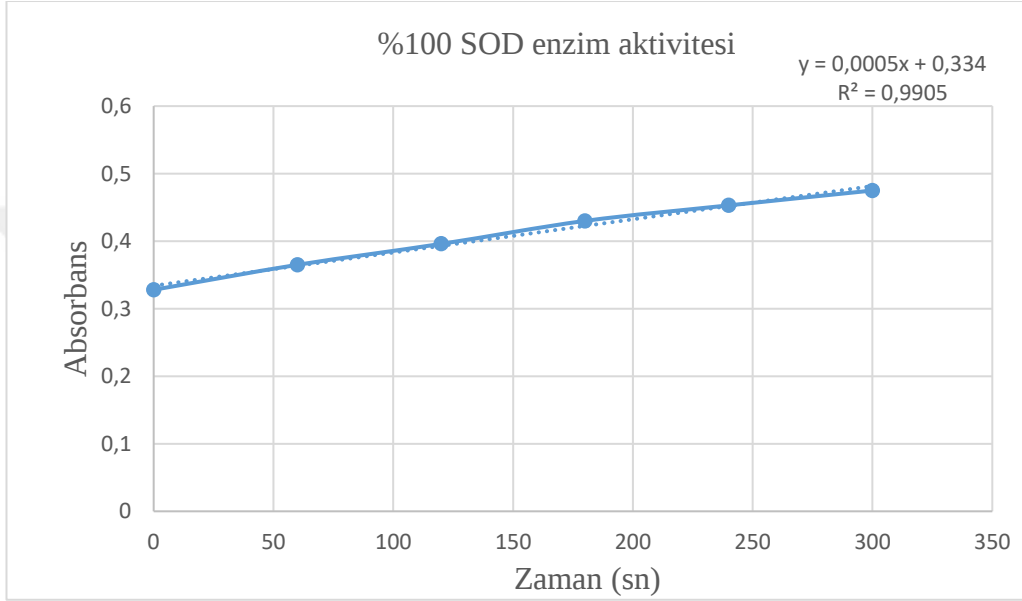
sitozol	Protein miktarı (µg/mL)
20 kat	940.55± 1.23

Sığır karaciğer dokusundan izole edilmiş sitozolunun protein miktarı 940,55µg/mL olarak belirlenmiş ve çalışmada enzim oranları bu değere göre belirlenmiştir.

4.5.2 Sızma zeytinyağların süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri

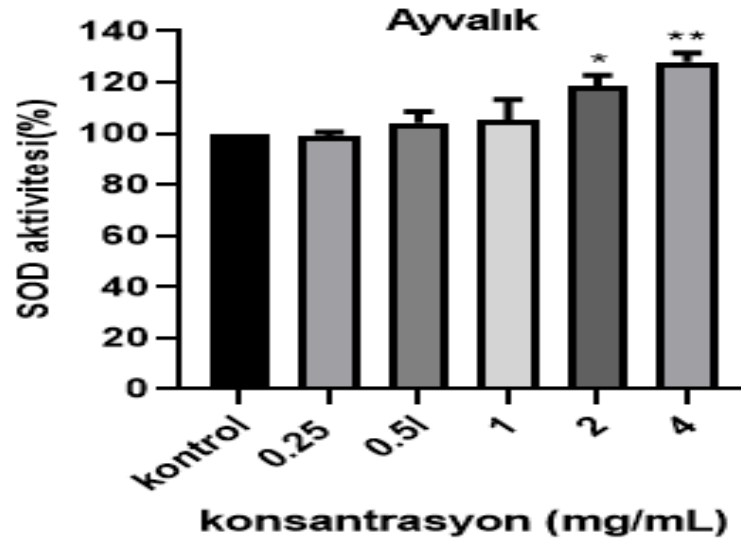
Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi antioksidan savunma sisteminin önemli enzimlerinden biridir. Bu çalışmada kullanılan süperoksit dismutaz enzimi sığır karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Sığır karaciğer dokusundan izole edilen süperoksit dismutaz enziminin aktif olup olmadığını doğrulamak için, izole edilen enzim sızma zeytinyağı örneklerinin uygulanmasından önce optimize edilmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi küvetteki reaksiyon karışımının absorbansındaki artış süperoksit dismutaz enziminin aktif olduğunu göstermektedir. SOD enziminin sızma zeytinyağı örneği olmadan tek başına oluşturduğu aktivite değeri %100 aktivite olarak belirlenmiştir. Sızma zeytinyağı örneklerinin SOD enziminin aktivitesi üzerine etkileri %100 aktivite değeri baz alınarak

hesaplanmıştır. Tavşan yüreği sızma zeytinyağı örneği hariç tüm sızma zeytinyağı örnekleri süperoksit dismutaz enzimi üzerinde aktive edici bir etki göstermiştir. Tavşan yüreği natürel sızma zeytinyağı örneği SOD enziminin inhibisyonunu göstermiştir. Ayrıca, bu sızma zeytinyağı örneğinin antioksidan aktivite seviyesinin (DPPH ve ABTS) çalışılan örneklerin çoğuna kıyasla düşük sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.11 SOD enzimi aktivite eğrisi

AY örneği düşük dozlarda SOD enzimi üzerine hafif inhibisyon etkileri göstermiştir. Ancak kullanılan yüksek konsantrasyonlarında SOD enzimini inhibe etmiştir. Şekil 4.12’de gösterildiği gibi 2 ve 4 mg/mL dozlarında sırayla % 18,43 ve % 27,87 değerlerinde SOD enzim aktivitesi artması görülmüştür.



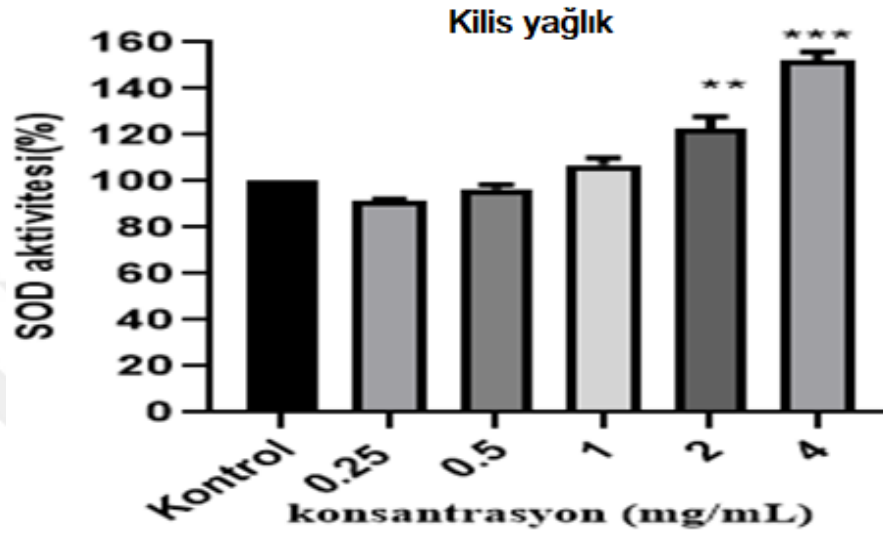
Şekil 4.12 Ayvalık örneğinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi
Deney gruplarının kontrol grubundan farkları **p < 0,01, * p < 0,05 ve ns p > 0,05 kabul etmiştir.

İS sızma zeytinyağı örneğinin düşük konsantrasyonları SOD enzimi inhibe ettiği görülmektedir. 0,25 ; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonları enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken 2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında %24,12 et %43,67 oranlarında aktivasyon yapması belirlenmiştir.



Şekil 4.13 İzmir sofralık örneğinin süperoksit dismutaz enzimin üzerindeki aktivitesi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3) **p < 0,01, * p < 0,05 ve ns p > 0,05 kabul etmiştir.

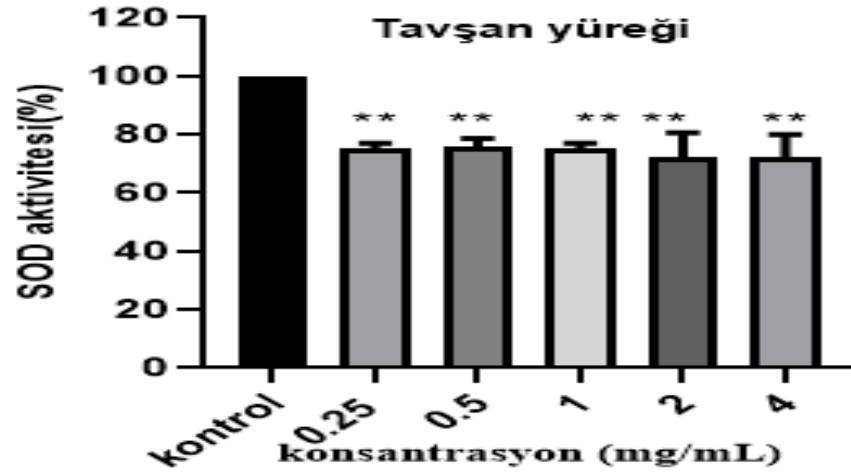
Şekil 4.14'te KY örneğinin SOD enzimi üzerinde olan etkisi sunmaktadır. KY'nin düşük konsantrasyonları (0,25 ve 0,5 mg/mL) SOD enzimi büyük ölçüde inhibe ederken 1, 2, 4 mg/mL dozlarında %7,15 % 22,83, % 52,29 oranlarında aktivasyon etkileri gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.14 Kilis yağlık örneğinin süperoksit dismutaz enzimin üzerindeki aktivitesi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3). Kontrole karşı elde edilen sonuçlar **p < 0,01, * p < 0,05 ve ns p > 0,05 kabul etmiştir.

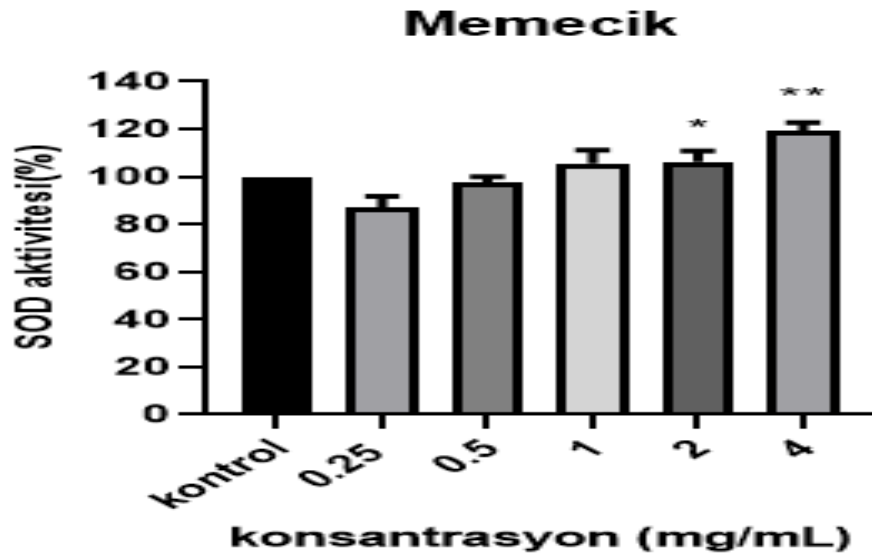
TY sızma zeytinyağı örneği SOD enzimi üzerine diğer örneklerle kıyasla farklı davranmıştır. TY'nin tüm konsantrasyonlarında inhibisyon gözlemlenmiştir. 0,25; 0,5 ;1 ve 2 mg/mL konsantrasyonları birbirlerinde çok yakın enzim inhibisyon değerlerine sahiptir. En yüksek konsantrasyonu %32,63 inhibisyon yaptığını göstermektedir.



Şekil 4.15 Tavşan yüreği örneğinin süperoksit dismutaz enzimi aktivitesi üzerine olan etkisi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). Kontrol karşı elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak ** $p < 0,01$ kabul etmiştir.

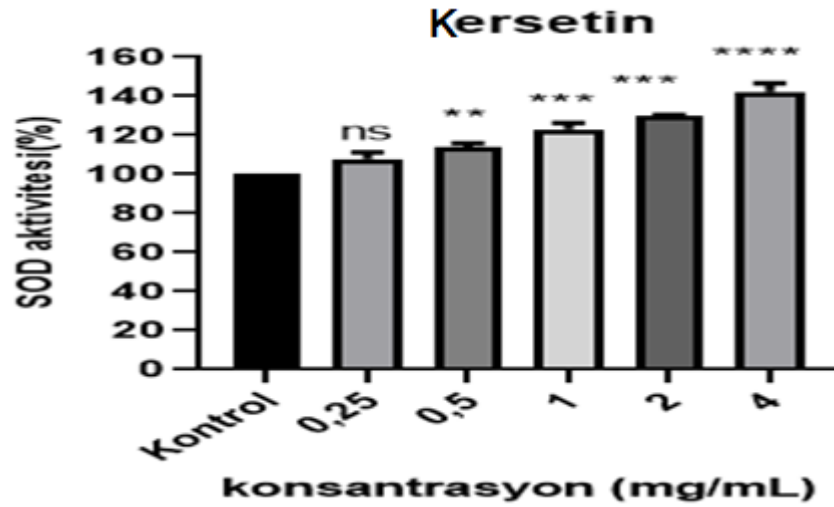
SOD enzim aktivite deneyinde sızma zeytin örnkeleri 5 farklı konsantrasyonda (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL) hazırlanmıştır. Memecik sızma zeytinyağı özütü düşük dozlarda etki göstermemiştir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda (2 mg/ml, 4mg/ml) sırasıyla %6,39 ve % 19,14 değerlerinde SOD enzim aktivitesi artması gözlemlenmiştir (şekil 4.20)



Şekil 4.16 Memecik örneğinin süperoksit dismutaz enzimin aktivitesi üzerine olan etkisi

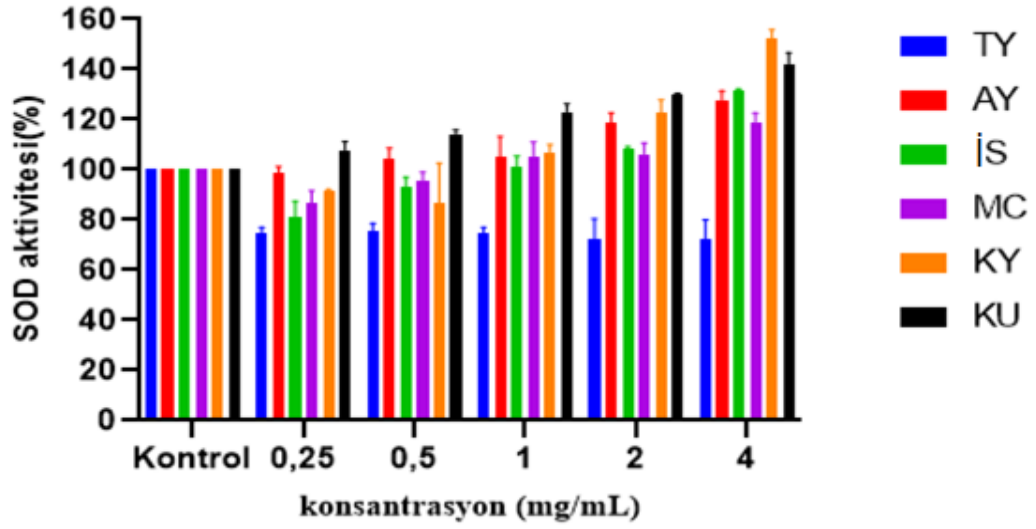
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). Kontrol karşı elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ kabul etmiştir.

Kersetin, antioksidan özellikleriyle bilinen zeytinyağında bulunan flavonoid ailesine ait bir bileşiktir. Bu çalışmada kersetin standart olarak kullanılmıştır. Tüm dozlar SOD üzerinde aktivasyon etkisi göstermiştir. Doz-cevap etkileri şekil 4.17'de sunulmuştur. Böylece 0.25mg/mL; 0.5mg/mL; 1 mg/mL; 2 mg/mL ve 4mg/mL dozları sırasıyla %7.91; %13.67; %23.11; %29.93; %42.37 aktivasyon değerleri göstermiştir.



Şekil 4.17 Memecik örneğinin süperoksit dismutaz enzimin aktivitesi üzerine olan etkisi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3). Kontrol karşı elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak *p < 0,05, ** p < 0,01 kabul etmiştir.

Tüm örneklerle ait SOD enzimi aktivitesi değerlerinin karşılaştırmaları Şekil 4.18'de çizildiği grafiklerle gösterilmiştir. KY, AY, MC ve İS örnekleri yüksek konsantrasyonlarıyla SOD aktivasyon etkileri gösterirken düşük konsantrasyonlarında inhibisyon etkileri görülmüştür. Kersetin (KU) tüm dozlarda aktivasyon etkileri göstermiştir. TY sızma zeytinyağı örneği tüm konsantrasyonlarında inhibisyon etkileri sunmuştur.

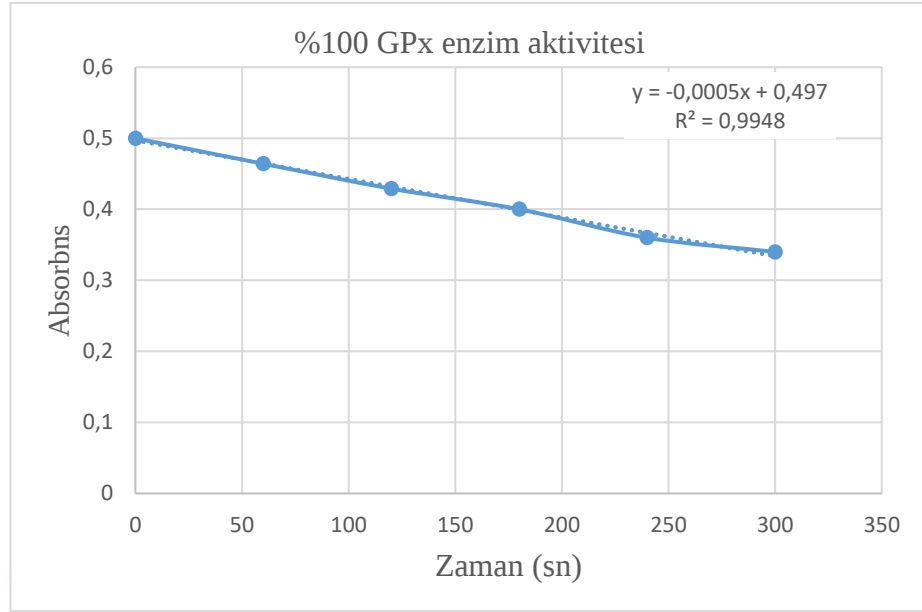


Şekil 4.18 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik. KU: Kersetin İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$)

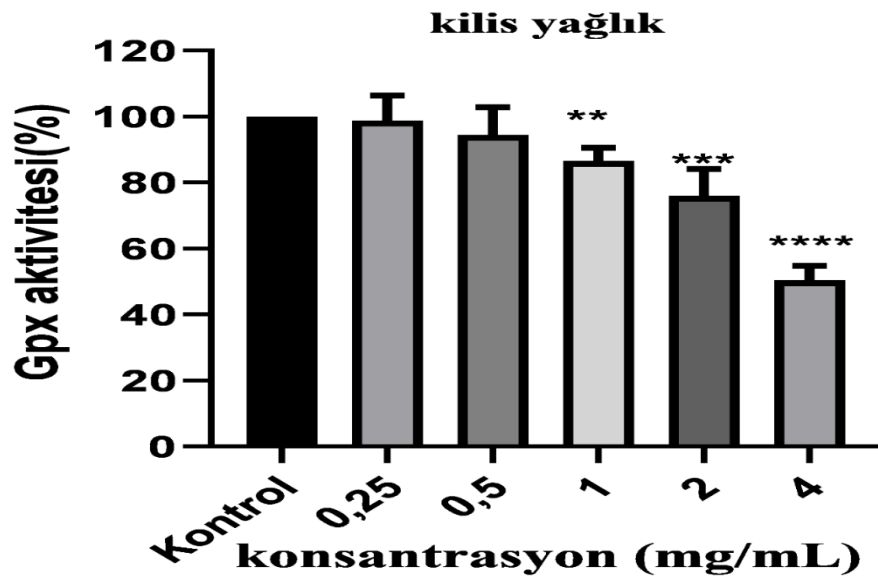
4.5.3 Sızma zeytinyağlarının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin aktivitesi 340 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Enzimin aktivitesi, küvetteki reaksiyon karışımının absorbansındaki azalma ile gösterilir (Şekil 4. 19). Bu deneyde, GPx enziminin tek başına, yani sızma zeytinyağı örnekleri olmadan aktivitesi %100 enzim aktivitesi olarak alınmış ve sızma zeytinyağı örneklerinin GPx enzim aktivitesi üzerindeki etkileri bu değer oranlanmasıyla belirlenmiştir. Tüm sızma zeytinyağı örnekleri GPx enzimi üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Ancak, MC numunesinin ilk üç konsantrasyonu (0,25, 0,5 ve 1 mg/mL) düşük bir aktivasyon etkisi göstermiştir. TY numunesi hariç tüm numuneler, 2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlarında enzim üzerinde yüksek inhibisyon etkileri göstermiştir.



