T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİN YAPRAĞININ EHRLİCH ASCİTES TÜMÖRÜ TAŞIYAN FARELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Hıdır SULAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1.Kanser 4
2.2. Kanserin Tanımlayıcı Özellikleri 4
2.3. Meme Kanseri 5
2.4. Ehrlich Ascites Tümörü (EAT) 7
2.5. Kanser ve Beslenme 8
2.6. Bitki Çayları 10
2.6.1.Bitki çaylarının hazırlanma yöntemleri 11
2.6.2. Bitki çaylarının kullanımı 12
2.7. Zeytin Yaprağı 13
2.8. Oleuropein 14
3. MATERYAL ve YÖNTEM 16
3.1. Materyal 16
3.2. Yöntem 17
3.2.1. Hayvan deneyleri 17
3.2.2. Zeytin yaprağı çayının hazırlanması ve uygulanması 20
3.2.3. Oleuropein ve 5-Fluorourasilin hazırlanması ve uygulanması 21
3.2.4. Hücre sayısının belirlenmesi 22
3.2.5. Biyokimyasal analizler 22
3.2.5.1. Alanin aminotransferaz aktivitesinin ölçümü 23
3.2.5.2. Aspartat aminotransferaz aktivitesinin ölçümü 23
3.2.5.3. Laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümü 23
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme 24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 25
4.1. Zeytin Yaprağı Çayının Etkileri 25
4.1.1. Koruyucu etki 25
4.1.1.1. Hücre proliferasyonu 25
4.1.1.2. Asit sıvısı hacmi 26
4.1.1.3. Vücut ağırlığı 28
4.1.1.4. Biyokimyasal analizler 29
4.1.2. Tümör inisiyasyonu üzerindeki etki 32
4.1.2.1. Hücre proliferasyonu 32
4.1.2.2. Asit sıvısı hacmi 33
4.1.2.3. Vücut ağırlığı 34
4.1.2.4. Biyokimyasal analizler 35
4.1.3. Tümör büyümesi üzerindeki etki 39
4.1.3.1. Hücre proliferasyonu 40
4.1.3.2. Asit sıvısı hacmi 41
4.1.3.3. Vücut ağırlığı 42
4.1.3.4. Biyokimyasal analizler 44
4.2. Oleuropeinin Etkileri 48
4.2.1. Koruyucu etki 48
4.2.1.1. Hücre proliferasyonu 48
4.2.1.2. Asit sıvısı hacmi 49
4.2.1.3. Vücut ağırlığı 50

4.2.1.4. Biyokimyasal analizler....51
4.2.2. Tümör inisiyasyonu üzerindeki etki....55
4.2.2.1. Hücre proliferasyonu....56
4.2.2.2. Asit sıvısı hacmi....57
4.2.2.3. Vücut ağırlığı....58
4.2.2.4. Biyokimyasal analizler....59
4.2.3. Tümör büyümesi üzerindeki etki....62
4.2.3.1. Hücre proliferasyonu....63
4.2.3.2. Asit sıvısı hacmi....64
4.2.3.3. Vücut ağırlığı....65
4.2.3.4. Biyokimyasal analizler....66
4.3. Genel Değerlendirme ve Tartışma....71
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER....78
KAYNAKLAR....80
EKLER 88
EK 1. Etik kurul onay belgesi....88

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİN YAPRAĞININ EHRLİCH ASCİTES TÜMÖRÜ TAŞIYAN FARELER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Hıdır SULAK

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice AKTAŞ
Yıl: 2022, Sayfa: 89