Şekil 4.19 GPx enzim aktivite eğrisi

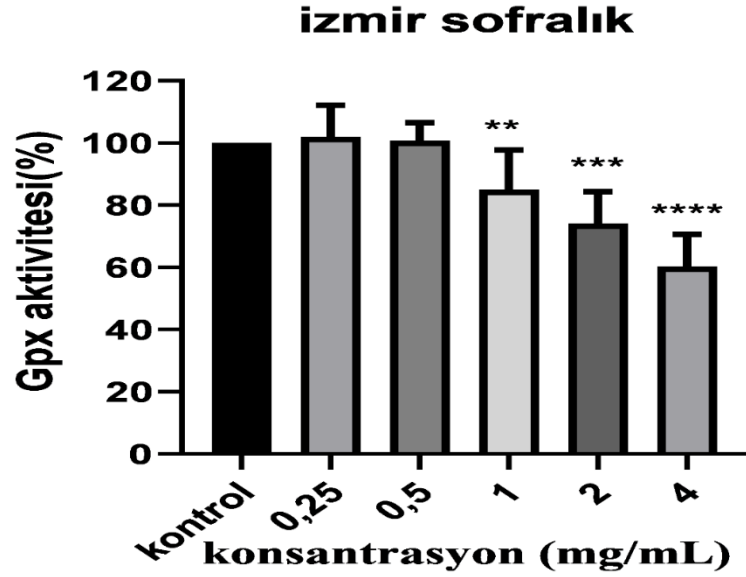
Kilis yağlık sızma zeytinyağı örneği GPx enzimi aktivitesi üzerine olan etkisi diğer örneklerden daha yüksek olduğunu görülmüştür. Bu örnek tüm konsantrasyonlarında etki göstermiştir. Böylece 0,25; 0,5; 1; 2 et 4 mg/mL dozları sırasıyla %1,17; %5,57; %13,40; %23,98, ve %49,58 oranında enzim inhibisyon etkileri belirlenmiştir.



Şekil 4.20 Kilis yağlık örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3). ** P<0,01, *** P<0,001, ****p < 0,0001.

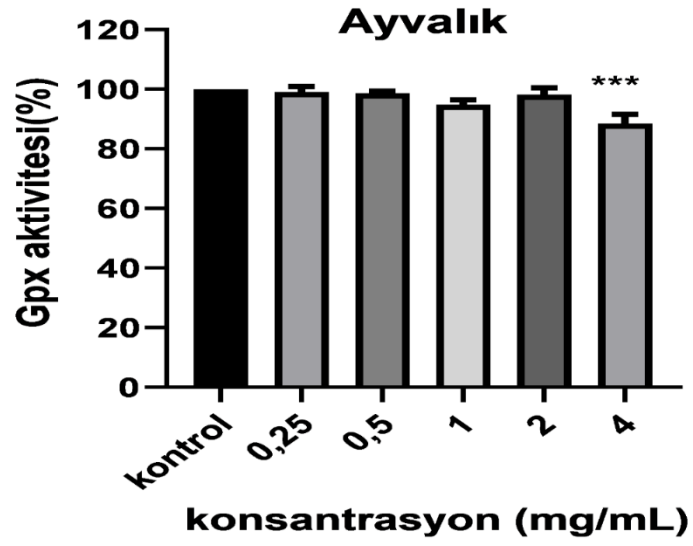
İzmir sofralık sızma zeytinyağı örneği, 0,25 et 0,5 mg/mL konsantrasyonlarında GPx enzimi üzerine etki göstermezken yüksek dozlarda büyük ölçüde etki göstermiştir. 1; 2 et 4 mg/mL dozlar için GPx enzimi inhibisyon değerleri sırasıyla %14,97 %25,81 ve 39,69% olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21 İzmir sofralık örneğinin glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

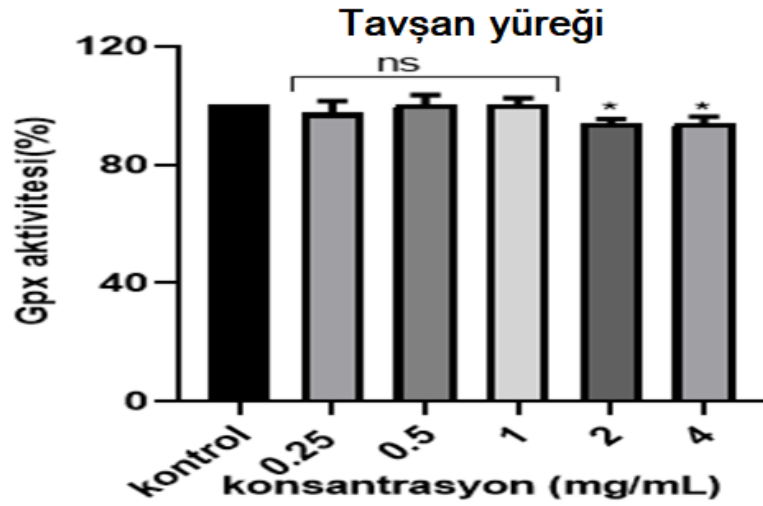
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3). **p < 0,01, *** p < 0,001, ****p < 0,000.

Ayvalık sızma zeytinyağı örneği 5 konsantrasyonu sırasıyla 0,25, 0,5, 1 , 2 ve 4 mg/mL GPx enzimi üzerine araştırılmıştır. 4 mg/mL konsantrasyonda yani en yüksek dozda Gpx enzimi aktivitesinin enzimi kontrol aktivitesine göre %10 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Diğer konsantrasyonlardaysa GPx enzim aktivisi üzerine anlamlı etkileri görülmemiştir.



Şekil 4.22 Ayvalık örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). *** $p < 0,001$.

Aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi Tavşan yüreği zeytinyağı örneği yalnız yüksek konsantrasyonlarında GPx enzimin aktivitesinin üzerine etki göstermiştir. Sırasıyla 2 ve 4 mg/mL dozlarda %5,3 ve %8,05 inhibisyon değerleri bulunmuştur.

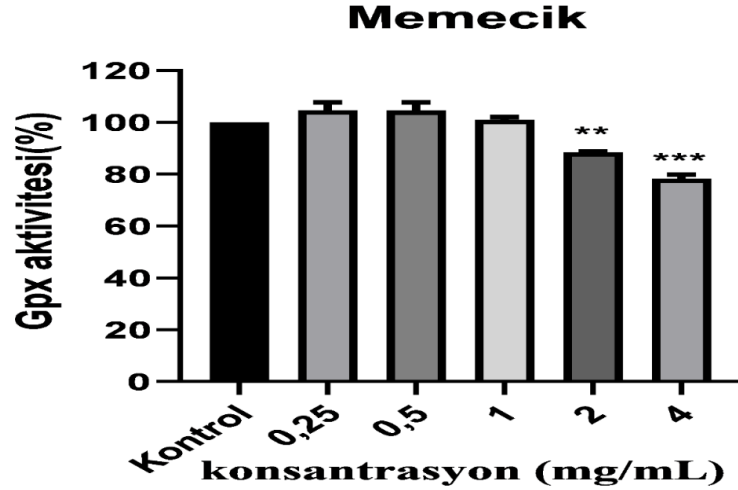


Şekil 4.23 Tavşan yüreği örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Kontrole karşı elde edilen sonuçlar, * $p < 0,05$ kabul etmiştir.

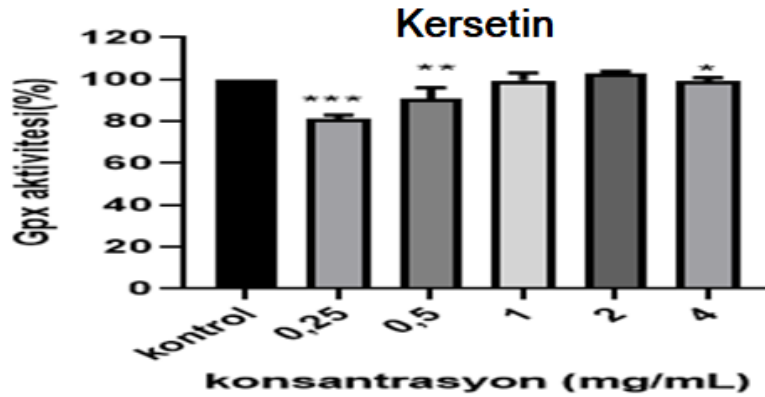
Memecik sızma zeytinyağı örneğinin GPx üzerinde etkisi aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi düşük dozlarda enzimin aktivitesini artırırken yüksek dozlarda inhibisyon etkileri

gözlemlenmiştir. 0,25 ; 0,5 ve 1mg/mL düşük dozlardan % 1,06 ; %4,65 ve %4,72 oranlarda GPx aktivitesi artırılmıştır. 2 ve 4 mg/mL yüksek dozlarında elde edildiği inhibisyon değerleri ise sırasıyla % 12,54, ; % 21,60 olarak hesaplanmıştır.



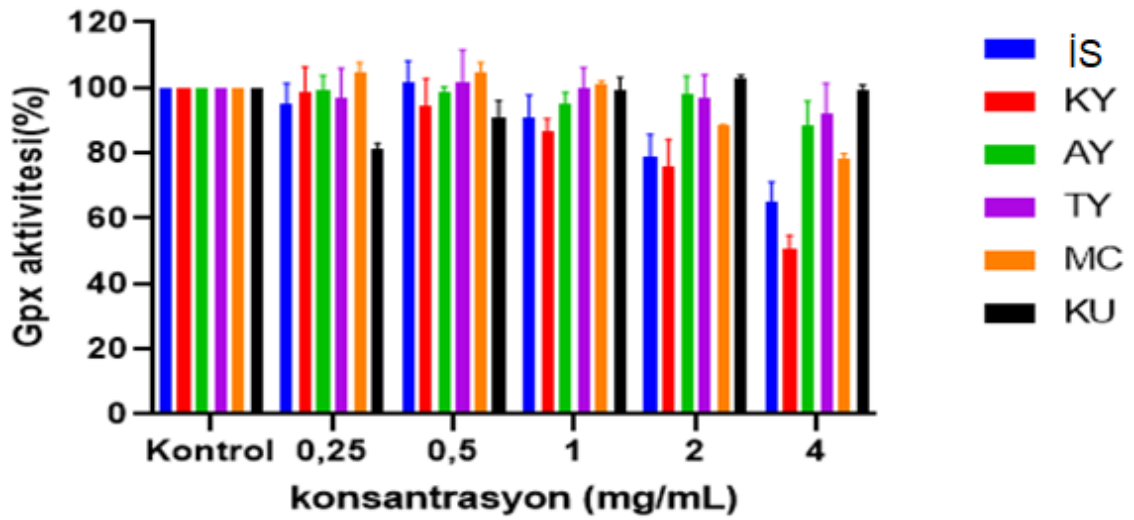
Şekil 4.24 Memecik örneğinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). ***p < 0,0001, **p < 0,01.

0,25 mg/mL ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda kersetin GPx üzerinde sırasıyla %18,74 ve %9,10 inhibisyona neden olmuştur. 1 ve 2 mg/mL'lik dozlar enzim üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. 4 mg/mL doz, ilk iki dozun etkilerine kıyasla düşük bir inhibisyon değeri göstermiştir. Yüksek dozlar, düşük dozlar ile kıyasla GPx enzim aktivitesini artırmak eğilimdedir.



Şekil 4.25 Kersetinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). ***p < 0,0001, **p < 0,01.

Tüm sızma zeytinyağı örnekleri düşük konsantrasyonlarda GPx enzimi aktivitesi üzerine düşük etki göstermişlerdir. AY ve TY örnekleri yüksek dozlarda bile GPx enzimi üzerine olan etkileri düşütür. Ancak KY , MC ve MC örnkleri düşük dozlarda enzimi aktivitesi üzeri zayıf etkileri sahip olsa da yüksek dozlarda enzimin aktivitesi inhibisyon etkileri yüksektir. Kersetin ise düşük dozlarda GPx enzim aktivitesini büyük ölçüde inhibe ederken yüksek dozlarda gösterdiği etkileri düşük olmuştur.



Şekil 4.26 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerin glutatyon peroksidaz enzimi üzerine olan etkileri

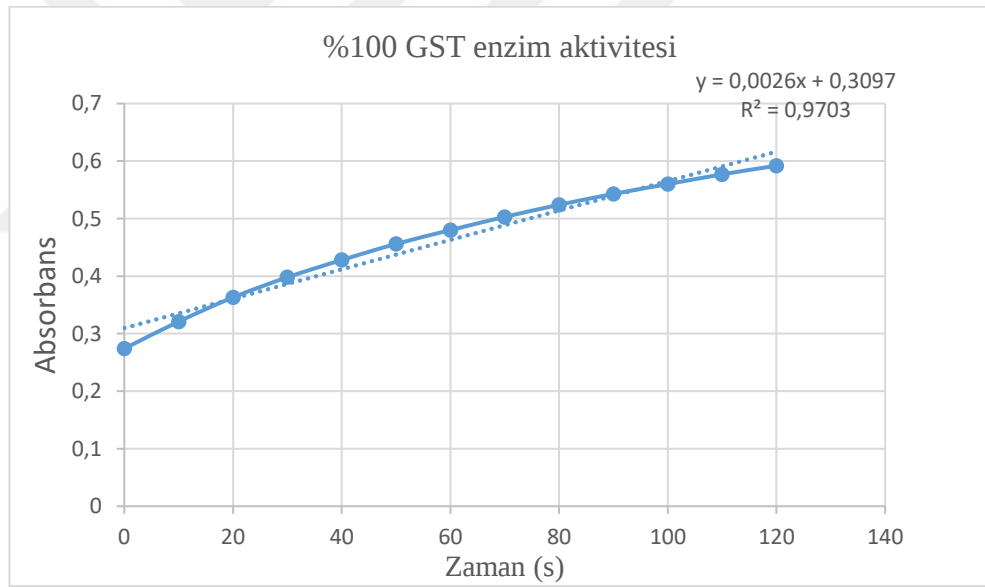
İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik. İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3).

4.5.4 Sızma zeytinyağlarının glutatyon-S-transferaz aktivitesi üzerine olan etkisi

Glutatyon-S-transferaz birçok biyolojik mekanizmalarda rol oynayan bir enzimdir. Antiksidan savunma sisteminde, bazı kanser hücreleri ilaç direnciliğinde rol oynaması düşünülmektedir. Dolayısıyla GST'nin aktivasyonu veya inhibisyonu hedefe göre önem taşımaktadır. Bu çalışmada kullanılan kontrol değeri ile kıyasla tüm sızma zeytinyağı örnekleri GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. En yüksek inhibisyon etkisi gösteren sızma zeytinyağı örnek IS örneğidir. Sızma zeytinyağı örneklerinin 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlarının GST enzim aktivitesi üzerindeki etkileri

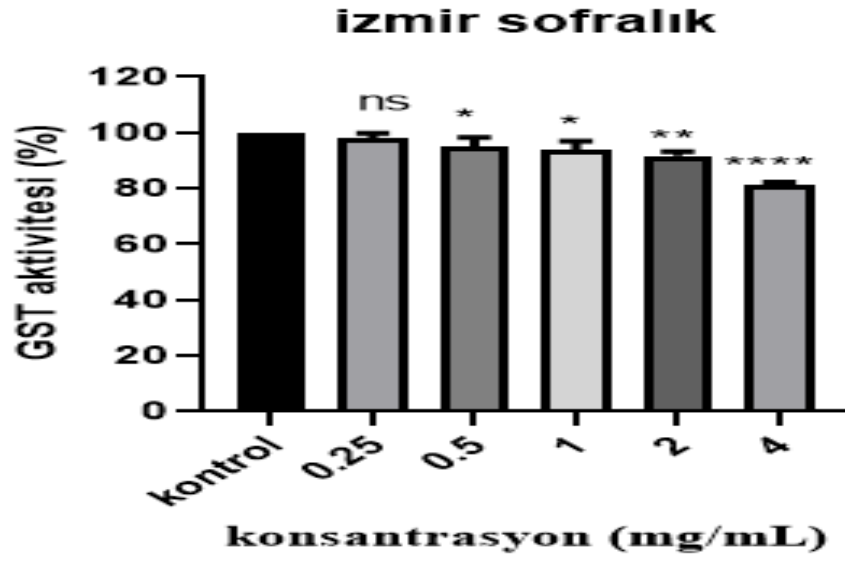
değerlendirilmiştir. Sızma zeytinyağı konsantrasyonlardan en yüksek inhibisyonu sahip olan 4 mg/mL olmuştur.

Tez çalışmamız kapsamında kullanılan GST enzimi, sığır karaciğer dokusundan edilmiştir. GST enziminin aktivitesi, 340 nm’de CDNB-GSH kompleks oluşumundaki artışa bağlı olarak ölçülmüştür (şekil 4.27). Farklı sızma zeytinyağı örnekler GST enzimi aktivitesi üzerine etkisi, sızma zeytinyağı ekstratı içermeyen ve %100 enzim aktivitesi oluşturulan kontrol grubu ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Glutasyon-s-transferaz üzerinde yüksek inhibitör etki gösteren örnekler Ayvalık ve tavşan yüreğidir. Bu örnekler, enzimin neredeyse tüm konsantrasyonlarda ve konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibitör etkilerini göstermiştir. Ayvalık ve tavşan yüreği glutasyon peroksidaz üzerine kilis yağlık ve izmir sofralık örneklerine göre daha az inhibitör etki göstermiştir.



Şekil 4.27 GST enzim aktivite eğrisi

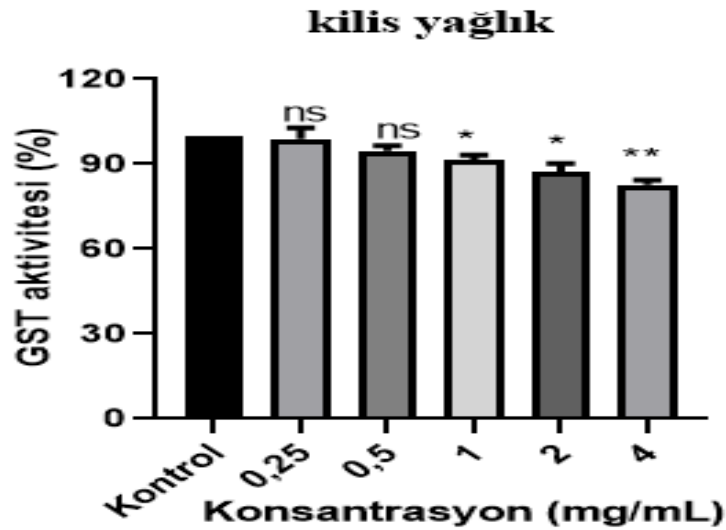
İzmir sofralık örneği GST enziminin aktivitesi üzerine olan etkisi aşağıdaki şekil 4.28’de göstermektedir. Bu zeytinyağı örneği GST enzimi aktivitesi üzerine tüm 5 konsantrasyonlarında doza bağlı olarak inhibisyon etkileri göstermiştir. 0,25;0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL dozları GST enzimin aktivitesi sırasıyla %2,02; %5,36; %6,06 ; %8,25 ve %18,79 oranlarında inhibe etmiştir.



Şekil 4.28 İzmir sofralık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir (n $\geq$ 3) **** P<0,0001, ** P<0,01, * P<0,05.

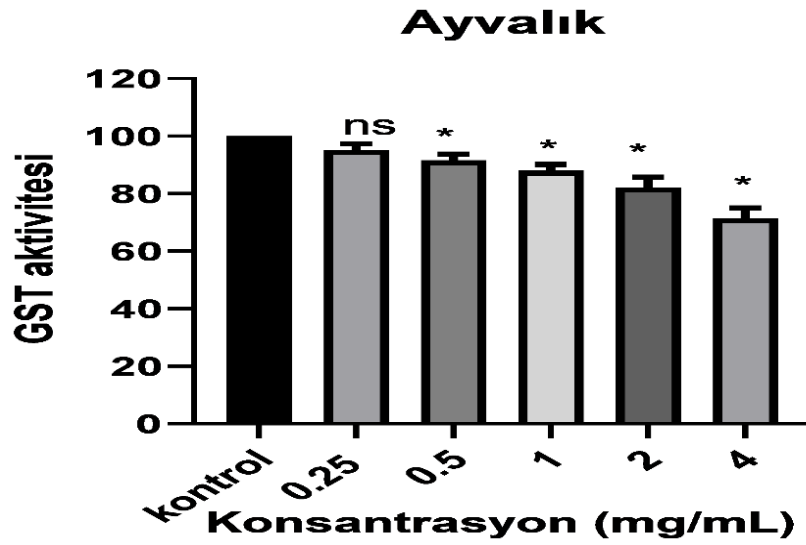
Kilis yağlık sızma zeytinyağı ekstratının GST enzimin üzerindeki etkileri şekil 4.29'da gösterdiği gibi düşük dozlarda düşük inhibisyon etkisi göstermiştir . ilk iki dozda yani 0,25 ve 0,5 dozlar sırasıyla %1 ve % 5,38 inhbisyon değerleri gösterirken 1, 2 ve 4 mg/mL yüksek dozlarda %8,60; %12,75 ve %17,38 oranlarda innhibisyon etkisi göstermiştir.



Şekil 4.29 Kilis yağlık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

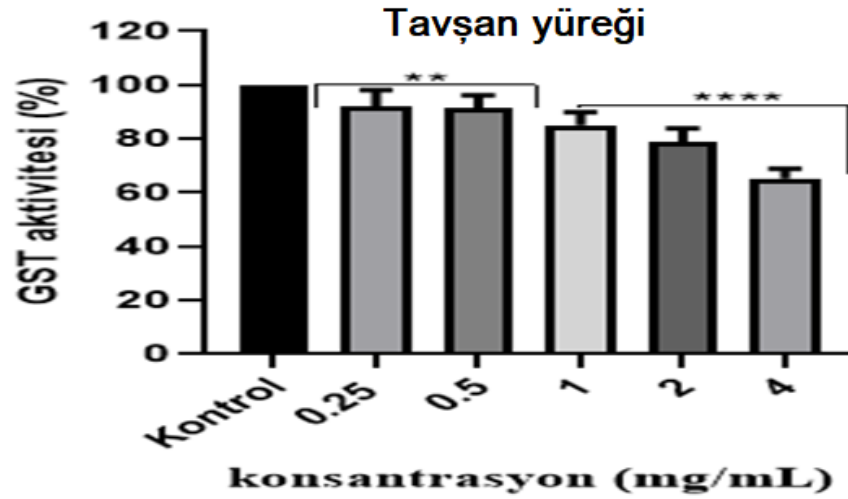
Değerler ortalamadır $\pm$ Std (n=3). **p < 0,01, * p < 0,05 ve ns p > 0,05 kontrol grubuna kıyasla.

Şekil 4. 30’da sunulan sonuçları, Ayvalık zeytinyağı ekstratın GST enzimin aktivitesi üzerine etkileri ifade etmektedir. Tüm Kullanılan konsantrasyonları en düşük konsantrasyon hariç enzimin %100 aktivitesi ile kıyaslanarak istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Elde edilen sonuçları doza bağlı olarak etki göstermiştir. Böylece 0,25; 0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL konsantrasyonları sırasıyla %6,16; % 8,34 ; %11,91; % 17,86 ve % 28,57 değerlerinde GST enzimi aktivitesi inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.30 Ayvalık örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi
İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$), * $P < 0,05$, ns $P > 0,05$.

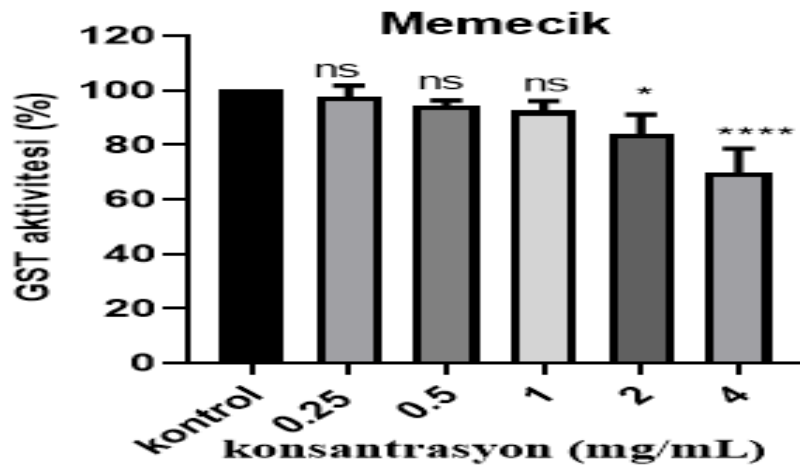
Şekil 4.31’de Tavşan yüreği sızma zeytinyağı GST enzimi aktivitesi üzerine olan etkileri bulunmaktadır. Elde edilen sonuçları en kontrolü oluşturduğu aktivitesi değeri % 100 olarak belirlenmiş ve bu değeri göre hesaplanmıştır. Bu zeytinyağı örneğinin etkisi diğer enzimler üzerinde düşükken GST enzimi aktivitesi üzerindeki etkileri yüksek çıkmıştır. Ek olarak tüm dozlarda GST enzimi aktivitesi üzerine etki göstermiştir. Kullanılan 5 farklı konsantrasyonlarında (0,25; 0,5; 1; 2 ve 4mg/mL) sırasıyla %9,34 ; %8,65 ,%14,90 ; %21,15 ; %34,61 oranlarında GST enzim aktivitesi inhibe etmiştir. GST enzimi aktivitesi üzerine en etkili sızma zeytinyağı örneği tavşan yüreği zeytinyağı örneğidir.



Şekil 4.31 Tavşan yüreği örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$) ** $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$ olarak kabul edilmiştir.

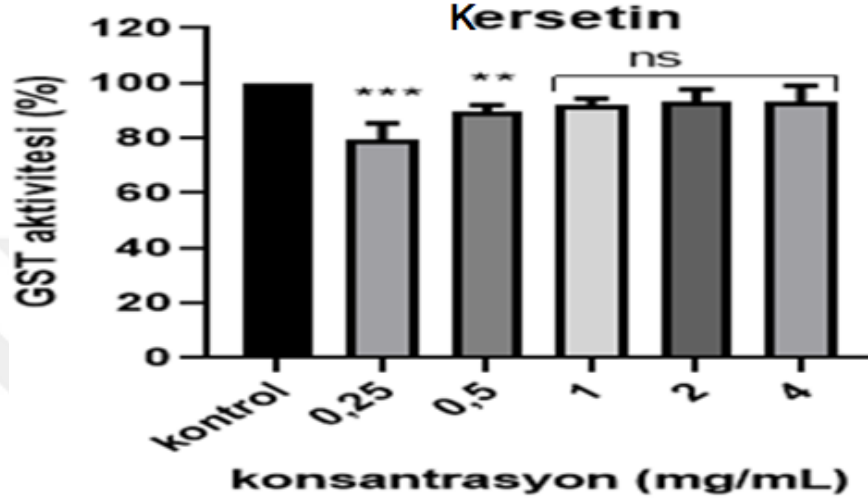
GST enzim aktivitesi deneyinde alikotlar 5 farklı konsantrasyonda (0,25; 0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL) hazırlanmıştır. Örnek bulunmayan sadece SOD enziminin oluşturduğu aktivite değeri % 100 aktivite olarak belirlenmiş ve bu değere göre hesaplanmıştır. Memecik özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4. 32) incelendiğinde, 0,5; 1; 2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlar sırasıyla %2,3, %5,87, %16,05, %30,38 değerlerinde enzim aktivitesinin inhibisyonuna yol açtığı göstermiştir.



Şekil 4.32 Memecik örneğinin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ ve ns $p > 0,05$.

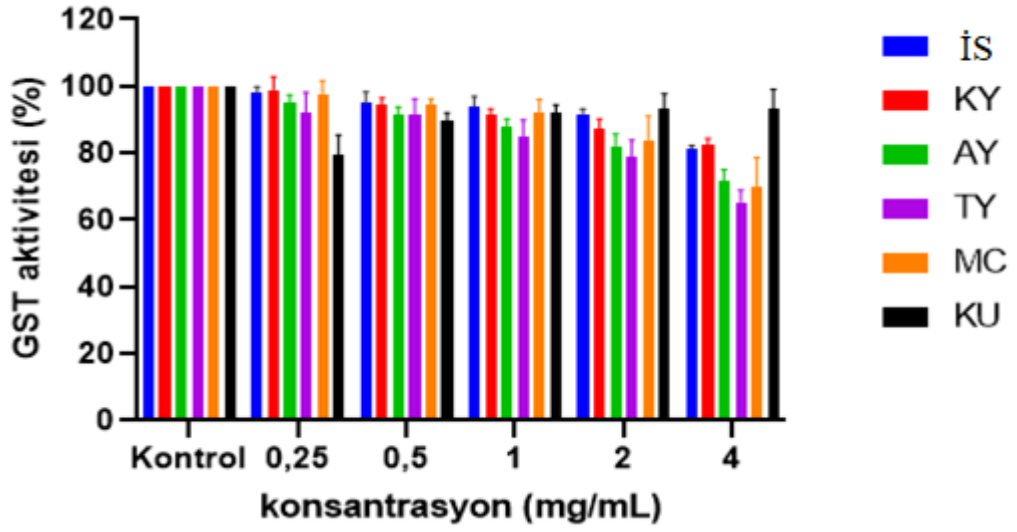
Şekil 4.33'te kuersetinin GST enzimi üzerindeki etkileri gösterilmektedir. 0,25 mg/mL ve 0,5 mg/mL dozları GST aktivitesini sırasıyla %20,45 ve %10,22 oranında azaltmıştır. 1mg/mL;2mg/mL ve 4 mg/mL dozları kontrole kıyasla anlamlı olmayan etkiler göstermiştir.



Şekil 4.33 Kersetin glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri

İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$). **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ ve ns $p > 0,05$.

Şekil 4.34'de 5 farklı sızma zeytinyağlarının GST enzim aktivitesi üzerine olan etki grafikleri verilmiştir. Grafikleri beraber incelendiğinde tüm sızma zeytinyağı örnekleri GST enzimi üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. KY ve İS sızma zeytinyağı örneklerinin GST enzimi aktivitesi üzerine düşük olurken TY, AY ve MC sızma zeytinyağı örnekleri GST enzimi aktivitesi üzerine etkileri ve özellikle yüksek dozlarda yüksek çıkmıştır. Sızma zeytinyağı örnekleriyle elde edilen sonuçların aksine, kuersetin sadece düşük dozlarda etki göstermiştir.

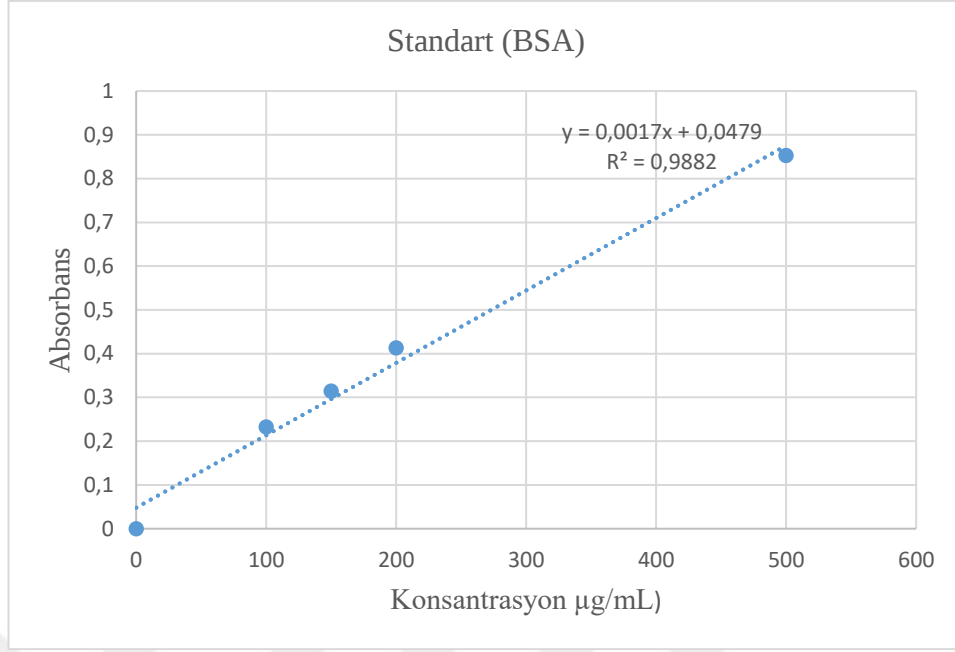


Şekil 4.34 Kersetin ve tüm sızma zeytinyağı örneklerinin glutatyon-S-transferaz üzerine olan etkileri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik. İfade edilen değerler ortalama $\pm$ SD'dir ($n \geq 3$).

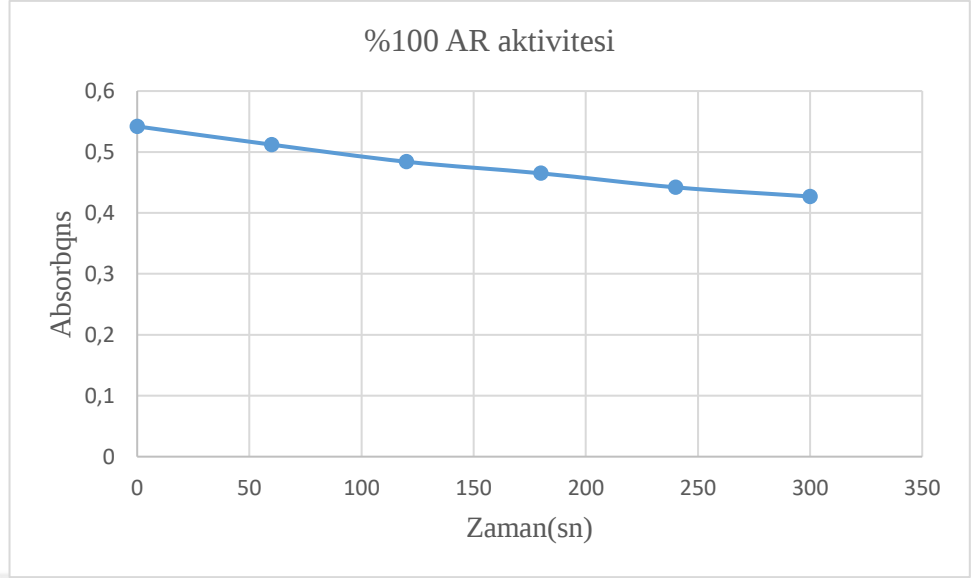
4.6 Sızma zeytinyağı örneklerinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri

Aldoz redüktaz enzimi diyabet komplikasyonlarda rol oynayan bir enzimdir. Deneylerden önce sığır karaciğer dokusundan kısmen izole edilmiştir. İzole edilen aldoz redüktaz enziminin protein miktarı Lowry metodu kullanarak belirlenmiştir. Bovin albumin serumu (BSA) protein stardartı olarak kullanmıştır.



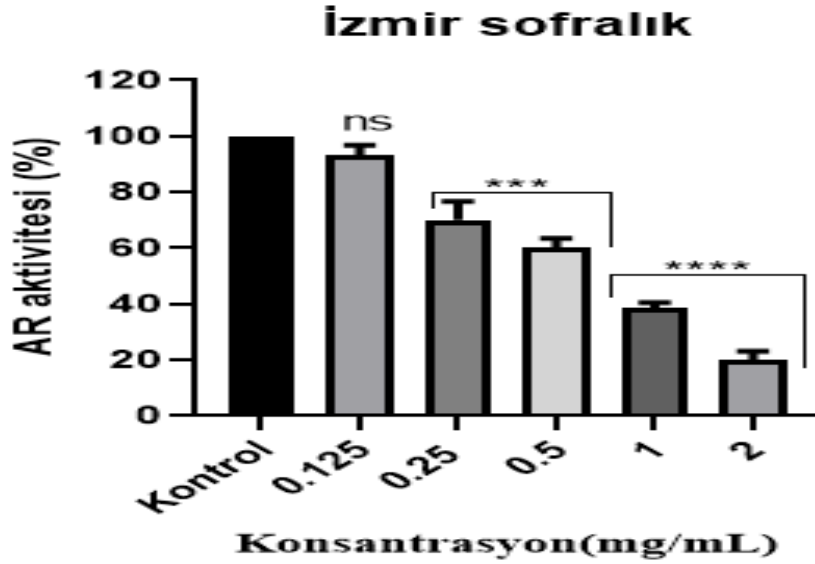
Şekil 4.35 Aldoz redüktazın protein miktarı için BSA kalibrasyon grafiği

Aldoz redüktaz, polyol yolağında yer alan bir enzimdir. Bu yolak, özellikle glikoliz yoluyla glukoz seviyelerini düşüremediğinde aktive olmaktadır. Kofaktörünün yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak enzimin hiperaktivitesi, diyabet komplikasyonlarının nedenleri arasında yer almaktadır. Kofaktör olarak NADPH ve substrat olarak DL-gliseraldehit kullanılmaktadır. Reaksiyon karışımı, NADPH, DL-gliseraldehit ve sıgır karaciğerinden izole edilen aldoz redüktazdan oluşur. Reaksiyon karışımının absorbansı 340 nm'de 5 dakika boyunca takibe alınmıştır. Aldoz redüktazın aktivitesi, kofaktörü NADPH'nin ortadan kaldırılması nedeniyle absorbans zamana bağlı azalmasına neden olmaktadır. Aldoz redüktaz enzim aktif olup olmadığını kontrol etmek için reaksiyon ortamında hiç bir sızma zeytinyağı öneği olmadan spektrofotometrik absorbans değişimi takibe alınmıştır. Elde edilen absorbans düşüş değeri aldoz redüktaz enziminin % 100 aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Sızma zeytinyağı örnekleri AR enzimi üzerindeki etkileri % 100 enzimi aktivitesi değerine bağlı olarak hesaplanmıştır. AR enzim aktivite grafiği şekil 4. 36'da sunulmuştur.



Şekil 4.36 Aldoz redüktaz enzim aktivite eğrisi

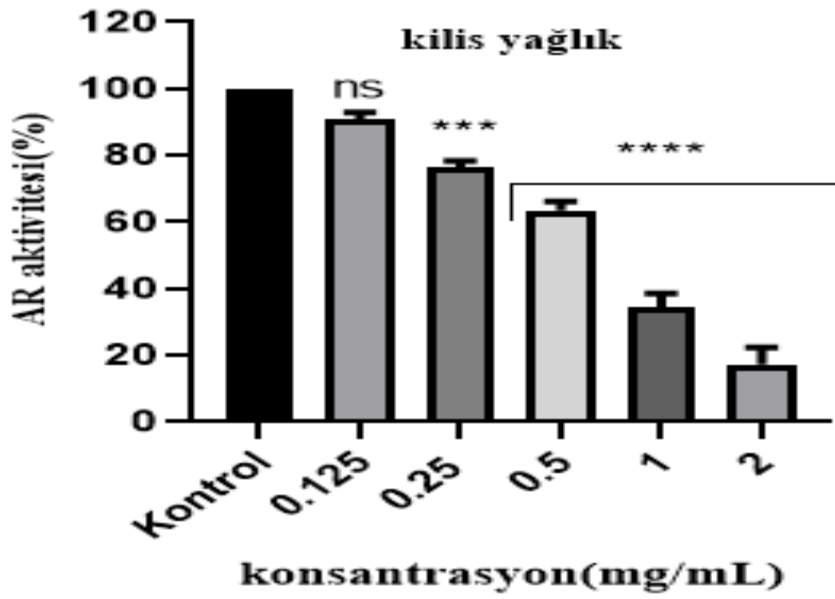
İzmir sofralık örneğin AR üzerinde şekil 4.37’de göstermektedir. Tüm kullanılan konsantrasyonları AR üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. 0,125; 0,25; 0,5; 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonları sırasıyla %6,97 ; %29,97 ; %39,74 ; %61,25 ve %79,96 değerlerinde AR enzimini inhibe etmiştir.