Dünyada ve ülkemizde, kadınlarda görülme sıklığı ve ölüm oranı bakımından meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla meydana gelir. Meme kanserinin tedavisi için genel olarak kemoterapi, radyoterapi, hormon terapi ve cerrahi uygulanmaktadır. Ancak, kanserden korunma veya kanserin tedavisi için özellikle bitkisel preparasyonların kullanıldığı çeşitli tamamlayıcı/alternatif tıp yöntemlerine ilgi yüksektir. Bu uygulamalar umut vaat etmekle birlikte doğrulukları bilimsel olarak test edilmelidir. Zeytin yaprağı, Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde geleneksel ilaçlarda yaygın olarak yer almaktadır. Zeytin yaprağı, içerisindeki etken maddeler nedeniyle pek çok hücresel metabolik aktiviteye sahiptir. Bu tez çalışmasında amacımız, zeytin yaprağının, deneysel meme kanser modeli olan Ehrlich asit tümörü (EAT) taşıyan farelerde hücre çoğalması üzerindeki etkilerini incelemek ve bu hayvanlarda hücre veya doku hasarı oluşturup oluşturmadığını biyokimyasal olarak araştırmaktır. Bu amaçla deney gruplarındaki hayvanlara EAT inokülasyonu yapılmış; 6, 8 veya 15 gün süreyle 400 mg/kg/gün zeytin yaprağı çayı (ZY) veya 150 mg/kg/gün oleuropein (OL) oral yolla uygulanmıştır. Kemoterapi ajanı 5-fluorourasil pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Uygulama sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan EAT hücre ve karaciğer doku örnekleri toplanmıştır. Tripan mavisi kullanılarak canlı EAT hücre sayısı belirlenmiş ve asit sıvısı hacmi ölçülmüştür. Karaciğer örneklerinde ise hasar belirteci olan alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim düzeyleri tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre ZY, tümör oluşmadan önce kullanılmaya başlandığında meme kanserine karşı koruyucu etki yapabilmektedir. Ancak tümör teşhis edildikten sonra tek başına kullanıldığında tedavi edici etki göstermemiştir. ZY, bir kemoterapi ajanıyla birlikte kullanıldığında ilacın aktivitesi üzerinde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir. Oleuropein, zeytin yaprağı sulu ekstraktında en yüksek miktarda bulunan bileşendir. Ancak yapılan analizlerde ZY'nin sergilediği koruyucu etkinin OL'den kaynaklı olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca tümör teşhis edildikten sonra OL uygulaması, hücre çoğalmasını teşvik ederek tümör büyümesini hızlandırmıştır. Üstelik OL, kemoterapi ajanıyla birlikte uygulandığında ilacın etkinliğini baskılamıştır. ZY ve OL sağlıklı farelerde karaciğer hasarı oluşturmamıştır. EAT taşıyan bireylerde ALT ve AST düzeylerini iyileştirmiş, LDH düzeyini yükseltmiş veya etkilememiştir. ZY, saf oleuropeinden daha yüksek inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Sonuç olarak, zeytin yaprağı çayının sağlıklı bireyler tarafından düzenli günlük tüketimiyle meme kanserine karşı koruyucu etki gösterebileceği belirlenmiştir. Ancak meme kanseri teşhisi alan bireylerde özellikle oleuropeinin kullanımı konusunda dikkatli olunmalı, klinisyen önerilerine uyulmalıdır.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin yaprağı çayı, Ehrlich asit tümörü, antikanser aktivite, oleuropein, hepatoprotektif etki

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF OLIVE LEAF ON EHRLICH ASCITES TUMOR BEARING MICE

Hıdır SULAK

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Hatice AKTAŞ
Year: 2022, Page: 89

In the world and our country, breast cancer ranks first in terms of incidence and mortality in women. Breast cancer occurs when cells in the breast tissue multiply continuously and uncontrollably. Chemotherapy, radiotherapy, hormone therapy, and surgery are generally used to treat breast cancer. However, there is a high interest in various complementary/alternative medicine methods in which herbal preparations are used, especially for cancer prevention or treatment of cancer. Although these applications are promising, their accuracy should be scientifically tested. Olive leaf is widely used in traditional medicine in European and Mediterranean countries. Olive leaf has many cellular metabolic activities due to their active ingredients. In this thesis, our aim is to examine the effects of olive leaf on cell proliferation in mice with Ehrlich ascites tumor (EAT), an experimental model for breast cancer, and to biochemically investigate whether it causes cell or tissue damage in these animals. For this purpose, EAT cells were inoculated to the animals in the EAT control and experimental groups; 400 mg/kg/day of olive leaf tea (ZY) or 150 mg/kg/day of oleuropein (OL) was administered orally for 6, 8, or 15 days. Chemotherapy agent 5-fluorouracil was used as a positive control. EAT cell and liver tissue samples were collected from the sacrificed animals at the end of the application. The number of viable EAT cells was determined using trypan blue, and the ascites fluid volume was measured. In liver samples, on the other hand, enzyme levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) enzymes were detected. According to the data obtained, ZY might have a protective effect against breast cancer when used before the tumor occurs. However, it did not show a therapeutic effect after the tumor was diagnosed when used alone. ZY did not cause any change in the activity of the chemotherapy agent when combined with it. Oleuropein is the most abundant component in olive leaf aqueous extract. However, as a result of the analysis, it was understood that the protective effect of ZY was not caused by OL. In addition, OL administration after tumor diagnosis accelerated tumor growth by promoting cell proliferation. Moreover, OL suppressed the drug's efficacy when administered with the chemotherapy agent. ZY and OL did not cause liver damage in healthy mice. They cured ALT and AST levels, increased or did not affect LDH levels in individuals with EAT. ZY showed higher ameliorating activity than oleuropein. In conclusion, it has been determined that olive leaf tea can have a protective effect against breast cancer through regular daily consumption by healthy individuals. However, should be careful about using oleuropein in individuals diagnosed with breast cancer, and clinician recommendations should be followed.

KEYWORDS: Olive leaf tea, Ehrlich ascites tumor, anticancer activity, oleuropein, hepatoprotective effect

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, aşırı sabır ve özveri gösteren her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Hatice AKTAŞ 'a,

Tez çalışmamın biyokimyasal analizlerinde bilgi ve tecrübeleri ile yardım ve desteğini esirgemeyen Adıyaman Üniversitesi Akedemik kadrosunda bulunan değerli hocalarım Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA, Doç. Dr. Ertan YOLOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Miraç UÇKUN'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Hüda AYAN, Melike TANRIVERDİ ve Şilan GÖZENOĞLU'na,