Şekil 4.37 İzmir sofralık örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

(***P<0,001, (****P<0,0001, ns P>0,05)

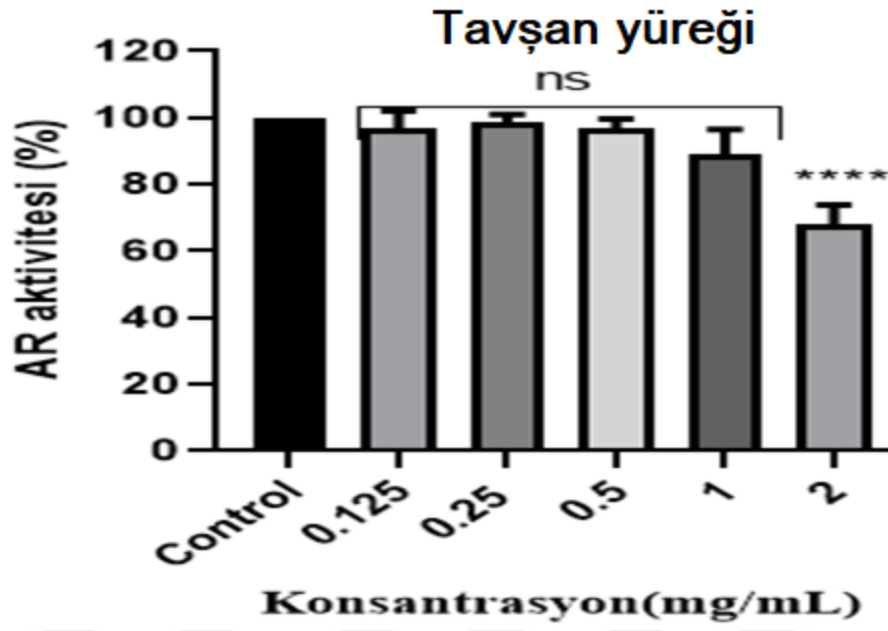
Şekil 4.38’de Kilis yağlık örneği farklı konsantrasyonlarının AR üzerindeki etkileri göstermektedir. Tüm kullanılan konsantrasyonlarında AR enziminin inhibisyonu gözlemlenmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak 0,125; 0,25; 0,5; 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonları sırasıyla % 9,20 ; %23,61 ; %36,53 ; % 65,76 ve %82,60 inhibisyon etkileri göstermiştir. İnhibisyon değerleri % 100 enzim normal aktivitesine dayanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 38 Kilis yağlık örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

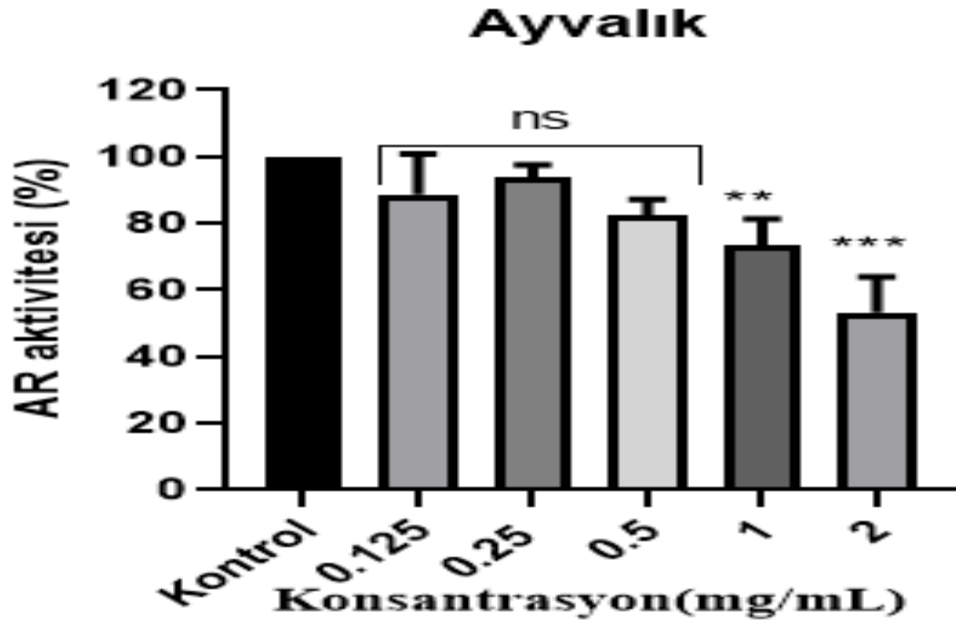
(***P<0.001, ****P<0,0001, ns P>0,05)

Tavşan yüreği örneği AR enzim aktivitesi üzerine yalnız yüksek dozlarda etki göstermiştir. 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonları AR enzimini sırayla %10,96 ve %31,81 oranlarda inhibe ederken, 0,5 mg/mL’de %23,40 aktive etmiştir (Şekil 4.39).



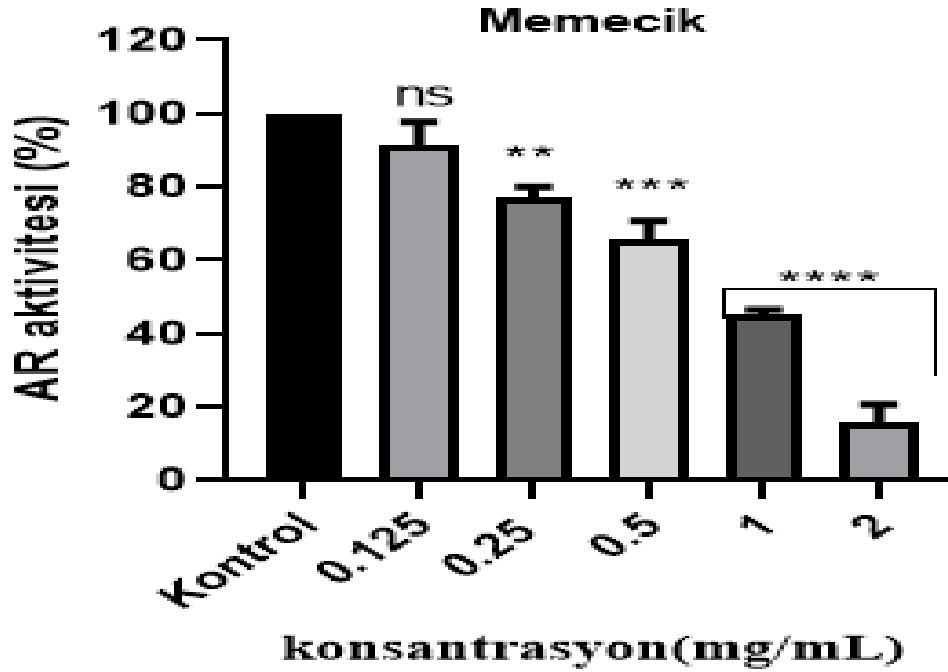
Şekil 4.39 Tavşan yüreği örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi
(****P<0,0001, ns P>0,05)

Ayvalık sızma zeytinyağı örneği şekil 4.40'ta gösterildiği gibi 1 ve 2 mg/mL alikotları sırayla %26,42 ve %46,63 değerlerinde inhibisyon etkileri göstermiştir.



Şekil 4.40 Ayvalık sızma zeytinyağı örneğinin aldoz redüktaz enzimi üzerine etkisi
(*P<0.01, ****P<0,0001, ns P>0,05)

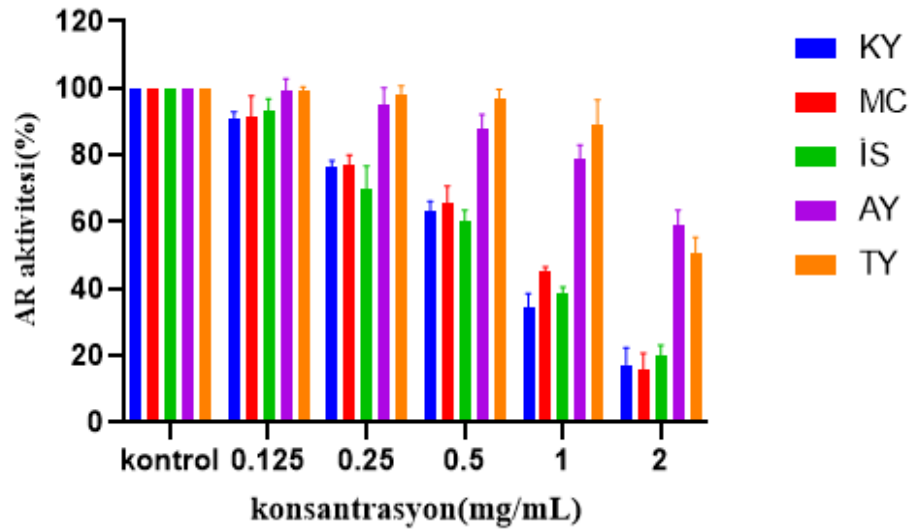
Şekil 4.41’de gösterildiği gibi Memecik sızma zeytinyağı örneği konsantrasyona bağlı olarak AR enzimi inhibe etmiştir. Enzimin % 100 normal enzim aktivitesi değerine dayanılarak hesaplanan inhibisyon değerleri 0,125; 0,25; 0,5; 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonları sırayla % 8,74 ; % 22,99 ; % 34,55 ; % 54,92 ve % 84,38 olarak çıkmıştır.



Şekil 4.41 Memecik örneğinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

(**P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001, ns P>0,05)

Tüm sızma zeytinyağı örneklerine ait enzim redüktaz aktivitesi değerlerinin karşılaştırmaları şekil 4.42’de sunulmuştur. Sunulan değerlerine göre en yüksek inhibisyon etkileri gösteren KY, MC ve İS örnekleridir.



Şekil 4.42 Tüm örneklere ait aldoz redüktaz enzim aktivite değerleri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik

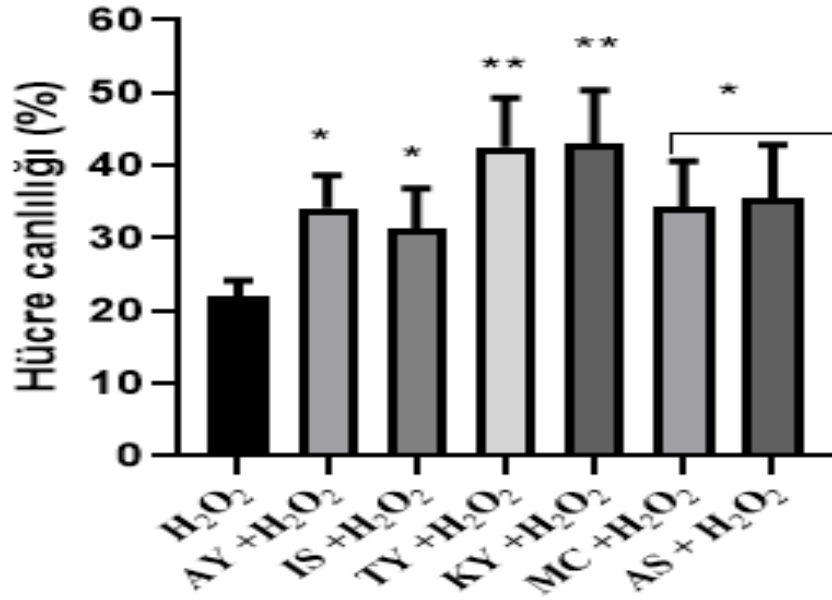
Çizelge 4. 10 Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin aldoz redüktaz üzerine IC₅₀ değerleri (ortalama $\pm$ SD, n $\geq$ 3)

Sızma zeytinyağı örnekleri	IC ₅₀ değerleri(mg/mL)
Ayvalık	2,15 $\pm$ 1,32
Tavşan yüreği	3,23 $\pm$ 2,11
İzmir sofralık	1,00 $\pm$ 0,95
Kilis yağlık	0,98 $\pm$ 1,03
Memecik	1,03 $\pm$ 3,12

4.7 Sızma zeytinyağlarının hücre koruyucu etkileri

Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin hücre koruyucu etkilerinin belirlenmesi için Vero hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin üzerine stres oluşturmak için hidrojen peroksit kullanılmıştır. Yalnız hidrojen peroksitle maruz kalan hücre grubunda hücre canlılığının düşük olduğu görülmüştür. Ancak hidrojen peroksit ve farklı sızma zeytinyağı örnekleri veya askorbik asit içeren hücre gruplarında yüksek hücre canlılığı belirlenmiştir. Yalnız hidrojen peroksit %21,73 değeri gösterirken İS, AY, MC, AS, TY ve KY sırasıyla %31,35, %34,14, %34,24, %35,48, %42,51 ve %43,03 hücre canlılık değerleri göstermiştir. Böylece tek hidrojen peroksit içeren hücre grubuyla kıyaslandığında İS, AY,

MC , AS, TY ve KY içeren hücre gruplarında sırasıyla %9,62, %12,41, %12,51, %13,75, %20,78, %21,3 oranlarında hücre canlılığı arttırmıştır. Tüm sızma zeytinyağı örnekleri Vero hücre hatları hidrojen peroksit oluşturduğu zararından koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.43 Farklı sızma zeytinyağları örneklerinin hücre koruyucu etkileri

İS: İzmir sofralık, KY: Kilis yağlık, AY: Ayvalık, TY: Tavşan yüreği, MC: Memecik, AS: askorbik asit .
(**P<0.01, *P<0,05)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidatif stres birçok hastalığın ortak nedenlerinden biridir. ROS'un hücrelerde aşırı üretimi, makromoleküllerin (nükleik asitler, proteinler ve lipitler) bozulmasına yol açarak metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Vücutta reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi nedeniyle kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklar ortaya çıkabilir. Serbest radikallerin hücresel yaşlanmayı, mutajenezi, karsinogenezi, koroner kalp hastalığını ve diğer kardiyovasküler patolojileri, diyabeti, kas distrofisini ve nörodejenerasyonu desteklediği yüzden fazla hastalığın serbest radikallerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zou vd. 2008). Günümüzde pek çok araştırma, bu hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için doğal ürünlerden biyoaktif bileşikler keşfetmeyi amaçlamaktadır (Sairaz vd. 2020, Atanasov vd. 2021). Sebzeler, meyveler, yumrular ve bitkisel yağlar gibi doğal kaynaklardan elde edilen ürünler, biyoaktif bileşikler, özellikle çağımızın birçok hastalığından sorumlu olduğu bilinen serbest radikalleri temizleyebilen polifenoller açısından zengindir. Bu fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteleri sayesinde oksidatif strese bağlı bu hastalıkları da önleyebilir. Diğer mekanizmalarla bu bileşikler, SOD, CAT, GST ve GPx gibi antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerin aktivitesini düzenleyerek hareket edebilir (Darbar vd. 2021). Zeytinyağlarının, özellikle fenolik bileşikler ve tekli doymamış yağ asitleri açısından zenginlikleri ile bilinen sızma zeytinyağının tüketimine özel önem verilmektedir. Ayrıca biyofenollerin oksidatif stres, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar gibi birçok insan patolojisine karşı faydalı etkilerinin olduğu keşfedilmiştir. Sızma zeytinyağı, hidroksitirozol, tirozol ve sekoiridoid türevleri dahil olmak üzere güçlü antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin bir kaynağıdır (Fanali vd. 2018b, Fransisco vd. 2019). Netekim sızma zeytinyağı bakımından zengin bir diyetin oksidatif stresi, tromboz riskini, hiperkolesterolemi, kanser, kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet ve obeziteyi önlediği düşünülmektedir (Caramia vd. 2012).

Bu tezin amacı, Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Kilis yağlık, İzmir sofralık, Ayvalık, Tavşan yüreği ve Memecik) 5 çeşit sızma zeytinyağının antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerini incelemektir. Çalışma başlangıcında ilk olarak farklı sızma zeytinyağı

örneklerinin fenolik fraksiyonlarının ekstraksiyonu ve toplam fenolik ve favonoid bileşiklerin tayini yapılmıştır. Antioksidan aktivite, DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Öte yandan farklı zeytinyağı örneklerinin antioksidan savunmada önemli rol oynayan SOD, GPx ve GST gibi enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında, farklı sızma zeytinyağı örneklerinin, diyabet komplikasyonlarında yer alan ve bazı kanser türlerinde hiperaktif bir enzim olan aldose redüktaz enzimi aktivitesi üzerinde etkileri belirlenmiştir. Ayrıca farklı sızma zeytinyağı örneklerinin hücre koruyucu etkileri Vero adlandırılan böbrek epitel hücre hatları üzerinde incelenmiştir. Türk sızma zeytinyağlarının antioksidan enzimler(SOD, GPx ve GST) ve aldose redüktaz aktivitesi üzerindeki etkileri *in-vitro* olarak ilk kez araştırılmıştır.

Zeytinyağlarından fenolik fraksiyonun ekstraksiyonu sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemi ile yapılır. Yaygın olarak kullanılan organik çözücü metanoldür. Bazı çalışmalarda hekzan da kullanılmaktadır (Fanali vd. 2018a, López-Huertas vd. 2021). Diğer çalışmalarda MeOH/H₂O veya bazen MeOH/Asetonitril kullanılır (Tasioula-Margari ve Tsabolatidou 2015). Yüzde 80'lik metanol tek başına kullanılırken %60'lık metanol hekzan ile birlikte kullanılmaktadır. Luz Pizarro vd. (2013) da sıvı-sıvı ekstraksiyonunun saf zeytinyağından fenolik fraksiyonu çıkarmak için en iyi yöntem olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, Reboredo-Rodriguez vd. (2018) tarafından benimsenen yönteme göre %80 (MeOH/H₂O) kullanılmıştır. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra elde edilen kuru ekstraktların stok konsantrasyonları hazırlanarak -20 °C'de saklanmış ve çalışma boyunca kullanılmıştır.

Folin-Ciocalteu yöntemi, toplam fenolik bileşiklerin tayini için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Folin-Ciocalteu reaktifi, sızma zeytinyağının toplam fenolik bileşiklerinin ve belirli tat özelliklerinin belirlenmesi için kararlı bir belirteçtir. Fenolik bileşiklerin, yağ asitleri bileşenlerinden sonra bitkisel yağların önemli bir parçası olduğu bilinmektedir. Zeytinyağı çeşidinin türü veya olgunlaşma aşaması toplam fenolik içeriği etkileyebilir (Yu vd. 2021). Bu fenolik bileşikler, antioksidan özelliklerinden ayrı olarak, zeytinyağının lezzetinden sorumludur. Zeytinyağı örneklerinden toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi, çeşitler arasında önemli bir farklılık ortaya çıkarmıştır. Sızma zeytinyağının

farklı çeşitlerinin toplam fenolik bileşiklerinin bileşiminde gözlenen farklılıklar, sızma zeytinyağı çeşidinin genetik profilinden ve tarımsal-çevresel faktörlerden kaynaklanabilir (Rotondi vd. 2011, Baiano vd. 2013). Olgunlaşma aşaması ve ekstraksiyon yöntemi gibi diğer faktörler, sızma zeytinyağındaki toplam fenolik içeriği etkileyebilir (López-Yarena vd. 2021, Pedan vd. 2019) . Ayrıca farklı bölgelerden elde edilen zeytinyağı çeşitlerinin ayırımında fenolik bileşiklerin gerçek bir indeks olduğu yapılan diğer çalışmalarla gösterilmiştir. Türk zeytinyağı çeşitleri genellikle fenolik bileşikler açısından zengindir. Ege bölgesine özgü bir zeytinyağı çeşidi olan Arbequina üzerinde yapılan bir araştırma, Türk çeşidinin fenolik bileşikler açısından Tunus, İtalya ve İspanya'da yetiştirilen Arbequina çeşidinden daha zengin olduğunu göstermiştir (Uluata vd. 2016). Bu nedenle, farklı tarımsal koşullar altında yetiştirilen aynı çeşit, fenolik bileşikler açısından farklılıklar gösterebilmektedir.

Çalışmamızda toplam fenolik bileşiklerin en yüksek değerleri Kilis yağlık, Memecik İzmir sofralık örneklerinde gözlenirken, Ayvalık ve Tavşan yüreği düşük seviyelerde toplam fenolik içermektedir (Çizelge 4.2). TPC Kilis yağlık, İzmir sofralık ve Memecik için sırasıyla 180.12 ± 1.04 , 157.76 ± 1.3 ve $122,04 \pm 0,61$ mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. Ayvalık ve Tavşan yüreğinin diğer üç örneği ile kıyasla daha az fenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir. İzmir sofralık ve Ayvalık sızma zeytinyağı örnekleri Ege yöresinden gelmektedir. Ancak İzmir sofralık, Ege bölgesinin kuzey kesiminden gelen Ayvalık'tan daha fazla toplam fenolik bileşik içerir. Ayvalık zeytinyağı üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, olgunlaşma periyodu ve rakım, bu çeşidin kimyasal bileşimini, özellikle toplam fenolik bileşik içeriğini etkileyebilir (Usanmaz vd. 2018). Bu nedenle, aynı bölge içinde toprağın doğası gibi faktörler, yağış, sızma zeytinyağının bileşimini etkileyebilir. Toplam fenolik ve flavonoid içeriği bakımından en düşük değerleri Akdeniz bölgesi kökenli olan Tavşan yüreği göstermiştir. Olgunlaşma aşaması fenolik veya flavonoidlerin içeriğini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Halbuki aynı çeşit içerisinde fenolik ve flavonoid bileşiklerin içeriği olgunlaşma aşamasına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Çiğ, orta olgun ve tam olgun meyvelerden elde edilen zeytinyağı üzerinde yapılan bir araştırma, meyvenin olgunlaşma derecesine bağlı olarak farklı seviyeler göstermiştir. Çiğ meyveler 194,3 mg/kg ile en yüksek toplam fenolik madde miktarı

içermişken orta olgun ve tam olgun meyveler sırasıyla 157,2 mg/kg ve 121,6 mg/kg toplam fenolik madde içerdiği gösterilmiştir (Pedan vd. 2019).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, çeşitli sızma zeytinyağı çeşitleri üzerinde yapılan diğer çalışmalarda elde edilen sonuçları desteklemektedir. Karaosmanoğlu ve diğerler 2010 yılında toplam fenolik bileşik içeriğinin zeytinyağı çeşitlerine göre değiştiğini bildirmiştir. Böylece, aynı yazarlar toplam fenolik bileşiklerin içeriğinin çalışılan çeşitlere bağlı olarak 125,29 ile 353,36 mg GA/kg arasında değiştiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, İtalyan kökenli sızma zeytinyağının farklı çeşitlerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada, toplam fenolik içeriğin 73 ila 265 mg GA/Kg arasında değiştiği bildirilmiştir (Pellegrin vd. 2001). Buna ek olarak, Barnea, Coratina, Koreniki ve Manzanilla zeytinyağı çeşitleri üzerinde yapılan yeni bir çalışmada, toplam fenolik bileşik içerikleri sırasıyla 149.32, 58.92, 180.21 ve 55.41 mg/kg olarak bulunmuştur (Xiang vd. 2017). Kuzey Cezayir'de yetiştirilen Tefahi, Chemlal, Manzanilla, Gelb Elfarroudj ve Zebboudj zeytinyağı çeşitleri sırasıyla 237.19; 59.24, 48.94 ve 46.32 µgGA/mg göstermiştir (Boussahel vd. 2020). Tefahi, Chemlal, Gelb Elfarroudj ve Zebboudj çeşitleri yerel, Manzanilla çeşidi ise ithaldir. Aynı Manzanilla çeşidi üzerinde yapılan ancak farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilen bu iki çalışma, fenolik bileşimin coğrafi bölgeden etkilendiğini de kanıtlamaktadır. İtalya'da yetiştirilen Manzanilla çeşidi, Cezayir'in kuzeyinde yetiştirilene kıyasla daha yüksek miktarda toplam fenolik bileşik içermektedir. Usanmaz vd. (2018) hasat dönemi ve rakımın zeytinyağlarının bileşiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, farklı rakımlarda yetişen ve farklı zamanlarda hasat edilen aynı çeşitten üretilen zeytinyağı, farklı seviyelerde fenolik bileşikler ve yağ asitleri içerebilir. Bu çalışmada, yüksek rakımlı bölgelerde yetişen çeşitlerin fenolikler bakımından zengin olduğu ve çeşitlerin doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğu gözlenmiştir. İspanya kökenli sızma zeytinyağı çeşitleri üzerinde yapılan bir çalışma da çeşidin toplam fenolik bileşik içeriğini etkilediğini doğrulamaktadır. Bu çalışmada Picual, Arbequina ve Hojiblanca çeşitlerinin toplam fenolik bileşik içeriği kilogram yağ başına sırasıyla 169-260 mg/kg, 102-109 mg/kg ve 190-230 mg/kg gallik asit eşdeğeri olarak bulunmuştur (García-Villalba vd. 2010). Kesen vd. (2013) zeytinyağının depolama süresinin de zeytinyağının toplam uçucu bileşik içeriği üzerinde etkili olabileceğini bildirmiştir. Hatay ilinde yetiştirilen ve 2010-

2012 yılları arasında depolanan Halhalı çeşidi üzerinde yaptıkları çalışmada, 2010 ve 2012 yıllarında sırasıyla 18.007 ve 19.178 µg/kg fenolik bileşik içerdiğini göstermişlerdir.

Özcan vd. (2019) tarafından Ayvalık, Edremit Gemlik ve Tavşan yüreği çeşitlerinin meyve ve yaprakları üzerinde yapılan bir araştırma, Tavşan yüreği meyvesi ve Ayvalık yapraklarının toplam fenolik bileşik içeriğinin en yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak çalışmamızda tavşan yüreği diğer çeşitlere göre en düşük toplam fenolik bileşik içeriğine sahiptir. Bu farklılık özcan ve arkadaşlarının çalışmasının meyveler üzerinde, bizim çalışmamızın ise bu zeytin çeşidinden elde edilen sızma zeytinyağı ile ilgili olmasından kaynaklanabilir. Özcan vd.(2019), zeytin meyvelerinin fenolik bileşik içeriğinin çeşitlere ve hasat dönemine göre değiştiğini de göstermiştir. Aynı bulgu, farklı çeşitlerin farklı seviyelerde toplam fenolik bileşiklere sahip olduğu çalışmamızda da elde edilmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında toplam fenolik içerik tayinin yanı sıra farklı sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid içeriği de incelenmiştir. Sızma zeytinyağı örneklerinin toplam flavonoid içeriğinin de birbirinden farklı olduğunu göstermiştir (çizelge 4.3). Gözlenen farklılıklar, zeytinyağı çeşidinin türü ve agro-ekolojik koşullardan kaynaklanmaktadır (Rózanska vd. 2020). Kilis yağlık ve Memecik örnekleri sırasıyla 273.06 ve 244,93 ± 4,15 mg QE/g ile en yüksek flavonoid içeriğini göstermiştir. Tavşan yüreği örneği en düşük toplam flavonoid içeriği göstermiştir. İzmir sofralık toplam fenolik içerik açısından Ayvalık'a göre daha yüksek miktar gösterirken, toplam flavonoid içeriği sonucunda ise tam tersi gözlenmektedir. Flavonoid içeriği ayrıca sıcaklık, yağış gibi faktörlerden ve ayrıca olgunluk aşamasından da etkilenebilir. Olgun meyvelerden elde edilen zeytinyağında flavonoid içeriğinin yüksek olduğu bildirilmiştir (De Torres vd. 2018). Apigenin ve luteolin gibi bireysel flavonoidlerin içeriği, olgunluk derecesi ile artar (Bengana vd. 2013, Lukic vd. 2017) . Ayrıca en yüksek flavonoid içeriğinin genellikle yüksek yağışlı bölgelerde zeytinlerden elde edildiği gösterilmiştir . Bunun nedeni, Ayvalık sızma zeytin örneğinin ileri olgunluk aşamasının toplam fenolik bileşik içeriğinde azalmaya ve flavonoid içeriğinde artışa neden olması olabilir. Diğer çalışmalara göre, fenolik bileşiklerin içeriği, zeytin meyvelerindeki glikozitlerin düzeyine ve β-glukosidazın aktivitesine bağlı olabilir. Bu enzimin fenolik glikozitlerin

hidrolizinden ve fenolik bileşiklerin oksidasyonundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Hachicha Hbaieb vd 2015, Hachicha Hbaieb vd. 2017) .

Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin antioksidan aktiviteleri, DPPH ve ABTS antiradikal spektrofotometrik yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu iki yöntem genellikle bir bileşik veya maddenin antioksidan aktivitesi potansiyeli değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. Sızma zeytinyağı, antioksidan aktivitelerinden sorumlu fenolik bileşikler açısından zengindir. Son zamanlarda yapılan birkaç *in vitro* çalışma, zeytinyağındaki fenolik asitlerin, polifenollerin ve özellikle flavonoidlerin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Hayes vd. 2011, Camilla vd. 2018). Toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin belirlenmesinde elde edilen sonuçlar, sızma zeytinyağı çeşidine göre önemli bir farklılık göstermiştir. Benzer şekilde, DPPH ve ABTS'nin radikal indirgeyici aktiviteleri, incelenen sızma zeytinyağı örneklerinin polifenolik bileşik içeriğine (fenolik bileşikler veya flavonoidler) göre değişmektedir. Radikal DPPH'yi daha fazla süpürme etki gösteren sızma zeytinyağı örnekleri sırasıyla 0,82 mg/mL ve 1,20 mg/mL IC₅₀ değerleri ile KY ve İS olmuştur. En yüksek IC₅₀ değerine (7.07 mg/mL) sahip tavşan yüreği örneği DPPH radikali üzerinde daha az etkili olmuştur (Çizelge 4.5). En yüksek konsantrasyona karşılık gelen 4 mg/mL'de KY, İS, MC, AY ve TY örnekleri sırasıyla %97,02; %94,10; %97,28; %91,76; %28,44 DPPH indirgeme değerleri göstermiştir (Çizelge 4.6). ABTS radikalinin indirgeme aktivitesine gelince, MC ve KY örnekleri sırasıyla 0,38 ve 0,56 mg/mL IC₅₀ değerleri ile daha etkili olmuştur. İS ve TY örneklerini, 0,69 ve 0,94 mg/mL IC₅₀ değerleri ile ABTS radikalleri üzerinde orta derecede indirgeyici etkiler sergilemiştir. AY, 1,40 mg/mL'lik IC₅₀ değeri ile en düşük ABTS radikal indirgeme aktivitesini göstermiştir. Her bir sızma zeytinyağı örneğinin DPPH ve ABTS üzerindeki etkileri arasındaki korelasyon da değerlendirilmiştir. Böylece İS, KY ve AY örneklerinde sırasıyla R² = 0,9586, R² = 0,9577, R² = 0,9435 ile iyi bir korelasyon gözlenmiştir (çizelge 4.8). Bunun sonucu, iyi korelasyon gösteren sızma zeytinyağı örneklerin DPPH ve ABTS radikallerinin indirgenmesinden sorumlu fenolik bileşiklerin yeterli miktarını içermesidir.

Sızma zeytinyağının farklı örneklerindeki fenolik bileşiklerin içeriğine bağlı olan antioksidan aktivite, çeşit, ekstraksiyon yöntemi ve olgunluk aşaması gibi çeşitli

faktörlerden de etkilenebilmektedir. Huang vd.(2020) göre, olgunluk aşaması zeytinyağının antioksidan aktivitesini etkileyebilir. Gerçekten de, olgun meyvelerden elde edilen zeytinyağları düşük seviyelerde polifenolik bileşikler ve antioksidan ve sitoprotektif özellikleriyle bilinen oleik asit başta olmak üzere bazı doymamış yağ asitleri içermektedir. Çalışmalarımızda elde edilen sonuçlar, Huang vd. (2020) tarafından Çin'de yetiştirilen dört yağlık zeytin çeşidi (Arbequina, picual, Ezhi-8 ve Coratina) üzerinde elde edilen sonuçları desteklemektedir. Daha fazla fenolik bileşik içeren Coratina çeşidi, Arbequina, Picual ve Ezhi-8 çeşitlerinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bu durum, sızma zeytinyağının antioksidan etkilerinden büyük ölçüde fenolik bileşiklerin sorumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca dört çeşit Türk zeytinyağının meyve ve yaprakları üzerinde yapılan bir araştırma, fenolik bileşiklerin içeriğinin ve antioksidan aktivitenin hasat dönemine göre değiştiğini ortaya koymuştur. Nitekim hasadın başında toplanan meyveler antioksidan aktivite açısından yüksek değerler sergilemektedir. Sırasıyla Ayvalık için %88,885 (Ağustos) ve %76,190 (Aralık), Gemli için %82,670 (Ekim) ve %80,640 (Aralık), Edremit için %83,841 (Ağustos) ve %73,473 (Aralık), için %83,138 (Eylül) ve %80,640 (Kasım) Memecik ve %82.904 (Ağustos) ve %79.391 (Aralık) antioksidan değerleri elde edilmiştir (Özcan vd. 2019). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ek olarak, Mısır'da yetiştirilen iki sızma zeytinyağı çeşidi olan Koroneiki ve Coratina üzerinde yapılan yeni bir çalışma da antioksidan aktivitenin çeşide göre değiştiğini göstermektedir. Nitekim, Koroneiki çeşidi DPPH ve ABTS radikallerinin sırasıyla %35,85 ve %4,37 oranında inhibisyonunu gösterirken, Coratina çeşidi için elde edilen değerler sırasıyla %25,37 ve %2,82 olmuştur (Basuny vd. 2022). Çalışmamızda elde edilen bulgular Basuny vd. (2022) tarafından elden sonuçlarından daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir.

Diğer yandan Tez çalışmamız kapsamında farklı sızma zeytinyağlarının sığır Karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılmış antioksidan enzimler aktivisi üzerinde olan etkileri incelenmiştir. Karaciğer hayvanların ve insanların fizyolojisinde çok önemli işlev gören bir organdır. Karaciğer birçok biyokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği bir organdır. Bu nedenle karaciğer, birçok endojen ve eksojen ksenobiyotığın detoksifikasyonunda ve atılımında önemli bir rol oynamaktadır. Metabolik reaksiyon merkezidir ve antioksidan savunmada yer alan GPx, SOD ve GST gibi çeşitli enzim içermektedir. Karaciğer ayrıca

aldoz redüktaz içerir, bu enzim ployol yollarına müdahale eder ve glikozun sortbitole dönüşümünü katalize etmektedir. Diyabetik hastalarda aldoz redüktaz hiperaktivitesi, katarakt ve retinopati, nöropati ve nefropati gibi diğer hastalıkların ortaya çıkmasıyla diyabet komplikasyonlarına neden olmaktadır (Chang vd. 2019). Bu çalışmada, yukarıda belirtilen enzimler, Yıldırım vd. (2014) tarafından kullanılan yöntemle göre sığır karaciğerinden izole edilmiştir.

Enzim çalışmaları, farklı sızma zeytinyağı örneklerinin, antioksidan savunmanın ilk hattında yer alan bir enzim olan SOD üzerindeki etkileri incelenmesi ile başlamıştır. İlk olarak, sitozolde bulunan protein miktarı Lowry'nin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için sığır karaciğerinden izole edilen sitozol tampon solüsyonda sırasıyla 20 ve 40 kez seyreltilmiştir. Sitosoldeki protein miktarının tayini sırasında elde edilen sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak ifade edilir. Böylece 20 ve 40 dilüsyonlarda sırasıyla 940,55 ve 503,68 $\mu\text{g/mL}$ elde edilmiştir. Daha sonra SOD aktivitesinin derecesini kontrol etmek için, sızma zeytinyağı örnekleri dışındaki reaktifleri ve substratları içeren reaksiyon karışımının absorbanı 340 nm'de 5 dakikalık bir süre boyunca okunmuştur. Elde edilen sonuçlar SOD'un aktif olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11). Enzim kontrolünün sergilediği aktivitesi %100 enzim aktivitesine karşılık gelir ve farklı sızma zeytinyağı örneklerin konsantrasyonlarının etkileri bu değer üzerinden hesaplanmıştır. Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin SOD üzerindeki etkilerini belirlemek için 0,25 ila 4 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Tüm KY, MC İS ve AY örnekleri için düşük konsantrasyonlarda (0,25 ve 0,05 mg/mL) SOD enzim aktivisinde inhibisyon etkileri gözlenmiştir. Ancak 2 ve 4 mg/mL'lik konsantrasyonlar SOD üzerinde aktive edici etkiler göstermiştir. KY örneği, en yüksek konsantrasyon olan 4mg/mL'de %52,29'luk bir değerle daha iyi aktivasyon göstermiştir. MC, AY ve İS örnekleri en yüksek konsantrasyonunda sırasıyla %19,14, %27,87 ve %43,67 aktivasyon değerleri sergilemiştir. KY, MC ve AY örnekleri enzim üzerinde bifazik etki göstermiş, düşük konsantrasyonda SOD üzerinde inhibitör etki gösterirken, yüksek konsantrasyonda aktive etmişlerdir. TY örneği, diğer örneklerden farklı olarak, 4 mg/mL dışındaki farklı konsantrasyonlar arasındaki etkilerde çok önemsiz bir farkla tüm konsantrasyonlarda enzim inhibisyonu göstermiştir. En yüksek konsantrasyonda TY, %32,63'lük bir SOD inhibisyonu değeri göstermiştir.

Sızma zeytinyağının antioksidan enzimler (SOD, CAT, GPx) üzerindeki yapılan birçok in-vivo çalışmalar, dokulardaki ROT'u azaltmada rol oynayabileceğini göstermiştir. Ghorbel vd. (2015) tarafından yapılan bir araştırma, sızma zeytinyağının sıçanlarda karaciğere akrilamid (ACR) ve alüminyum klorür ($AlCl_3$) uygulanmasının indüklediği hasarı katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi artırarak azaltabildiğini göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, farklı sızma zeytinyağı yağlarının GPx ve GST üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. SOD enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etki gösteren Tavşan yüreği dışında tüm örnekler enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. En yüksek aktivasyon veya inhibisyon değerleri, en yüksek konsantrasyonlar tarafından indüklenmiştir. Bu, sızma zeytinyağının neden enzimler üzerinde doza bağlı bir şekilde etki ettiğini açıklar. Zeytinyağlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi izole edildiği organa göre farklılık gösterebilmektedir. Halbuki, diyabetik sıçan modelleri üzerinde yapılan bir çalışmada, saf hindistancevizi yağı karaciğerde SOD, KAT ve GPx aktivitesinde bir azalmaya neden olurken, kalp ve böbrek dokularında bu enzimlerin aktive olduğunu göstermiştir (Đurašević vd. 2019). In-vitro olarak sızma zeytinyağlarında yüksek oranda bulunan oleik asidin kırmızı kan hücrelerinde SOD aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Banerjee vd. 2020). Öte yandan, sızma zeytinyağı antioksidan enzimlerin, özellikle de SOD'un aktivitesini artırarak sıçanları akrilamid kaynaklı hepatoksisiteye karşı korumaktadır (Abd-Elfatah vd. 2022). Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada 1 aylık sıçanlarda, zeytinyağı ile tedaviden sonra SOD aktivitesi azalmıştır (Pejić vd 1999).

GPx, antioksidan mekanizmanın ikinci savunma hattında yer alan bir enzimdir. Katalaz gibi, H_2O_2 'nin H_2O 'ya O_2 'ye dönüşümünü katalize etmektedir. GPx bu nedenle antioksidan savunmada kilit bir rol oynar ve hücreleri vücut tarafından asimile edilebilecek maddelere dönüştürdüğü H_2O_2 'nin zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Bu enzimin, genellikle farklı rollere sahip birkaç izoformu vardır. GPx4'ün şiddetli bir ifadesinin, bazı kanserlerin kötülüklerine katkıda bulunduğu ve bazen antikanser ilaçlara karşı direnç neden olduğu bildirilmiştir (Yang vd. 2014, Viswanathan vd. 2017). Bu çalışmada, GPx'in etkinliği İşgor vd (2008) tarafından açıklanan yöntemle değerlendirilmiştir. Yöntem, GPx içermesi beklenen sığır karaciğerinden elde edilen sitozolün kullanılmasından oluşuyordu. Bunun için farklı sızma zeytinyağı örnekleri

uygulanmadan önce, Lowry yöntemi kullanılarak sitozolde bulunan protein miktarları belirlenmiştir. Farklı sitozol konsantrasyonları kullanılarak protein ölçümünden sonra, enzim optimizasyon eğrileri çizilmiştir. Enzim aktivitesinin en iyi eğrisini veren sitozol konsantrasyonu, farklı sızma zeytinyağı örneklerinin etkilerinin belirlenmesi için seçilmiştir. GPx aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak glutatyon redüktaz, glutatyon ve kumil hidropreoksit kullanılmıştır.