Her zaman bana destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin sahip olduğu özellikler 5
Şekil 2.2. Sağlıklı (solda) ve Ehrlich ascites tümörü taşıyan (sağda) fareler 8
Şekil 3.1. Yaprak örneklerinin alındığı zeytin ağacı ve herbaryum örneği 20
Şekil 3.2. Oleuropein ticari ambalajı ve kimyasal yapısı 21
Şekil 3.3. 5-Fluorourasil ticari ambalajı ve kimyasal yapısı 21
Şekil 4.1. Zeytin Yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı. 26
Şekil 4.2. Zeytin Yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen asit sıvısı hacmi. 27
Şekil 4.3. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 28
Şekil 4.4. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri. 30
Şekil 4.5. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri. 31
Şekil 4.6. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri. 32
Şekil 4.7. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı. 33
Şekil 4.8. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden toplanan asit sıvısı hacmi. 34
Şekil 4.9. EAT taşıyan ve 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 35
Şekil 4.10. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri. 37
Şekil 4.11. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri. 38
Şekil 4.12. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri. 39
Şekil 4.13. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı 41
Şekil 4.14. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi 42
Şekil 4.15. EAT taşıyan ve 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 43
Şekil 4.16. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri. 45
Şekil 4.17. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri. 46
Şekil 4.18. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri. 47
Şekil 4.20. 15 gün süreyle 150 mg/kg/gün oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata). 49

Şekil 4.21. 15 gün süreyle 150 mg/kg/gün oleuropein verilmiş farelerden elde edilen asit sıvısı hacmi. 50
Şekil 4.22. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 51
Şekil 4.23. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri. 53
Şekil 4.24. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri. 54
Şekil 4.25. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri. 55
Şekil 4.26. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı. 56
Şekil 4.27. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin peritonu içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml). 57
Şekil 4.28. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 58
Şekil 4.29. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri. 60
Şekil 4.30. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri. 61
Şekil 4.31. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri. 62
Şekil 4.32. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı 64
Şekil 4.33. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml). 65
Şekil 4.34. EAT taşıyan ve 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin ortalama vücut ağırlıkları. 66
Şekil 4.35. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri. 68
Şekil 4.36. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri. 69
Şekil 4.37. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri. 70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Deney grupları 19
Çizelge 4.1. Zeytin yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (±standart hata). 26
Çizelge 4.2. Zeytin Yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata) 27
Çizelge 4.3. Zeytin yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 29
Çizelge 4.4. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standard hata). 33
Çizelge 4.5. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata). 34
Çizelge 4.6. Zeytin yaprağı çayının tümör inisiyasyonu üzerinde etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 36
Çizelge 4.7. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata). 40
Çizelge 4.8. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata) 42
Çizelge 4.9. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 44
Çizelge 4.10. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata) 48
Çizelge 4.11. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (± standart hata). 49
Çizelge 4.12. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 52
Çizelge 4.13. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı 56
Çizelge 4.14. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin peritonu içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml). 57
Çizelge 4.15. Oleuropeinin tümör inisiyasyonu üzerinde etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 59
Çizelge 4.16. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı 63
Çizelge 4.17. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml). 65
Çizelge 4.18. Oleuropeinin tümör büyümesi üzerindeki etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata). 67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU	5-Fluorourasil
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
EAT	Ehrlich Asit Tümörü
EMA	Avrupa Sağlık Ajansı
HBSS	Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi
LDH	Laktat dehidrogenaz
OL	Oleuropein
ZY	Zeytin yaprağı çayı

1. GİRİŞ

Kanser, çeşitli sebeplerle değişime uğrayan bir hücrenin kontrol edilemeyecek şekilde çoğalmaya başlamasıyla meydana gelen bir hastalıktır. (Bacac ve Stamenkovic, 2008). Kanser hastalığı, her yıl dünya çapında yaklaşık 8.2 milyon kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır (Stewart ve Wild, 2014). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) verilerine göre meme kanseri ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanserdir (IARC, 2022). Kanserin erken teşhisi ve etkin tedavi yöntemlerinin bulunması için araştırmalar hızla devam etmekle birlikte kansere hiç yakalanmamayı sağlayacak koruyucu önlemlerin alınması hem sağlık hem de ülke ekonomisi açısından önemlidir. Birçok kanser türü için beslenme önemli bir risk faktörüdür. Bu nedenlerle doğru besinleri doğru miktarlarda tüketmek yaşamın sağlıklı bir şekilde sürdürülmesini sağlayabilir.

Antik çağlardan bugüne barışın sembolü olarak kabul edilen zeytin ağacından elde edilen ürünler, çoğunlukla zeytin ağaçlarının doğal olarak yetiştiği Akdeniz ülkelerinde hem gıda hem de tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Özellikle zeytin yaprağı Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde geleneksel ilaçlarda yaygın olarak bulmaktadır. Avrupa Sağlık Ajansı'nın (EMA) 2011 yılında yayınladığı rapora göre zeytin yapraklarının İspanya, İtalya, Fransa ve Almanya'da geleneksel ilaç, Slovakya'da ise ticari ilaç olarak kullanım kaydı bulunmaktadır (EMA, 2011). Zeytin yaprağının hipotansif, antiaritmik, antiaterosklerotik (Somova ve ark., 2003; Somova ve ark., 2004), antidiyabetik (Al-Attar ve Alsalmi, 2017), vazodilatatör, antimikrobiyal (Sudjana ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010), antiviral (Lee-Huang ve ark., 2003; Micol ve ark., 2005), anti-kanser (Boss ve ark., 2016) ve antiinflamatuvar etkinliği olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, ham zeytin yaprağı özütünün ve zeytin yaprağından elde edilen polifenollerin meme, mesane, mezotelyoma ve lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptoz indükleyici (Goulas ve ark., 2009; Fares ve ark., 2011; Samet ve ark., 2014) etkiler sergilediği gösterilmiştir. Aquaviva ve ark. (2012), zeytin yaprağında da bulunan bir bileşik olan oleuropeinin