GPx izoenzimleri çoktur ve esas olarak hücrelerdeki konumları ve işlevleri bakımından farklılık gösterir. Genel olarak GPx izoenzimleri, antioksidan aktivitelerinden dolayı organizmalar için faydalıdır. Bununla birlikte, belirli kanserlerin gelişiminde GPx'in rolü karışıktır. Aslında, düşük aktiviteli GPx1 polimorfizmlerinin, daha yüksek meme ve prostat kanseri ilerlemesi riski ile birlikte artan oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (Blein vd. 2014). Öte yandan, kanser gibi kötü huylu hastalıklarda yüksek GPx aktivitesinin, kanser ilaç tedavisine karşı direnç mekanizmasında rol oynayabileceği bildirilmiştir (Schulz vd. 2012). Bu nedenle, GPx inhibitörlerinin geliştirilmesi, yeni anti-kanser ilaçları için umut verici bir yol sunabilir. Halihazırda, Behnisch-Cornwel vd. (2020), pentatiepinlerin güçlü bir GPx1 inhibitörleri sınıfı olduğunu bildirmiştir. Onlara göre, bu bileşikler, GPx'i inhibe edici etkileri sayesinde, kanser hücrelerinde oksidatif strese neden olmakta, bunun sonucunda DNA iplikçiklerinin kırılmasına, apoptozun indüklenmesine ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Çalışmamızın sonuçları, tüm sızma zeytinyağı örneklerinin GPx aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin enzim üzerindeki inhibisyon yüzdeleri, enzimin normal aktivitesine karşılık gelen %100 değerine göre hesaplanmıştır. KY ve İS yağ örnekleri sırasıyla %49,58 ve %39,69 ile en yüksek inhibisyon yüzdelerini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, KY örneğinin diğer örneklerle kıyasla Gpx üzerinde daha da verimli olduğunu kanıtlamıştır. TY ve AY sızma zeytinyağı sırasıyla %8,05 ve %10 ile en düşük GPx inhibisyon değerlerini vermiştir. Benzer şekilde, scrich vd. (2020), sızma zeytinyağında yüksek bir diyetin meme kanserli sıçan modellerinde enzimatik antioksidan kapasitede azalmaya neden olduğunu ve bunun sonucunda KAT ve GPx aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

GST, hücre detoksifikasyonunda önemli rol oynayan bir enzimdir. Bu detoksifikasyon, glutatyon-s-transferazın birçok elektrofilik bileşik ve GSH ile konjugasyon oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu konjugasyon süreçleri aracılığıyla GST, birçok canlı organizmada hücresel homeostazın korunmasına katkıda bulunmaktadır. GST'ler, GSH konjugatları oluşturmak için sitokrom P450 metabolizması tarafından üretilen indirgenmiş glutatyon (GSH) ve serbest radikallerin konjugasyon reaksiyonunu katalize ederek sitoprotektif bir rol oynamaktadır (Kural vd. 2018). Bu nedenle GST, kanserojen bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanır (Cnubben vd. 2001). Bu tez çalışmasında SOD ve GPX testi gibi GST testi de sığır karaciğer dokusundan elde edilen sitozol enzim kaynağı olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitozolda bulunan proteinlerin miktarı ilk önce farklı konsantrasyonlar kullanılarak belirlenmiştir. Optimizasyon testleri ve farklı örneklerin GST üzerindeki aktiviteleri için en iyi protein miktarını sağlayan konsantrasyon seçilmiştir. Tüm sızma zeytinyağı örnekleri GST'yi önemli ölçüde inhibe etmiştir. KY ve IS örneklerinin en iyi aktiviteleri gösterdiği diğer enzimlerde (SOD, GPx ve AR) elde edilen sonuçların aksine, GST'de elde edilen sonuçlar bu numunenin en düşük aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Böylece, %17.38 ve %18.79'luk bir GST inhibisyon etkisi kaydedilmiştir. Sırasıyla %28,57, %34,61 ve %30,38 inhibisyon değerleri ile TY ve AY sızma zeytinyağı GST üzerinde en iyi etkiye sahipken, diğer enzimler (SOD, GPx) üzerinde en düşük aktiviteleri göstermiştir. TY, toplam fenolik bileşikler ve flavonoidlerin en düşük değerlerini sunsa da, yine de polifenoller açısından zengin olan KY, AY ve MC'ye göre GST enzimi üzerinde daha etkili olduğunu kanıtlamıştır. Bu sonuçlar, bazı kanserlerde GST hiperaktivitesine bağlı kemoterapötik ilaç direncine karşı bir avantaj sunabilmektedir. Gerçekten de, çeşitli çalışmalar GST'lerinin bazı kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı direncinde rol oynadığını bildirmiştir: GST P1 izoenzimi, özellikle akciğer, kolon ve mide kanserlerinde indüklenir ve kemoterapötik ajana karşı hücresel dirençte yer aldığı gösterilmiştir (Singh ve Reindl 2021). Ek olarak, GST'ler hücre sinyalizasyonunda, post-translasyonel modifikasyonda ve bazı kemoterapötik ajanlara karşı dirençte dikkate değer bir rol oynamaktadır (Tew vd. 2011). İlaç direncinin gelişiminde, GST'ler doğrudan detoksifikasyon yoluyla veya MAP kinaz yolunu inhibe ederek etki gösterir. GST'ler umut verici bir terapötik hedef haline gelmiştir çünkü spesifik izozimler çok çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edilmektedir (Townsend ve

Tew 2003). Bu nedenle, kemoterapi sırasında çeşitli sızma zeytinyağı örneklerinin takviyesi, bu enzimlerin aşırı ekspresyonuna bağlı ilaç direncini azaltabilir.

Şeker hastalarında kandaki glikoz seviyesinin artması, glikozu ortadan kaldırmak için başka yollara başvurmasına neden olmaktadır. Bu durumda en çok meydana giren yollardan biri diyabetin komplikasyonlarından sorumlu olan poliol yoludur. Aldoz redüktaz, glikozu sorbitole dönüştürerek bu yolu tetikleyen ana enzimdir. Poliol yolunu tetikleyen bu enzimin inhibisyonu, diyabet komplikasyonlarının önlenmesi için potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Piyasada bulunan aldoz redüktaz inhibitörleri çok etkilidir, ancak kullanımları çeşitli yan etkilerle ilişkilidir. Bu nedenle, daha az yan etkiye sahip yeni doğal aldoz redüktaz inhibitörlerinin araştırılması önemlidir.

Farklı sızma zeytinyağların örneklerinin aldoz redüktaz üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Aldoz redüktaz, diyabet komplikasyonlarına karışan bir enzimdir. Gerçekte, aldoz redüktazın abartılı bir aktivitesi, retina dokularında bir ozmotik basınç sorununa neden olan aşırı sorbitol üretimine yol açmaktadır. Aldoz redüktazın bir kofaktör olarak NADPH'ye sahip olması nedeniyle, hiperaktivitesine kofaktörünün üretiminde bir artış eşlik etmektedir. NADPH birikimi, reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak oksidatif strese neden olmaktadır.

Farklı sızma zeytinyağı örneklerinin etkilerinin belirlenmesinden önce aldoz redüktaz aktivitesi, substrat olarak DL-gliseraldehit ve kofaktör olarak NADPH kullanılarak değerlendirilmiştir (Yıldırım vd. 2014, Alim vd. 2017). Küvet içerdiği reaksiyon karışımının absorbansı 340 nm dalga boyunda, bir spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Enzimin aktivitesi, NADPH tüketimine bağlı olarak absorbans azalmasına neden olmaktadır (şekil 4. 36).

Tüm sızma zeytinyağı örnekleri, %100 aldoz redüktaz aktivitesine karşılık gelen kontrol ile kıysla aldoz redüktaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemiştir. Kilis yağlık, Memecik ve İzmir sofralık örnekleri aldoz redüktaz üzerinde en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. Kilis yağlık, Memecik ve İzmir sofralık numuneleri sırasıyla 0,98, 1,00 ve 1,03 mg/mL IC_{50} değerleri sergilemiştir. Tavşan yüreği ve Ayvalık sırasıyla 3,23 ve 2,15 mg/mL IC_{50}

değerleri ile aldoz redüktaz üzerinde zayıf inhibitör etkiler göstermiştir (Çizelge 4. 10). Elde edilen sonuçlar, farklı numunelerin aldoz redüktaz üzerindeki etkisinin doza bağlı olduğunu göstermektedir. Nitekim Tavşan yüreği ve Ayvalık örnekleri aldoz redüktaz aktivitesi üzerinde sadece en yüksek konsantrasyonlarda etkili olmuştur. Elimam vd. (2017) tarafından zeytin yaprağı özleri üzerinde yapılan bir araştırma, bu zeytin yaprağı özlerinin aldoz redüktaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerinin konsantrasyona bağlı olduğunu göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktları aldoz redüktaz aktivitesini 65 µg/mL'lik bir IC₅₀ değeri ile inhibe etmiştir. Sızma zeytinyağı, hiperglisemi ile bağlantılı bazı enzimlerin aktivitesini inhibe eder. Loizzo vd. (2009), sızma zeytinyağının diyabet, obezite ve hipertansiyonda yer alan belirli enzimlerin aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerini incelemiştir. Bu çalışmaya göre, sızma zeytinyağından elde edilen fenolik bileşikler, α-glukosidaz ve α-amilaz aktivitesini inhibe etmiştir. Aynı yazarlar, biyolojik etkilerinden sızma zeytinyağının fenolik bileşiminin sorumlu olduğunu iddia etmektedir. Çalışmalarımızda elde edilen sonuçlar bu ifadeyi doğrular gibi görünmektedir çünkü en yüksek fenolik bileşik seviyelerine sahip sızma zeytinyağı örnekleri daha iyi biyolojik etkiler göstermiştir. Ek olarak, zeytin zeğirmeni atıklarından izole edilen bileşiklerin diabetik riskini artıran α-glukosidaz ve α-amilaz enzimlerin aktivitesi üzerine inhibe edici etkileri gösterilmiştir (Mwakalukwa vd. 2020). Bu nedenle, bu çalışmada elde edilen sonuçlar, sızma zeytinyağının, aldoz redüktaz hiperaktivitesi ile karakterize edilen diyabet komplikasyonlarının azaltılmasında bir umut olabileceğini kanıtlamaktadır. Diyabetik sıçanlarda antioksidan enzimlerin (SOD, CAT ve GPx) azaldığını ve lipid peroksidasyonu arttığı bildirilmiştir (Yıldırım 2002). Farklı sızma zeytinyağı örnekleri ve özellikle de İS, AY, MC ve KY gibi SOD enzimi aktivitesini artıran örnekleri diyabet komplikasyonların önleminde katkıda bulunabilir.

Bu tez çalışma kapsamında farklı sızma zeytinyağlarının hücre koruyucu etkileri de belirlenmiştir. Bu amaçla Vero adı verilen normal hücre dizileri kullanılmıştır. Sitoprotektif etkiler, farklı sızma zeytinyağı ekstraktlarına 18 saat ve hidrojen peroksit 6 saat maruz kaldıktan sonra MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. Hidrojen peroksit bir pro-oksidan ajan olarak kullanılmıştır, kültür ortamındaki varlığı hücreler üzerinde strese neden olur. Pozitif kontrol olarak sitoprotektif özellikleriyle bilinen askorbik asit kullanılmıştır (Gegotek vd. 2020). Askorbik asit ve rutin, lipid peroksidasyonunu önler

ve UV kaynaklı strese karşı hücre koruyucu etkilerine katkıda bulunan Nf2/ARE sinyalini destekler. Sızma zeytinyağının antioksidan özellikleriyle bilinen fenolik bileşiklerinin sitoprotektif etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Borges vd. (2015) tarafından yapılan bir araştırma, sızma zeytinyağının, ROS üretimini önemli ölçüde azaltarak Caco-2 hücrelerini tertbutilhidroperoksit kaynaklı strese karşı koruduğunu göstermiştir. Böylece 2 saat boyunca strese maruz kaldıktan sonra zeytinyağı ekstraktı alan grupların canlılığının sadece tertbutilhidroperoksit uygulananlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, HepG2 epitel hücrelerine uygulanan hidroksitirozol, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırmakta ve pro-oksidanların neden olduğu strese karşı hücrelerin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Başka bir mekanizma ile hidroksitirozol, Nrf2'nin çekirdeğe translokasyonu üzerinde hareket eder ve hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasına katkıda bulunarak antioksidan savunma sisteminde yer alan genlerin ekspresyonunu destekler (Martin vd. 2010). Ayrıca sızma zeytinyağı HepG2 hücrelerinde hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyucu aktivite göstermiştir (Lammi vd. 2020). Ek olarak sızma zeytinyağı insan deri epitel hücreleri üzerine UV indüklediği oksidatif stres karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Salucci vd. 2015). Bu çalışmada kullanılan sızma zeytinyağı örnekleri, hücre canlılığını artırarak hidrojen peroksitin neden olduğu hücre ölümünü önlemiştir (Şekil 4.43). İS, AY, MC, TY ve KY örneklerinin uygulanması hücre canlılığında sırasıyla %9,62 %12,41 %12,51 %20,78 ve %21,3 artış göstermiştir. Böylece TY ve KY örnekleri, %13,75'lik bir değere sahip askorbik asit dahil olamak üzere diğer örneklerle göre daha yüksek hücre koruyucu etkileri göstermiştir. Zeytinyağı ve zeytin yaprağı, sitoprotektif etkileri olan fenolik bileşikler açısından zengindir. Sızma zeytinyağı içerdiği fenolik bileşik olan hidroksitirozol üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, hücre koruyucu etkileri sahip olduğu söylenmiştir. Gerçekten de, sızma zeytinyağında bulunan ana fenolik bileşik olan hidroksitirozol ve H₂O₂ ile kültür ortamında birlikte inkübasyonun, mononükleer hücrelerde, periferik kanda oksidatif DNA hasarını azalttığı bildirilmiştir (Rosignoli vd. 2016). Benzer şekilde zeytinyağı özleri, mitokondriyal membran potansiyelini artırarak ve oksidatif hasarı hafifleterek mitokondriyal fonksiyonları iyileştirerek insan keratinositlerinin hücre canlılığını artırır (Yazihan vd. 2020). Ha vd. (2009) göre, MEF fibroblast hücrelerinin zeytin yaprağı ekstresi ve H₂O₂ ile birlikte uygulanması, tek başına H₂O₂ ile tedavi edilen hücrelere kıyasla hücre canlılığını %20 artırarak H₂O₂

sitotoksitesini baskılamıştır. Cıva (Hg), böbrek ve nöronal hastalık risklerine neden olan hücrelerde oksidatif stresi indükleyebilen ağır metallerden biridir. Officioso vd. (2016) tarafından yapılan bir araştırma, zeytinyağında bulunan bir bileşik olan hidroksitirozolün, cıvanın (Hg) neden olduğu strese karşı nöroblastik hücreleri koruduğunu bildirmektedir. Hidroksitirozolün pasif difüzyonla hücre zarlarını verimli bir şekilde geçtiği ve çeşitli insan sistemlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) sitotoksik etkilerini nötralize ettiği gösterilmiştir (Manna vd. 2000). Ayrıca, çeşitli zeytinyağı fenolleri, farklı antioksidan aktivitelerinden bağımsız olarak, homosistein kaynaklı artan endotel hücre yapışmasını inhibe edebilir (Manna vd. 2009). Son olarak HT, retinal pigment epitel hücrelerinde akrolein kaynaklı sitotoksiteyi artırarak oksidatif hasara ve mitokondriyal işlev bozukluğuna karşı koruma gösterir ve HepG2 hücrelerinde akrilamid kaynaklı sitotoksiteyi azaltır (Officioso vd. 2016). 2,4-Diklorofenoksasetik asit (2,4-D) sıçanlarda nefrotoksiteye neden olmaktadır. Sızma zeytinyağı ve fraksiyonlarının 2,4-D ile birlikte uygulanması, lipid peroksidasyonunda önemli bir azalma ve antioksidan savunma sisteminde bir artış ile birlikte böbreklerde 2,4-D tarafından indüklenen biyokimyasal değişikliklerin tersine çevrilmesine neden olmaktadır. Antioksidan savunma sistemi seviyesindeki bu artış, antioksidan savunmada yer alan enzimler olan SOD, GPX ve KAT'ın gelişmiş aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu etkiler, başta oleik asit olmak üzere tekli doymamış yağ asitlerinin yüksek içeriğine bağlanmıştır. Zeytinyağının, yüksek tekli doymamış yağ asitleri içeriği nedeniyle LDL oksidasyonuna karşı koruyucu özelliklere sahip olduğu görülmektedir (Nakbi vd. 2012, Banerjee vd. 2020).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, bazı Türk sızma zeytinyağı çeşitlerinin fenolik bileşiklerin karakterizasyonunam, antioksidan ve hücre koruyucu etkilerinin belirlenmesine katkıda bulunmaktadır. Çalışmamız, sızma zeytinyağının fenolik bileşimi ve biyolojik etkileri çeşidine göre değiştiğini kanıtlamıştır. Daha yüksek miktarda fenolik bileşik içeren sızma zeytinyağı örneklerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. En iyi sonuçlar Ege bölgesinde (İS, MC ve AY) ve Güney Anadolu bölgesinde (KY) elde edilmiştir. Antioksidan aktivitelere ilişkin elde edilen sonuçlar, sızma zeytinyağının antioksidan savunmadaki rolünü göstermektedir. Bu gözlemler, sızma zeytinyağının oksidatif stresin neden olabileceği kanser, nörodejeneratif hastalıklar

ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojileri önleyebileceğine dair literatürdeki verileri doğrulamaktadır. Öte yandan, bu tez çalışması, farklı sızma zeytinyağlarının aldoz redüktaz üzerindeki inhibitör etkileri yoluyla diyabetik komplikasyonların önlenmesinde oynayabileceği rolü ortaya koymuştur. Çalışmamız ayrıca farklı sızma zeytinyağlarının böbrek epitelinin Vero hücre hatlarını hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese karşı koruma yeteneğini de belirlemiştir. Bu nedenle, sızma zeytinyağı tüketimi böbrek hastalığının önlenmesinde faydalı olabilir. Buna ek olarak, sızma zeytinyağlarının GST inhibe edici etkileri nedeniyle, kemoterapi sırasında kullanımları GST kaynaklı ilaç direncine karşı yardımcı olabilmektedir. Ancak, bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. İlk olarak, zeytinyağının karakterizasyonu ile ilgili olarak, bireysel fenolik bileşikleri, steroller ve yağ asitlerini izole etmek için fraksiyonlama gereklidir. Öte yandan, biyolojik etkilerle ilgili olarak, özellikle enzimatik testler *in-vivo* çalışmaların konusu olmalıdır. Yukarıda belirtilen çalışmalar tamamlanana kadar ve çalışmamızın sonuçlarına göre, Ege bölgesi ve Güney Anadolu'dan sızma zeytinyağı tüketiminin sağlık açısından daha faydalı olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adam-vizi, V. 2005. Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: Contribution by Electron Transport Chain and Non-Electron Transport Chain Sources, Antioxidants & Redox signaling Volume 7, Numbers 9 & 10
- Akl, M.R., Ayoub N.M., Mohyeldin M.M., Busnena B.A., Foudah, A., Liu, Y., et al. 2014. Olive phenolics as c-Met inhibitors: (j)-Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. PLoS ONE 9, e97622.
- Alim, Z., Kilinc, N., Şengül B., Beydemir, Ş. 2017. Inhibition behaviours of some phenolic acids on rat kidney aldose reductase enzyme: an in vitro study. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 32, (1), 277–284.
- Almazan, M. R., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, MC. 2017. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. Food Research International 105, 654–66
- Amanpour, A., Kesen, S., Kelebek, H., Selli, S. 2017. Characterization of fatty acids composition in Iranian Phishomi extra virgin olive oil: Eurasian journal of food sciences and technology 2, 54-58.
- Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S. and Chaouch, A. 2008. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Thymus capitatus et de Thymus bleicherianus du Maroc. Phytothérapie, 6: 342-347.
- Antonella Saija and Nicola Uccella. 2001. Olive biophenols: Functional effects on human wellbeing Trends in Food Sciences and Technology 11, 357-363.
- Armstrong R.C., Swallow A.J. 1969. Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. Radiat Res. 40: 563-579.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, EŞ., Yılmaz, B. 2019. The Role Of Antioxidant Enzymes in Oxidative Stress - Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) And Glutathione Peroxidase (GPx). Med J SDU; 26, 3, 362-369.
- Atanasov, A. G. Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Supuran, C. T. 2021. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 20, 201.
- Badouard, C. 2006. Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I., Français. fftel-00134563f.
- Baiano, A., Terracone, C., Viggiani, I., Alessandro, m., Nobile, D., 2013. Effects of Cultivars and Location on Quality, Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extra-Virgin Olive Oils. J Am Oil Chem Soc 90, 103–111.