prostat kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Başka bir araştırmada, zeytin yaprağı ekstraktının MCF-7 meme ve T-24 mesane kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiğini bildirilmiştir (Goulas ve ark., 2009). Samet ve ark. (2014), zeytin yaprağı ekstresinin K562 hücrelerinde apoptozu indüklemesinin yanı sıra hücrelerin monosite/makrofaja farklılaşma sürecini başlattığını da bulmuşlardır. Fares ve ark. (2011), zeytin yaprağı ekstresinin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu, insan lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya çıkarmışlardır.

Bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen fenolik bileşenler, bitkilerde tat ve kokunun oluşturulmasının yanı sıra renk oluşumu ve değişimi reaksiyonlarına neden olurlar (Acar, 1998). Ayrıca insan ve hayvan sağlığı için de önemli bileşiklerdir. Antioksidan, fitoöstrojenik ve antimikrobiyal etkiler ile çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Patel ve diğ., 2004). Oleuropein, zeytin ağacında bulunan (Duke, 1992), zeytine ve zeytin yağına acı tadı veren fenolik bileşendir (sekoiridoid) (Ozdemir ve ark., 2014). Günümüze dek yapılan çalışmalarla oleuropeinin antioksidan, vazodilatör (Duke, 1992), aritmiyi önleyici, spazm giderici, tansiyon düşürücü (Wagner ve Wolf, 1977) ve antimikrobiyal (Harborne ve ark., 1999), etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca bileşiğin sitotoksik etkileri ve antikanser aktivitesi üzerinde de çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Seçme ve ark. (2016), SH-SY5Y nöroblastoma hücre soyu ile yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre bu hücre soyunda oleuropeinin hücre döngüsünün durmasına neden olduğu; anti apoptotik genleri inhibe, proapoptotik genleri ise aktive etmek suretiyle apoptozu uyardığı bildirilmiştir (Seçme ve ark., 2016). Başka bir çalışmada oleuropeinin meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) östrojenin indüklediği proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Sirianni ve ark., 2010). Ancak literatür taramasında zeytin yaprağı çayının Ehrlich asit tümörü taşıyan farelerde oluşturduğu etkiler konusunda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kanser çalışmalarında *in vitro* hücre modellerinin yanı sıra *in vivo* tümör modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Bu modeller arasında Ehrlich Ascites Carcinoma sıklıkla kullanılan bir modeldir (Okay, 1998). Spontan olarak ortaya

çıkan fare meme adenokarsinomundan kökenlenen Ehrlich asit tümörü (EAT), 1905 yılından bugüne seri pasajları yapılarak önce katı daha sonra sıvı (asit) formda üretilmiştir. Günümüzde deneysel tümör modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Farelerin periton boşluğunda süspansiyon halde çoğalan EAT hücreleri fareden fareye intraperitonal enjeksiyon ile aktarılırlar. Transplante edilebilme oranı çok yüksektir (yaklaşık %100), regresyon göstermez, çok kısa yaşama sürelidir ve %100 ölüm gerçekleşir (Kaleoğlu ve İşli, 1977). EAT hücreleri hızlı hücre bölünmeleri geçirerek sayılarını arttırırlar. Artan hücre sayısı ile birlikte asit sıvısı da farenin periton boşluğunu doldurur. Belirli bir süre sonra hayvan, periton içi basıncın etkisi ve tümörün oluşturduğu hasar sonucu kaybedilir.

Bu tez çalışmasında amacımız, son zamanlarda oldukça popüler bir içecek haline gelen zeytin yaprağı çayının, Ehrlich asit tümörü (EAT) taşıyan farelerde hücre çoğalması üzerindeki etkilerini incelemek ve bu hayvanlarda doku hasarı oluşturup oluşturmadığını biyokimyasal olarak araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

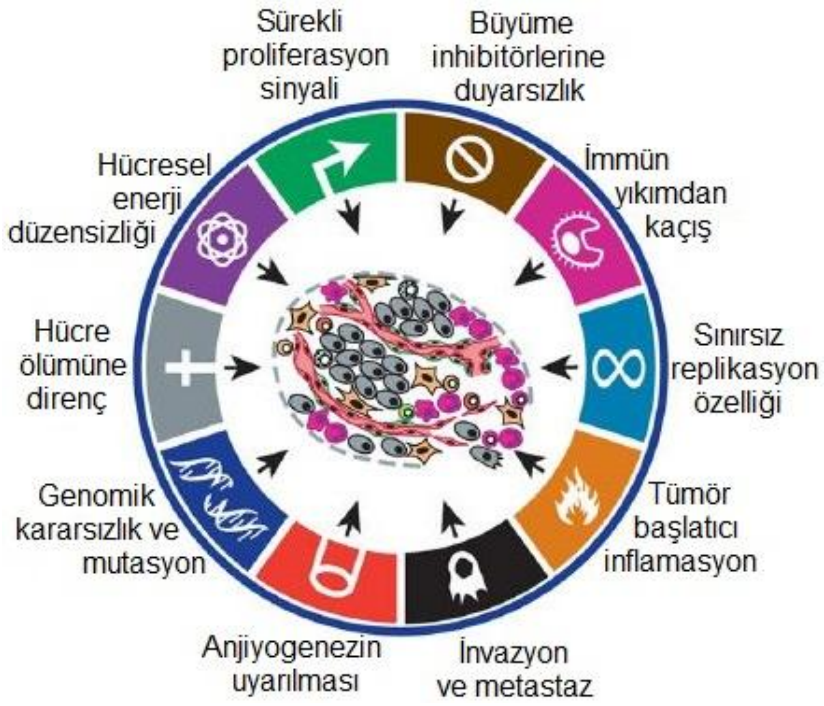
2.1.Kanser

Kanser, kontrolsüz şekilde bölünüp çoğalan hücrelerin oluşturduğu bir hastalıklar grubudur. Kökenlendiği organın yanısıra metastaz yaparak uzaktaki organları ve tüm organizmayı etkiler. Her birey farklı bir genetik yapıya sahiptir ve bu nedenle kanser, bireye özgü bir hastalıktır. Dolayısıyla her kanser türü için farklı tedavi yöntemleri kullanılabilmektedir. Bugüne kadar kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi, cerrahi çıkarım, immünoterapi, hormon terapisi, hedeflenmiş terapiler ve gen terapisi gibi birçok tedavi yöntemi geliştirilmiş olup bunlar tek başına veya birlikte ya da ardışık olarak uygulanabilmektedir (Fitzmaurice ve ark., 2013; Pavlopoulou ve ark., 2015). Ancak sosyal ve psikolojik etkilerinin yanısıra kanserin teşhis ve tedavisi hem bireylere hem de kamu kurumları ile devletlere çok yüksek bir mali yük getirmektedir. Bu nedenle beslenme rejiminin düzenlenmesi ya da değiştirilmesi gibi basit önlemlerle kanserin önlenmesi ve/veya kanserli bireylerin sağ kalımlarının arttırılmasının bu sorunları çözümüne yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2.2. Kanserin Tanımlayıcı Özellikleri

Kanser, vücuttaki herhangi bir hücrenin çeşitli etkenlerle büyüme ve bölünme kontrolünü kaybetmesiyle ortaya çıkar. Sağlıklı hücrelerin bölünmesi için büyüme faktörleri gereklidir. Kanser hücrelerini, sağlıklı hücrelerden ayıran bir özellik; gerekli büyüme faktörlerini kendilerinin üretebiliyor olmasıdır. Aynı zamanda büyüme faktörü inhibitörlerini tanımaz ve cevap oluşturmazlar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Lodish, 2011). Sağlıklı bir hücrede, DNA hasarı, tamir mekanizmaları tarafından onarılır. Bu süre zarfında hücre döngüsü durdurulur. Oluşan hasar düzeltilemiyorsa hücre apoptoza yönlendirilir. Fakat, normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşme sürecinde, DNA hasarı oluştuktan sonra, hücre döngüsü tamir ve kontrol mekanizmalarının görev yapamadığı durumlarda, DNA

hasarı tamir edilemeyebilir. Bunun sonucu olarak proliferasyon, kanser hücresi lehine sürecektir. (Bartek ve ark., 1999). Hücre hücre sayısı arttıkça besin ve oksijen ihtiyacı artar. Bunu karşılamak için tümör anjiyogenez faktörleri üretir (Porter, 2006). Bu sayede yeni kan damarlarının oluşumu sağlanır ve kanser hücresinin yeterli besin ve oksijen ihtiyacı karşılanır (Bertram, 2000). Bunlardan başka kanser hücrelerinde genom stabilitesi kaybedilmiştir. Biriken mutasyonlar yeni hücrelere aktarılır. Hücre bölünmesi sırasında kromozomlarda telomer kısalması gerçekleşmez, dolayısıyla sonsuz defa replike olabilirler. İmmün sistem cevabından kaçarlar. Hücresel enerji metabolizmaları değişmiştir. Hücreler arasındaki ve hücre ile hücre dışı matriks arasındaki adezyon moleküllerinin bozulmasıyla hücre dışı matriksin sindirilmesi sonucu çevre dokulara yayılarak metastaz yaparlar (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin sahip olduğu özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2011)

2.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en fazla görülen kanserdir. Ülkemizde, kadınlarda görülen tüm kanserlerin %23.9' undan ve kansere bağlı ölümlerin %15.1'inden sorumludur (IARC, 2022).