- Balestri, F., Moschini, R., Mura, U., Cappiello, M., Del Corso, A. 2022. In Search of Differential Inhibitors of Aldose Reductase. *Biomolecules*, 12, 485.
- Banerjee, A., Dey, T., Ghosh, A. K., Mishra, S., Bandyopadhyay, D., Chattopadhyay, A. 2020. Insights into the ameliorative effect of oleic acid in rejuvenating phenylhydrazine induced oxidative stress mediated morpho-functionally dismantled erythrocytes, *Toxicology Reports* 7 (2020) 1551–1563.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., GómezCaravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. 2007. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade *Molecules*, 12.
- Bengana, M., Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil, *Food Research International* 54, 1868–1875.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C. H., Smith, A. B., Breslin, P. A. 2005. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437, 45-46.
- Behnisch-Cornwell, S., Bandaru, S. S. M., Napierkowski, M., Wolff, L., Zubair, M., Urbainsky, C., Lillig, C., Schulzke, C., Bednarski, P. J. 2020. Pentathiepins: A Novel Class of Glutathione Peroxidase 1 Inhibitors that Induce Oxidative Stress, Loss of Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis in Human Cancer Cells, *ChemMedChem* 2020, 15, 1515–1528.
- Blein, S., Berndt, S., Joshi, A. D., Campa, D., Ziegler, R. G., Riboli, E. D. G. Cox, N. C. I. 2014. Factors associated with oxidative stress and cancer risk in breast and prostate cancer cohort consortium, *Free Radical Res* 48, 380–386.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Borges, H.T., Cabrera-Vique, C., Seiquer, I. 2015. Antioxidant properties of chemical extracts and bioaccessible fractions obtained from six Spanish monovarietal extra virgin olive oils: Assays in Caco-2 cells, *Food & Function* DOI: 10.1039/c5fo00529a.
- Bortolomeazzi R., Berno, P., Pizzale, L., et al. 2001. Sesquiterpene, Alkene, and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3278-3283.
- Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. 2006. *Olive Oil Composition*, Copyright © by AOCS Press.
- Brigelius-Flohe R, Traber MG. 1999. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J*; 13:1145-55.
- Brot N., Weissbach H. 2000. Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers*. 55: 288-296.

- Bruno, B., 2020. Stress oxydant et protections antioxydantes, *Revue francophone des laboratoires* • N °522 • MAI 2020.
- Burbulla, L.F.; Song, P.; Mazzulli, J.R.; Zampese, E.; Wong, Y.C.; Jeon, S. 2017. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*, 357, 1255–1261.
- Cadenas, E., and K. J. Davies. 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology & Medicine* 29(3–4): 222–230.
- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S. 2002. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem?* 383(6), p. 93.
- Carmen, L., Mulinacci, N., Cecchi, L., Bellumori, M., Bollati, C., Bartolomei, M., Franchini, C., Clodoveo, M. L., Corbo, F., Arnoldi, A. 2020. Virgin Olive Oil Extracts Reduce Oxidative Stress and Modulate Cholesterol Metabolism: Comparison between Oils Obtained with Traditional and Innovative Processes; *Antioxidants*, 9, 798.
- Caruana, M., Cauchi, R., Vassallo, N .2016. Putative Role OF Red Wine polyphenols against Brain Pthology in Alzheimer's and Parkinson's disease, *Front. Nutr*; 3.31.
- Catalan, U., Lopez de las Hazas, M., Rubio, L., andez-Castillejo, S. F., Pedret, A., De la Torre, R., Motilva, M., Sola, R. 2015. Protective effect of hydroxytyrosol and its predominant plasmatic human metabolites against endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59, 2523–2536.
- Catalan, U., Rubio, L., Lopez de las Hazas, M., Herrero, P., Nadal, P., Canela, N., Pedret, A., Motilva, ., M., Sola, R. 2016. Hydroxytyrosol and its complex forms (secoiridoids) modulate aorta and heart proteome in healthy rats: Potential cardio-protective effect, *Mol. Nutr. Food Res.* 2016, 60, 2114–2129.
- Cavalli J. F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., et al. 2004. Characterization of Volatile Compounds of French and Spanish Virgin Olive Oils by HS-SPME: Identification of Quality-freshness Markers. *Food Chem.* 88: 151-157.
- Chang KC, Shieh B, Petrash JM (2019) Role of aldose reductase in diabetes-induced retinal microglial activation. *Chem Biol Interact* 302:46–52.
- Chen, L., Zhang, J., Zhu, Y., Zhang, Y .2018. Interaction of chromium (III) or chromium (VI) with catalase and its effect on the structure and function of catalase: An in vitro study. *Food Chemistry* 244 (2018) 378–385.
- Chimento, A., Casaburi, I., Rosano, C., Avena, P., De Luca, A., Campana, C., Martire, E., Santolla, M.F., Maggiolini, M., Pezzi, V., Sirianni, R., 2014. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ERnegative SKBR3 breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 478–489.
- Cicerale, S, Lucas, L., Keast, R. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil, *Int. J. Mol. Sci*, 11, 458-479.

- Cillard, J., Cillard, P.. 2003. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations, OCL VOL. 13 N° 1 JANVIER-FÉVRIER 24-29.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J., Van Bladeren, P.J. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141- 152.
- Coelho, E.C., de Araujo, C.C., Follmer, C. 2019. Formation of large oligomers of DOPAL-modified alpha-synuclein is modulated by the oxidation of methionine residues located at C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 509, 367–372.
- Collado-González, J., C. Grosso, P. Valentão, P. B. Andrade, F. Ferreres, T. Durand, A. Guy, J. M. Galano, A. Torrecillas and Á. Gillzquierdo. 2017. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by Spanish extra virgin olive oils: The involvement of bioactive compounds other than oleuropein and hydroxytyrosol. *Food Chem.* 235: 298-307.
- Corona, G., Spencer, J. P., Dessi, M. A. 2009. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract, *Toxicol. Ind. Health*, 25, 285–293.
- Cristina, L., Valentina, D. 2017. Pigments in Extra-Virgin Olive Oils Produced in Tuscany (Italy) in Different Years, *Foods*, 6, 25.
- Czech, M. P., Lawrence J. C. Jr., Lyn. W. S. 1974. “Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 71, no. 10, pp. 4173–4177.
- D'Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., Pontoni, G., Galletti, P., Zappia, V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil (2001) *Drug Metabolism and Disposition*, 29 (11), pp. 1492-1498.
- Darbar, S., Saha, S., Chattopadhyay, A .2021. Ethanol intoxicated Hepatic Oxidative Stress Mitigated by polyherbal formulation – trasina® IN MURINE, *Innoriginal International Journal of Sciences* 8, 3 53-65.
- Davis, C.R.; Hodgson, J.M.; Woodman, R.; Bryan, J.; Wilson, C.; Murphy, K.J. 2017. A mediterranean diet lowers blood pressure and improves endothelial function: results from the medley randomized intervention trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 105, 1305-1313.
- De Torres, A., Espínola, F., Moya, E., Alcalá, S., Vidal, A. M., Castro, E. 2018. Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans, *WT - Food Science and Technology* 90, 22–30.
- Defraigne, J. O. 2005. Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ? *Rev Med Liege*, 60, 472-478.
- De Oliveira, S., de Souza, G.A., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., Ferreira, M. J. P. Romoff, P and Jose, W. **2014**. Evaluation of antiradical assays

used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 3, 497-503.

- Deiana, P., Santona, M., Dettori, S., Culeddu, N., Dore, A., Molinu, M.G. 2019. Multivariate approach to assess the chemical composition of Italian virgin olive oils as a function of variety and harvest period, *Food Chemistry*, 300, 125243.
- Denny, A., Buttriss J. 2007. Plant foods and health: focus on plant bioactives. European Food Information Resource (EuroFIR) Consortium. Funded under the EU 6th Framework Food Quality and Safety Thematic Priority. Contract FOOD-CT-2005-513944.
- Diraman, H. 2007. Gemlik Zeytin çeşidinden Üretilen Natürel Zeytinyağlarının Oksidatif Stabilitelerinin Diğer Önemli Yerli Çeşitler ile Karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 3:53–59.
- Eitinger, T. 2004. In vivo production of active nickel superoxide dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 is dependent on its cognate peptidase. *J. Bacteriol.* 186, 7821–7825.
- Efe, R., Soykan, A., Cürebal, İ., Sönmez, S. 2013. Olive and Olive Oil; Edremit Municipality: Balıkesir, Turkey, ISBN 978-605-62253-3-8.
- Elimam, D. M. A., Ibrahim, A. S., Liou, G. I., Badria, F. A. A. 2017. Olive and ginkgo extracts as potential cataract therapy with differential inhibitory activity on aldose reductase, *Drug Discoveries & Therapeutics*. 11(1), 41-46.
- Escrich, K., Vela, E., Solana, M., Moral, R. 2020. Effects of diets high in corn oil or in extra virgin olive oil on oxidative stress in an experimental model of breast cancer, *Molecular Biology Reports* 47:4923–4932.
- Fanali, C., Della Posta, S., Dugo, L., Russo, M., Gentili, A., Mondello, L., De Gara, L. 2018. Application of deep eutectic solvents for the extraction of phenolic compounds from extra-virgin olive oil, *Electrophoresis*, 41, 1752–1759.
- Fanali, C., Posta, S. D., Vilmercati, A., Dugo, L., Russo, M., Petitti, T., Mondello, L., de Gara, L. 2018. Extraction, Analysis, and Antioxidant Activity Evaluation of Phenolic Compounds in Different Italian Extra-Virgin Olive Oils, *Molecules*, 23, 3249.
- Favier, A. 2003. Le stress oxydatif. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'Actualité chimique* N° 269-270, 108-115.
- Finkel T. 2000. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476: 52-54.
- Flohe', L., Gunzler, W.A., Schock, H. H. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132–134.
- Fogli, S., Arena, C., Carpi, S., Polini, B., Bertini, S., Digiacomio, M., Gado, F., Saba, A., Saccomanni, G., Breschi, M. C., Nieri, P., Manera, C., Macchia, M. 2016. Cytotoxic Activity of Oleocanthal Isolated from Virgin Olive Oil on Human Melanoma Cells, *Nutrition and Cancer*, 68:5, 873-877.

- Förstermann, U., Xia, N., Li, H. 2017. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res*, 120, 713–735.
- Franconi, F., Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P. P., Leri, F., Mulinacci, N., Romani, A. 2006. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem*, 54, 3121–3125.
- Fuentes, E., Paucar, F., Tapia, F., Ortiz, J., Jimenez, P. 2018. Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietals, *Food Chemistry*, 243, 285–294.
- García-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferraro C, Vázquez-Martín A, Meneández JA, Segura-Carretero A et al (2010) Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J Pharmaceut Biomed Anal* 51:416–429.
- Gegotek, A., Jarocka-Karpowicz, I., Skrzydlewska, E. 2020. Cytoprotective Effect of Ascorbic Acid and Rutin against Oxidative Changes in the Proteome of Skin Fibroblasts Cultured in a Three-Dimensional System, *Nutrients*, 12, 1074.
- Ghorbel, I., Jamoussi A. E.K., Boudawara, T., Kamound, N. G., Zeghal, N. 2015. Potential protective effects of extra virgin olive oil on the hepatotoxicity induced by co-exposure of adult rats to acrylamide and aluminum, *The Royal Society of Chemistry DOI: 10.1039/c4fo01128g*.
- Gomez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M., Fregapane, G. 2006. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J. Agric. Food Chem*, 54, 7130–7136.
- Gökçebağ, M., Dıraman, H., Özdemir, D. 2013. Classification of Turkish Monocultivar (Ayvalık and Memecik cv.) Virgin Olive Oils from North and South Zones of Aegean Region Based on Their Triacylglycerol Profiles, *J Am Oil Chem Soc*, 90, 1661–1671.
- Grosch, W. 2004. *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis – Aroma Compounds*; Nollet, L. M. L., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; p 717.
- Guasch-Ferré, M., Hu, F.B., Martínez-González, M.A., Fitó, M.; Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Corella, D., Recondo, J., GómezGracia, E., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Muñoz, M.A., Pintó, X.; Lamuela-Raventós, R.M., Basora, J., Buil-Cosiales, P., Sorlí, J.V., Ruiz-Gutiérrez, V., Martínez, J.A., Salas-Salvadó, J. 2014. Olive Oil Intake and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.*, 12, 78.
- Gurdeniz, G., Ozen, B., Tokatli, F. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy, *Eur Food Res Technol* 227(4):1275–1281.

- Ha, J.Y., Goo, S. Y., Sung, J., Shin, H. 2009. Antioxidant and Cytoprotective Activity of the Olive Leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) Extracts on the Mouse Embryonic Fibroblast Cel, *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 18, No. 4, pp. 965 -970.
- Hachicha Hbaieb,R., Kotti, F., García-Rodríguez, R., Gargouri, M., Sanz, C., Pérez A. G. 2015. Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles, *Food Chemistry* 174, 240–247.
- Hachicha Hbaieb, R., Kotti F., Vallim E., Bendini, A., Toschi, T.G .2017. Mohamed Gargouria., Effect of Tunisian olive ripeness on endogenous enzymes and virgin olive oil phenolic composition, *Journal of Food Composition and Analysis* 62, 43–50.
- Hamdi, H.K., Castellon, R., 2005 Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 334, 769–778.
- Hang, K. C., Shieh, B., Petrash, J. M .2019. Role of aldose reductase in diabetes-induced retinal microglial activation. *Chem Biol Interact* 302:46–52.
- Hdrih, F., Z. Bouallagui, H. Junkyu, H. Isoda and S. Sayadi. 2015. The α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory of hydroxytyrosol and oleuropein. *J. Oleo Sci.* 64: 835-843.
- Huggins T.G., Wells-Knecht M.C., Detorie N.A., Baynes J.W., Thorpe S.R. 1993. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *J BiolChem.* 268,12341-12347.
- Inceni, A., Serra, G., Atzeri, A., Melis, M. P., Serreli, G., Bandino, G., Sedda, P., Campus, M., Tuberoso, C. I., Deiana, M. 2016. Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells, *Food Chem. Toxicol*, 90, 171–180.
- International Olive Council, Madrid, Spain: Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils; International Olive Council (COI/T.15/NC No 3/Rev. 16 June 2021). Available online: https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/07/COI-T15-NC3-REV-16-2021_ENG.pdf
- Jurado-Ruiz, E., Álvarez-Amor, L., M.Varela, L., Berná, G., S. Parra-Camacho, M., J. Oliveras-Lopez, M., Martínez-Force,E., Rojas A., Hmadcha, A., Soria, B., Martín, F.2019. Extra virgin olive oil diet intervention improves insulin resistance and islet performance in diet-induced diabetes in mice, *Scientific Reports* (2019) 9:11311.
- Kalogeropoulos, N., Tsimidou, M. 2014. Antioxidants in Greek virgin olive oils. *Antioxidants*, 3, 387–413.
- Karaosmanoglu, H., Soyer, F., Özen, B., Tokatli, F. 2010. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem*, 58, 8238–8245.

- Kattoor, A. J., Pothineni, N.V.K., Palagiri, D., Jawahar L. M. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19, 42.
- Kesen, S., Kelebek, H., Selli, S. 2014. Characterization of the Key Aroma Compounds in Turkish Olive Oils from Different Geographic Origins by Application of Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *J. Agric. Food Chem*, 62, 391–401.
- Khurana S, Venkataraman K, Hollingworth A, Piche M, Tai TC. 2013. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients* 5:3779–827.
- Kim, Y., Jang, H.H. 2019. Role of Cytosolic 2-Cys Prx1 and Prx2 in Redox Signaling, *Antioxidant*, 8, 169.
- Kim, S. B., Hwang, S. H., Suh, H. W., & Lim, S. S. 2017. Phytochemical analysis of *Agrimonia pilosa* Ledeb, its antioxidant activity and aldose reductase inhibitory potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 379.
- Klein, C., Westenberger, A. 2012. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a008888.
- Kratzer, A., Giral H., Landmesser, U. 2014. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res*, 3,3, 50–61.
- Kucukgoncu, S., Zhou, E., Lucas, K. B., and Tek, C. 2017. Alpha-lipoic acid (ALA) as a supplementation for weight loss: results from a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev.* 18, 594–601
- Kural, C., Kocdogan, A.K., Simsek, G.G., Oguztuzun, S., Kaygın, P., Yılmaz, I., Bayram, T., Izci, Y. 2018. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 enzyme expression in patients with intracranial tumors: Preliminary report of 55 patients. *Med. Princ. Pr*, 28, 56–62.
- Kurşun, O. E., Süzen, S. Yildirim, Ö. 2021. Alterations of Aldose Reductase Activity by Indole-3- carboxaldehyde Derivatives. *Commun.Fac.Sci.Univ.Ank.Ser. C Biology*, Volume 30(1), 13-24.
- Lerma-Garcia, M.J. 2012. Characterization and authentication of olive and other vegetable oils: New analytical methods, Doctoral thesis, DOI:10.1007/978-3-642-31418-6, Universitat de Valencia, Spain, Chapter 1, p. 2. *Food Res.* 2016, 60, 519–529.
- Lesage, S.; Brice, A. 2009. Parkinson's disease: From monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet*, 18, R48–R59.
- Li, S., Han, Z., Ma, Y., Song, R., Pei, T., Zheng, T., Wang, J., Xu, D., Fang, X., Jiang, H., et al. 2014. Hydroxytyrosol inhibits cholangiocarcinoma tumor growth: An in vivo and in vitro study. *Oncol. Rep*, 31, 145–152.
- Li, Z., Chen, X., Liu, Z., Ye, W., Li, L., Qian, L., Ding, H., Li, P., Aung L.H.H. 2020. Recent Advances: Molecular Mechanism of RNA Oxidation and Its Role in Various Diseases. *Front. Mol. Biosci.* 7:184.

- Li, W., Chen, S., Mei, Z., Zhao, F., Xiang, Y. 2019. Polymorphisms in sorbitol-aldose reductase (Polyol) pathway genes and their influence on risk of diabetic retinopathy among Han Chinese. *Med Sci Mon Int Med J Exp Clin Res* 25:7073.
- Ling Guo., Shaoying Gong., Yanyan Wang., Qi Sun., Kai Duo and Peng Fe .2020. Antibacterial Activity of Olive Oil Polyphenol Extract Against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*: Possible Mechanisms; *Foodborne Pathogens and Disease* Volume 17, Number 6.
- Lisanti M.P., Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z et al., Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs "fertilizer". *Cell Cycle*; 10: 2440-2449.
- Liu and Changlin Liu. 2019. A new function of copper zinc superoxide dismutase: as a regulatory DNA-binding protein in gene expression in response to intracellular hydrogen peroxide, *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, No. 10 5075
- Liu, M., Gong, X., Alluri, R.K., Wu, J., Sablo,T., Li, Z. 2012. Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli* *iol Chem.* 2012 February 1; 393(3): 123–132
- Loizzo, M. R., M. Bonesi, S. M. Nabavi, E. Sobarzo-Sánchez, L. Rastrelli and R. Tundis. 2017. In: P. B. Andrade, P. Valentão and D. M. Pereira (Eds.), *Hypoglycaemic Effects of Plants Food Constituents via Inhibition of Carbohydrate-hydrolysing Enzymes: From Chemistry to Future Applications*, in *Natural Products Targeting Clinically Relevant Enzymes*, Vol. 6, WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 135-161.
- López-Yerena, A., Ninot, A., Jiménez-Ruiz, N., Lozano-Castellón, J., Pérez, M., Escribano-Ferrer, E., Romero-Aroca, A., Lamuela-Raventós, R. M., Vallverdú-Queralt, A. 2021. Influence of the Ripening Stage and Extraction Conditions on the Phenolic Fingerprint of ‘Corbella’ Extra-Virgin Olive Oil. *Antioxidants* 10, 877.
- Lukic, I., Z'anetic, M., Jukic' Špika, M., Lukic', M., Koprivnjak, O., Bubola K.B. 2017. Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality, *Food Chemistry* 232, 610–620.
- Mahajan, L., Verma, P. K., Raina, R., Pankaj, N. K., Sood, S., and Singh, M. (2018). Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicol. Rep.* 5, 1114–1119.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S., Zappia, V. 2000. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells, *FEBS Lett*, 470, 341–344.
- Manna, C., Napoli, D., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Zappia, V. 2009. Olive Oil Phenolic Compounds Inhibit Homocysteine-Induced Endothelial Cell Adhesion Regardless of Their Different Antioxidant Activity, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 3478–3482.