Meme kanserinin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genel olarak genetik, çevresel, hormonal ve psikososyal etkenlerin rol oynadığı belirtilmiştir. Meme kanseri için risk faktörleri arasında ilk sırada gelen cinsiyet, 100 kat artmış riski ifade eder. Ek olarak, ileri yaş da önemli bir risk faktörüdür. Östrojen hormonuna maruz kalınan süre, gebelik yaşı, gebelik sayısı, emzirme gibi etkenler de meme kanseri için önemli risk faktörleridir (Rosner ve ark., 1994). Bazı kaynaklarda, meme kanserinin görülme oranının kıyaslanma yapıldığında siyah ırkta beyaz ırka göre daha az olduğu; ama siyah ırkta daha agresif seyrettiği ve mortalite oranlarının her yaşta daha yüksek olduğu bildirilmiştir (American Cancer Society, 2020). Sağlık Bakanlığı verileri incelendiğinde ülkemizde meme kanseri görülme sıklığının batı illerinde doğuya oranla yaklaşık 2 kat fazla olduğu dikkati çekmektedir. Bu farkın, bölgeler arasındaki yaşam tarzı farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Özmen ve ark., 2009). Diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de beslenme ve yaşam tarzının bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir. Shield ve ark. (2016), meme kanseri riskinin alkollü içeceklerin tüketim miktarı ile doğru orantılı olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, artan alkol alımı ile östrojen reseptörü pozitif meme kanseri gelişimi arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Suzuki ve ark.,2005). 2009 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, hiç alkol tüketmeyen kadınlarla kıyaslandığında, haftada üç veya dört kadeh alkol alan kadınlarda riskin %15 daha fazla olduğu saptanmıştır (Allen ve ark., 2009). Bunların dışında obezite de meme kanseri için bir risk faktörüdür. Aşırı kilolu kadınlarda menopoz sonrası dönemde meme kanseri daha sık görülmektedir (Mahoney ve ark., 2008).

Meme kanseri vakalarının yaklaşık %5 ila 10'unun ailesel geçişli olduğu bildirilmektedir. Kalıtsal meme kanseri ile ilgili olan genler arasında ilk sırada *BRCA1, BRCA2, TP53* ve *PTEN* sayılabilir. *BRCA1* ve *BRCA2,* kalıtsal meme ve over kanseri (HBOC) sendromu; *TP53,* LiFraumeni sendromu ve *PTEN* ise Cowden sendromunda öne çıkmaktadır (Petrucelli ve ark., 1998).

Meme kanserinin tedavisi için klinikte 5-fluorourasil, dosetaksel, paklitaksel, doksorubisin ve tamoksifen gibi çeşitli kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2016). Bu ilaçlar arasında timidilat sentaz enzim inhibitörü olan 5-

fluorourasil, hem DNA hem de RNA sentezini bozarak etkisini göstermektedir (Longley ve ark., 2003). En çok reçete edilen ilaçlardan biri olan Tamoksifen, ilerlemiş meme kanserinin tedavisi için kullanılmaktadır (Barker, 2006). Tamoksifen östrojen reseptör blokeridir, kaspaz aktivasyonunun ardından oksidatif strese neden olarak apoptotik etki yapmaktadır (Mabuchi ve ark., 2004; Zhoua ve ark., 2005).

2.4. Ehrlich Ascites Tümörü (EAT)

Meme kanseri çalışmaları için kullanışlı bir deneysel tümör modeli olan Ehrlich Ascites Tümörü (EAT), ilk kez 1905 yılında dişi bir farede spontan olarak ortaya çıkan meme adenokarsinomudur. Ehrlich ve Apolant, tümör parçalarını farelerin deri altına naklederek deneysel tümör haline getirmiştir (Aktaş, 1996; Afacan, 2006; Taşkın, 2002; Ekinci, 2000). Bu tümörün sıvı formu, 1932 yılında Loewenthal ve Jahn tarafından elde edilmiştir (Baillif, 1954; Afacan, 2006). Orjinal Ehrlich tümörü hiperdiploid iken 1953 yılında tetraploid kromozom sayısına sahip bir alt soy elde edilmiştir (Turna, 2008; Afacan, 2006). Lettre yaptığı çalışmalarla hem ikinci dünya savaşı esnasında bu tümörün devamlılığını sağlamış, hem de tümörü kalitatif ve kantitatif açısından kanser araştırmaları için ideal bir test sistemi haline getirmiştir (Ekinci, 2000). EAT, transplante edilebilme oranı fazla olan, hızlı çoğalan, kısa süre içerisinde %100 ölüme götüren bir tümördür (Kaleoğlu, 1977). EAT hücreleri deney hayvanının peritonu içerisine enjekte edilirse sıvı, deri altına enjekte edilirse katı formda tümör oluşumu meydana gelmektedir (Turna, 2008; Afacan, 2006). Hücrelerin peritona enjeksiyonu sonrası oluşan asit (ascites) sıvısı, açık sarı-beyaz bazen hafif kanlı görüntü sergileyen derişimi yüksek bir sıvıdır ve 0.1 ml'de yaklaşık 10 milyon EAT hücresi içerir (Aktaş, 1996). EAT hücreleri, farelerin periton boşluğunda süspansiyon halinde sayılarını arttırırlar ve in vitroda yapay yüzeylere yapışmazlar (Afacan, 2006). Pasaj yapıldıktan 4-6 gün sonra asit oluşmaya başladığı tepit edilebilir (Şekil 2.2). Toplam 5-12 cc asit oluşur (Aktaş, 1996; Kaleoğlu, 1977). Sıvı EAT, özellikle kemoterapide kullanılan bazı ilaçların tümörler üzerindeki etkilerinin araştırılmasında sıkça kullanılan bir tümör modelidir (Ekinci, 2000).



Şekil 2.2. Sağlıklı (solda) ve Ehrlich ascites tümörü taşıyan (sağda) fareler

2.5. Kanser ve Beslenme

Beslenmenin, kanser riskine katkıda bulunan en önemli faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Bingham ve Riboli, 2004). Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü tarafından hazırlanan bir raporda, doğru beslenme ve fiziksel aktivite ile uygun vücut kütlesinin korunmasının zaman içinde kanser insidansını %30-40 oranında azaltabileceği tahmin edilmektedir (World Cancer Research Fund, 2018). Özellikle aşırı kilo ve obeziteye neden olan beslenme faktörlerinin farklı kanserlerde morbidite ve mortaliteyi etkilediğine dair epidemiyolojik kanıtlar bildirilmiştir (Zitvogel ve ark., 2017). Diyet bileşenleri, vücut kompozisyonu (yağ / kas oranı) ve fiziksel aktivite seviyeleri ile ilgili beslenme faktörlerinin, kanser hücrelerinin temel özellikleri üzerinde etkili olabileceği rapor edilmektedir (Wiseman, 2019). Ayrıca bitkiler tarafından salgılanan bazı organik pestisitler, çeşitli metabolitler, besinlerde çoğalan küfler tarafından üretilen sekonder metabolitler (okratoksin, aflatoksinler vb.) ile besin hazırlama ve

muhafaza etme yöntemleri de kansere sebebiyet verebilmektedir (Bode ve Dong, 2015).

Bilim insanları, obezite ile çeşitli organ kanserleri arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada, kanserden genel ölüm riskinin vücut kitle indeksi (VKİ) 40 kg/m^2'yi aşan erkeklerde 1.52, kadınlarda ise 1.88 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmiştir (Calle ve ark., 2003). Obezite ve aşırı besin alımı, karaciğer, kolon, pankreas, yağ gibi birçok farklı dokuyu aynı anda etkileyerek esterifiye olmamış yağ asidi, insülin, glukoz ve leptin ile inflamatuar sitokin düzeylerinde sistemik bir artışa; adiponektin düzeylerinde ise azalmaya neden olmaktadır. Bu dengesizlikler, kanser hücresinin sağ kalımını, çoğalmasını ve malign karaktere ilerlemesini doğrudan destekleyebilir (Font-Burgada ve ark., 2016).

Obezite hem menopoz onrasında hem de menopoz öncesinde kadınlarda meme kanseri gelişme ve tekrarlama riskini artırmakta, ayrıca sağkalımı olumsuz yönde etkilemektedir. Rafine nişasta, şeker, doymuş ve trans-doymuş yağ alımının yüksek; omega-3 yağ asitleri, doğal antioksidanlar ve lif alımının ise düşük olmasıyla karakterize edilen kötü beslenme alışkanlıkları inflamasyonu ortaya çıkararak meme kanseri ve ölüm riskinin artmasıyla bağlantılı olabilir (Seiler ve ark., 2018).

Dünya Sağlık Örgütü bünyesinde yer alan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yapılan kanserojen sınıflamasına göre grup 1'de yer alan alkol, tüm kanserlerin %2-3'ünden sorumludur (Doll ve Peto, 1981; American Institute for Cancer Research, 1997). Alkolün özellikle ağız, yutak, gırtlak, yemek borusu ve karaciğer kanserlerine neden olabileceği, kolorektal ve meme kanseri riskini arttırabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, alkol alımı ile meme kanseri riskinin yaklaşık olarak lineer bir şekilde arttığını, günde yaklaşık 30 g alkol (yaklaşık 3 ünite) alımının meme kanseri riskini yaklaşık %20 oranında arttırabileceğini göstermiştir. Alkolün meme kanseri riski ile ilişkisinin mekanizması netlik kazanmamakla birlikte alkolün endojen östrojen seviyelerini arttırması olabileceği düşünülmektedir (Key ve ark., 2003). Besinlerin

emilim ve metabolizması ile hormon seviyelerini değiştirebilen alkol, DNA tamirini ve immün fonksiyonları olumsuz etkileyebilmektedir. Aynı zamanda, karsinojenlerin detoksifikasyonunu da engeller (Bandera ve Kushi, 2006).

Diyetle tüketilen karbohidratların kalitesi ve miktarı, [glisemik indeks (GI) ve glisemik yük (GL)], tokluk glikoz seviyelerinin ve dolayısıyla dolaşımdaki insülin seviyelerinin en önemli belirleyicileridir. Dolaşımdaki yüksek insülin düzeyleri ve insülin emsali büyüme faktörü 1 (IGF-1), tip 2 diyabet ile ilişkilidir. Aynı zamanda bir kişinin potansiyel olarak meme kanserine yakalanma riskini arttırabilir. Meme kanseri olan bireyde ise tümör büyümesi ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı da bildirilmiştir. Yüksek GI'ye sahip bir diyet, kandaki tokluk serum glukoz düzeylerini ve insülin konsantrasyonlarını artırır. Meme dokularındaki insülin reseptörlerinin uyarılması ve/veya IGF-1'in biyoaktivitesinin artması, hücre proliferasyonunu uyararak meme kanseri riskini etkileyebilir (Jenkins ve ark., 2002; Rose ve Vona-Davis, 2012; Belardi ve ark., 2013).