- Mario D.A.C. 2016 Editorial: Impact of Lipid Peroxidation on the Physiology and Pathophysiology of Cell Membranes. *Frontiers in Physiology*. 7.
- Marchitti, S. A., Chen, Y., Thompson, D. C., and Vasiliou, V. 2011. Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens* 37:206. doi: 10.1097/icl. 0b013e3182212642
- Marklund S.L., Holme E, Hellner L. 1982. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*;126:41–51.
- Marklund S. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* (79)7634–7638.
- Martin, M. A., Ramos, S., Granado-Serrano, A. B., Rodriguez-Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L., Goya, L. 2010. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, 54, 956– 960.
- Mathebula, S.D. 2015. Polyol pathway: a possible mechanism of diabetes complications in the eye. *Afr Vis Eye Health* 74, 5.
- Mateos, R., Pereira-Caro, G., Bacon, J.R., Bongaerts, R., Sarriá, B., Bravo, L., Kroon, P.A. 2013. Anticancer activity of olive oil hydroxytyrosyl acetate in human adenocarcinoma Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem*, 61, 3264–3269.
- Maughan, W. P., Shuman, S. 2015. Characterization of 3'-phosphate RNA ligase paralogs RtcB1, RtcB2, and RtcB3 from *Myxococcus xanthus* highlights DNA and RNA 5'-phosphate capping activity of RtcB3. *J. Bacteriol.* 197, 3616–3624
- Meiser, J., Weind, D., Hiller, K. 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal*, 11.
- Mei-Lin Wu, Ke-Li Tsai, Seu-Mei Wang, Jiahn-Chun Wu, Bor-Sen Wang, and Yuan-Teh Lee; Mechanism of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Free Radical-Induced Intracellular Acidification in Cultured Rat Cardiac Myoblasts Volume 78, Issue 4, 1 April 1996; Pages 564-572.
- Miro Casas, E., Farre Albadalejo, M., Covas Planells, M. I., Fito Colomer, M., Lamuela Raventos, R. M., de la Torre Fornell, R., 2001. Tyrosol bioavailability in humans after ingestion of virgin olive oil, *Clin. Chem*, 47, 341– 343.
- Mittal, C. K., Murad, F. 1977. "Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 10, pp. 4360–4364, 1977.
- Montedoro, G.; Servili, M. 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem*, 41, 2228-2234.

- Muhammad, H., Alu'datt, T. R., Mohammad. N., Alhamad, Gammoh, S., Ereifej, K., Majdi A., Al-Mahasneh, Doa'a Al-u'datt, Naimi, O., Hussein, N., Kubow, S. 2017. Application of Olive Oil as Nutraceutical and Pharmaceutical Food: Composition and Biofunctional Constituents and Their Roles in Functionality, Therapeutic, and Nutraceutical Properties, *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 10, 265-298.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Dabbou, S., Chargui, I., Issaoui, M., Ferih, A., Ali, Z. B., Alsaif, ., M. A., Hammami, M. 2012. Olive oil protects against 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative renal dysfunction in adult rats, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2012, 114, 469–478.
- Nicola J. Curtin. 2012. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target; *nature reviews*, volume 12.
- Nishikimi, M., Yagi, K. 1991. Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 1203S–1208S.
- Nocella, C., Cammisotto, V., Fianchini, L., D'Amico, A., Novo, M., Castellani, V., Carnevale, R. 2018. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: Benefits for human health. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders—Drug Targets*, 18:4–13.
- Numakawa, Y., Numakawa, T., Matsumoto, T., Yagasaki, Y., Kumamaru, E., Kunugi, H. Vitamin E. 2006. Protected cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Neurochem.*, 97, 1191–1202.
- Nunes, X, P., Silva, F. S., Almeida, J. R.G S., de Lima, J.T., Ribeiro, ., L. A., Júnior, Lucindo, J.Q., José Maria, B.F. 2012. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0203-8.
- Nur Sazwi, N., Nalina, T., AbdulRahim, Z. 2013. Antioxidant and cytoprotective activities of Piper betle, Areca catechu, Uncaria gambir and betel quid with and without calcium hydroxide, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:351.
- Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G. 1993. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production; the *Journal of Clinical Investigation*, Inc. Volume 91, 2546-2551.
- Oke, G. O., Abiodun, A. A., Imafidon, C. E., and Monsi, B. F. 2019. Zingiber officinale (Roscoe) mitigates CCl4-induced liver histopathology and biochemical derangements through antioxidant, membrane-stabilizing and tissue-regenerating potentials. *Toxicol. Rep.* 6, 416–425.
- Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Uslu, N., Ghafoor, K., Isam A., Ahmed, M., Elfadil E. B. 2019. The Effect of Olive Varieties on Fatty Acid Composition and Tocopherol Contents of Cold Pressed Virgin Olive Oils, *J. Oleo Sci.* 68, (4) 307-310

- Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J.F Gustavo, A., Alez-Aguilar, G. 2011. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants, *Journal of Food Science* Vol. 76, Nr. 1.
- Park, H.A., Mnatsakanyan, N., Broman, K., Davis, A.U., May, J., Licznerski, P. 2019. Alpha-Tocotrienol prevents oxidative stress-mediated post-translational cleavage of Bcl-xL in primary hippocampal neurons. *Int. J. Mol. Sci.*, 21.
- Park, H.A., Licznerski, P., Mnatsakanyan, N., Niu, Y., Sacchetti, S., Wu, J. 2017. Inhibition of Bcl-xL prevents pro-death actions of DeltaN-Bcl-xL at the mitochondrial inner membrane during glutamate excitotoxicity. *Cell Death Differ*, 24, 1963–1974.
- Parkinson, L., Keast, R. 2014. Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease. *Int J Mol Sci* 15, 12323–12334.
- Paul, M., Hemshekhar, M., Kemparaju, K., Kesturu S, Girish. 2019. Berberine mitigates high glucose-potentiated platelet aggregation and apoptosis by modulating aldose reductase and NADPH oxidase activity, *Free Radical Biology and Medicine* 130, 196–205.
- Pedan, V., Popp, M., Rohn, S., Nyfeler, M., Bongartz, A. 2019. Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil. *Molecules*, 24,2041; doi:10.3390/molecules24112041.
- Pereira Nunes, X., Silva, F.S., Guedes da S. J.R., Tolentino de Lima, A.J., de Araújo Ribeiro, L. A., Júnior, L.J.Q., Filho, J.M.B. 2012. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products, *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0203-8.
- Pinto, J., Paiva-Martins, F., Corona, J., Debnam, E. S., Jose Oruna-Concha, M., Vauzour, D., Gordon, D. H., Spencer, J. P. 2011. Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine, *Br. J. Nutr*, 105, 1607–1618.
- Pirillo A, Catapano AL. 2013 Soluble lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 as a biochemical marker for atherosclerosis-related diseases. *Dis Markers*
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., Beltrán, R. 2013. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil, *Food Anal. Methods* 6, 123–132.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, Article ID 8416763, 13 pages
- Poirier LA. 1987. Stages in carcinogenesis: alteration by diet. *Am J Clin Nutr.*; 45(1 Suppl):185-91.

- Poinso, A., 2016. Recherche d'inhibiteurs de la superoxyde dismutase à partir de substances naturelles. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III. Français. : 2016TOU30378ff. fftel-01754826f.
- Poisson, J.P., Narce, M. 2003. Lipides et corps gras alimentaires, Paris (France): Sciences et Techniques agroalimentaires
- Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 956792.
- Psaltopoulou, T., Kosti, R. I., Haidopoulos, D., Dimopoulos, M., Panagiotakos, D. B. 2011. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: A systematic review and a meta-analysis of 13800 patients and 23340 controls in 19 observational studies. *Lipids in Health and Disease*, 10:127.
- Rayman, M.P. 2012. Selenium and human health. *Lancet* 379 (9822), 1256–1268.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Tamara., Forbes-Hernández, Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Cinciosi, D., Carrasco-Pancorbo, A., Simal-Gándara, J., Giampieri, F., Battino, M. 2018. Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 119 ,73–85.
- Reboredo-Rodríguez, P., Olmo-García, L., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Carrasco-Pancorbo, A., Cancho-Grande, B. 2020. Effect of olive ripening degree on the antidiabetic potential of biophenolsrich extracts of Brava Gallega virgin olive oils, *Food Research International* 137 (2020) 109427.
- Reis, R., Sipahi, H., Zeybekoğlu, G., Çelik, N., Kırmızıbekmez, H., Kaklıkkaya, N., Aydın, A. 2018. Hydroxytyrosol: The Factor Responsible for Bioactivity of Traditionally used Olive Pits. *Euroasian J Hepatogastroenterol*, 8(2):126-132.
- Revelou, P.-K.; Xagoraris, M.; Alexandropoulou, A.; Kanakis, C.D.; Papadopoulos, G.K.; Pappas, C.S.; Tarantilis, P.A. Chemometric Study of Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Four Widespread Greek Cultivars. *Molecules* 2021, 26, 4151.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., De Castro, A. 2007. In vitro activity of olive oil polyphenols against helicobacter pylori. *J. Agric. Food Chem.* 55: 680-6.
- Rózanska, A., Russom, M., Cacciol, M., Salafia, F., Polkowskam, Z., Dugo, P., Mondello, L. 2020. Concentration of Potentially Bioactive Compounds in Italian Extra Virgin Olive Oils from Various Sources by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis, *Foods*, 9, 1120.
- Rosignoli, P., Fuccelli, R., Sepporta, M.V., Fabian, R. In vitro chemo-preventive activities of hydroxytyrosol: the main phenolic compound present in extra-virgin olive oil, *Food Funct.*, 2016, 7, 301.

- Ryoo, S.W., Kim, D.U., Won, M., Chung, K.S, Jang, Y.J., Oh G.T., et al. 2004. Native LDL induces interleukin-8 expression via HO, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 62:185–93
- Sairazi, N. S. M., Sirajudeen K. N. S. 2020. Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2020, Article ID 6565396, 30 pages.
- Salucci, S., Burattinia, S., , Battistelli, M., Buontempo, F., Canonico, B., Martelli, A.M., Papa, S., Falcieri, E. 2015. Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes, *Journal of Dermatological Science* 80, 61–68.
- Sankaran, N. 2016. The RNA world at thirty: a look back with its author. *J. Mol. Evol.* 83, 169–175.
- Schmidt, A., Gube, M., Schmidt, A. and Kothe, E. 2009. In silico analysis of nickel containing superoxide dismutase evolution and regulation. *J. Basic Microbiol.* 49, 109–118.
- Schulz, R., Emmrich, T., Lemmerhirt, H., Leffler, U., Sydow, K., Hirt, C., Kiefer, T., Link, A., Bednarski, P. J. 2012. Identification of a glutathione peroxidase inhibitor that reverses resistance to anticancer drugs in human B-cell lymphoma cell lines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6712–6715.
- Sergio, D. M., Paola, V.2020. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2020, Article ID 9829176, 32 pages.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F., Morozzi, G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil, *Journal of Chromatography A*, 1054, 113–127.
- Servili M., Selvaggini, R., Taticchi, R., et al. 2003. Volatile Compound and Phenolic Composition of Virgin Olive Oil: Optimization of Temperature and Time of Exposure of Olive Pastes to Air Contact during the Mechanical Extraction Process. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7980-7988.
- Shang-Jun Yin, Zhi-Rong Lü & Daeui Park; Hae Young Chung; Jun-Mo Yang & Hai-Meng Zhou, Guo-Ying Qian; Yong-Doo Park. 2012. Trifluoro ethanol-Induced Changes in Activity and Conformation of Manganese-Containing Superoxide Dismutase. *Appl Biochem Biotechnol* 166:276–288.
- Sharifi-Rad ,M., Kumar, N. V. A., Zucca, P., Varoni, E.M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Fokou, P. V. T., Azzini, E., Peluso,I., Mishra, A. P. Nigam, M., El Rayess, Y., El Beyrouthy, M., Polito , L., Iriti1, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Setzer, W. N., Calina, D., Cho, W. C., Sharifi-Rad, J. 2020. Lifestyle, Oxidative stress and Antioxidants : Back and Forth in the Physiopathology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* 11:694.
- Silva, V.M., Boleta, E.H.M., Lanza, M.G.D.B., Lavres, J., Martins, J.T., Santos, E.F., Santos, F.L.M., Putti, F.F., Furlani Junior, E., White, P.J., Broadley, M.R.,

- Carvalho, H.W.P., Reis, A.R. 2018. Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. *Environ. Exp. Bot.* 150, 172–182.
- Simms, C. L., and Zaher, H. S. 2016. Quality control of chemically damaged RNA. *CMLS* 73, 3639–3653.
- Sinyov, V.V., Sazonova, M.A., Ryzhkova, A.I., Galitsyna, E.V., Melnichenko, A.A., Postnov, A.Y., Orekhov, A.N., Grechko, A.V., Sobenin, I.A. 2017. Potential use of buccal epithelium for genetic diagnosis of atherosclerosis using mtDNA mutations. *Vessel Plus*, 1, 145–150.
- Singh, R.R., Reindl, K.M. Glutathione S-Transferases in Cancer. *Antioxidants* 2021, 10, 701.
- Spika, M. J., Kraljic, K., Koprivnjak, O., Škevin, D., Žanetic, M., Katalinic, M. 2015. Effect of Agronomical Factors and Storage Conditions on the Tocopherol Content of Oblica and Leccino Virgin Olive Oils, *J Am Oil Chem Soc*, 92:1293–1301.
- Spitz, D. R., Hauer-Jensen, M. (2014). Ionizing Radiation-Induced Responses: Where Free Radical Chemistry Meets Redox Biology and Medicine. *Antioxidants & Redox signaling* Volume 20, 1407-1409.
- Srinivasa, P.S., Bryce W.Q. T., Balamurugan, A., Vellayappan., Jeyasekharana, A. D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology* 25, 101084.
- Stadtman, E. R. 1991. Ascorbic-Acid and Oxidative Inactivation of Proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54(6), S1125-S1128.
- Stadtman, E. R. 1993. Oxidation of Free Amino-Acids and Amino-Acid-Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 797- 821.
- Stancu, C.S, Toma, L., Sima, A.V. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* (2012) 349:433–46.
- Starkov A.A., Fiskum G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B.J., Browne, S.E., Patel, M.S., Beal, M.F. 2004. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 24: 7779–7788, 2004.
- Sumer, Z., Yildirim, G., Sumer, H., Yildirim, S. 2013. Cytotoxic and antibacteriial actiivity of the mixture of olive oil and lime cream in vitro conditions; *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 10(4):137-143.
- Tabak, O., Gelisgen, R., Erman, H., Erdenen, F., Muderrisoglu, C., Aral, H., Uzun, H. 2011. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus; *Clin Invest Med* 2011; 34 (3): E163-E171.
- Terzuoli, E., Giachetti, A., Ziche, M., Donnini, S. 2016. Hydroxytyrosol, a product from olive oil, reduces colon cancer growth by enhancing epidermal growth factor receptor degradation. *Mol. Nutr. Food Res*, 60, 519–529.

- Thakur, S., Kumar, Gupta S., Ali, V., Singh, P., Verma, M. 2021. Aldose Reductase: a cause and a potential target for the treatment of diabetic complications, *Arch. Pharm Res*, 44, 655–667.
- Townsend D. M., Tew, K. D., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance *Oncogene* 22, 7369–7375.
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 8, 579-591.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev*, 18, 98–112.
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedò, S., Failla, O., Bassi, D., Serraiocco, A. 2007. Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europea* L.) and correlations with oxidative stability. *Sci Hort* 112(1):108–119.
- Uluata, S., Altuntas, U., Özçelik, B. 2016. Biochemical Characterization of Arbequina Extra Virgin Olive Oil Produced in Turkey, *J Am Oil Chem Soc* 93. 617–626.
- Usanmaz, S., Öztürkler, F., Helvacı, M., Alas, T., Kahramanoğlu, T., Atilla Aşkin, M. 2018. Effects of periods and altitudes on the phenolic compounds and oil contents of olives, cv. Ayvalık. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Science*, 2 (2), 32-39.
- Francisco, C.V.; Ruiz-Fernández, V.; Lahera, F.; Lago, J.; Pino, L.S. Natural Molecules for Healthy Lifestyles: Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 3845–3853.
- Vichi S., A. Castellote, L. Pizzale, et al. 2003. Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Compounds by Headspace Solid-phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography With Mass Spectrometric and Flame Ionization Detection. *J. Chromatogr.* 83: 19-33.
- Vincenzo, A. D., Tana, C., El Hadi, H., Pagano, C., Vettor, R., Rossato, M. 2019. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Metabolic Properties of Tocopherols and Tocotrienols: Clinical Implications for Vitamin E Supplementation in Diabetic Kidney Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5101.
- Visioli, F., Galli, C., Plasmati, E., Viappiani, S., Hernandez, A., Colombo, C., Sala, A. 2000. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress, *Circulation*, 102, 2169–2171.
- Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R., Katan, M. B., 2002. Olive oil phenols are absorbed in humans, *J. Nutr.*, 132, 409–417.
- Viswanathan, V.S., Ryan, M., Dhruv, H.D., Gill, S., Eichhoff, O.M., Seashore-Ludlow, B. 2017. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway, *Nature*, 547, 453.

- Vologodskii, A. 2016. Disentangling DNA molecules. *Phys. Life Rev.* 18, 118–134.
- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, y., Beltrán, G., J. Gaforio, J. 2011. Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells *Nutrients* 2011, 3.
- Wu, J., and Li, Z. 2008. Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 288–292.
- Xiang Li, Shuang Qiu, Jiayuan Shi, Shanshan Wang, Mingfang Wang, Yulin Xu, Zefeng Nie, Chunrong Brandon Griessa, Eric Toma, Frederick Domannb, Melissa Teoh-Fitzgeralda. 2017. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer, *Free Radical Biology and Medicine* 112, 464–479.
- Yazihan, N., Akdasa, S., Olgar, Y., Biriken, D., Turan, B., Ozkaya, M. T. 2020. Olive oil attenuates oxidative damage by improving mitochondrial functions in human keratinocytes; *Journal of Functional Foods* 71, 104008.
- Yana, Z., Hannah R. S. 2020. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise, *Redox Biology* 32, 101508.
- Yang, W.S., Stockwell, N.R. 2014. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation, *Trends in Cell Biology*, 26, 165-176.
- Yıldırım, Ö. 2002. Antioxidant Defense System in Cobalt Treated Diabetic Rat Lung, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16:1, 124-130
- Yıldırım, O., Amirzadeh-Khiabani, N., Ceylan-Ünlüsoy, M., Daş-Evcimen, N., Sarikaya, M., Ertan, R. 2014. Alterations of aldose reductase and superoxide dismutase activities by some chromonyl-2, 4-thiazolidinedione derivatives, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 249-254.
- Yorulmaz, H.O., Konuskan, D.B. 2017. Antioxidant activity, sterol and fatty acid compositions of Turkish olive oils as an indicator of variety and ripening degree. *J. Food Sci. Technol*, 54, 4067–4077.
- Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C., Kang, S.O. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318, 889–896.
- Yu, L., Wang, Y., Wu, Y., Jin, J., Jin, Q., Wang, X. 2021. Chemical and volatile characteristics of olive oils extracted from four varieties grown in southwest of China. *Food Research International* 140, 109987.
- Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., Zhang, S., Huang, Q., Shi, M. 2017. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Molecular Cancer*, 16:79
- Zhitkovich, A. 2020. Nuclear and Cytoplasmic Functions of Vitamin C. *Chem. Res. Toxicol.* 2020, 33, 2515–2526.
- Zhou, D., Shao, L., Spit, D. R. 2014. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Advances in Cancer Research.* 122, 1-67.