2.6. Bitki Çayları

Bitkiler, topraktan aldıkları sudaki organik ve inorganik maddeleri kendi canlılığını sürdürmek için yararlanacağı bileşiklere dönüştürmektedir. Bu bileşikler aynı zamanda insan vücudunun işlevlerini sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesi için gerekli olan temel öğelerin de en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Besin olarak doğrudan tüketilemeyen bitkilerden çay yoluyla faydalanılabilmektedir. Günümüzde sağlık üzerine faydalı etkilerinin bulunması ve tadının güzel olması sebebiyle bitkilerden hazırlanan çaylar yaygın şekilde tüketilmektedir. (Yeşilada, 2011). Canı (2018)'ya göre Avrupa Farmakopesi, bitki çaylarını, "Ağızdan alıma yönelik olarak kullanılmadan hemen önce bir veya daha fazla bitkisel drogun infüzyon, dekoksiyon ya da maserasyonu yoluyla hazırlanan sulu preparatlardır" olarak tanımlamaktadır. Bu tanımla da uyumlu olarak bitki çayları, bitkilerin kurutulmuş ya da taze haldeki toprak üstü (yaprak, çiçek, kabuk, meyve, tohum, vb.) veya toprak altı (kök, rizom, yumru, vb.) kısımlarının sıcak su içerisinde demlenerek (infüzyon), kaynatılarak (dekoksiyon) veya oda sıcaklığında bekletilerek (maserasyon) hazırlanması ile elde

edilir (Turgul ve ark., 2019). Bitki çayları, antioksidan özellik taşıyan biyoaktif bileşenler ve kateşinler, flavonoller, flavonlar ve fenolik asitler gibi çok çeşitli kimyasal bileşikler içerir ve hastalıklardan korunmaya yardımcı olur (Çağındı ve ark., 2008; Poswal ve ark.,2019). Bitki çaylarının çeşitli tıbbi yararları bildirilmiştir. Bunlar arasında; mental olarak sakinleşmek ve rahatlamak, kalp sağlığını desteklemek, mide ve sindirim sorunlarına yardımcı olmak, vücudu detoksifiye etmek, enerji ve zindelik sağlamak, sinir sistemini desteklemek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, antioksidan sağlamak, soğuk algınlığından korumak ve uykuya geçişe yardımcı olmak sayılabilir (Ravikumar, 2014).

2.6.1.Bitki çaylarının hazırlanma yöntemleri

Bitkiler, metabolizma olayları sonucunda ürettikleri bileşenlerin biyolojik etki kuvvetlerine göre kuvvetli etkili, orta etkili ve zayıf etkili bitkiler olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Kuvvetli etkili bitkilerin içerdiği bileşenler, kuvvetli biyolojik etkiye sahiptir. Bu nedenle bu bitkilerin çay olarak tüketilmesi tehlikelidir. Orta etkili bitkiler ise ideal miktar ve sıklıkta kullanıldığında zararlı değilken uzun süre ve aşırı miktarlarda kullanılmaları halinde olumsuz etkilere yol açabilir. Zayıf etkili bitkilerin önerilen miktarlarda uzun sürelerle kullanılması herhangi bir olumsuz etki oluşturmaz. Çay olarak tüketilecek bitkiler seçilirken, bünyesinde bulundurduğu bileşenlerin kuvvet derecesi ve biyoaktivitesi göz önüne alınmalıdır (Yeşilada, 2011).

Bitki çayları, kaynatma, infüzyon veya maserasyon yöntemi ile hazırlanan ve ağızdan tüketime yönelik bir veya daha fazla bitkisel maddeden oluşmaktadır. Genellikle kullanımdan hemen önce hazırlanır. Ancak son yıllarda servise hazır şişelenmiş bitkisel içecekler de popüler hale gelmiştir. Çay formülasyonlarında bütün olarak kurutulmuş bitki kısımları kullanılabilir. Aynı zamanda kullanılan bitkisel madde(ler) önceden kurutma, ufalama ve ezme yoluyla işlenerek kurutulmuş toz, süzen poşetler içindeki kurutulmuş parçacıklar, granüller ve doğrudan tüketilebilen çözeltiler gibi farklı formlarda da olabilir (Chandrasekara ve Shahidi, 2018). Hangi formda olursa olsun, bitki çayları hazırlanırken belirli etkenlere dikkat edilmelidir. Kullanılan kabın ve suyun kalitesi, hazırlama yöntemi, süresi ve kullanılan oranlar

önemlidir. Kaliteli porselen kaplar tercih edilmeli, uçucu yağların korunabilmesi için kabın kapaklı olması gerekmektedir. Suyun kalitesi de bitki çaylarının kalitesini ve etkinliğini etkilemektedir. Taze kaynatılmış yumuşak içme suyu en uygun seçimdir. Bitki çayının hazırlama yöntemi (infüzyon, dekoksiyon veya maserasyon) kullanılan materyale göre seçilmelidir. Demleme süresi 5-15 dakika arasında olmalıdır. Çayın derişimi de çayın kalitesini ve etkinliğini etkilemektedir. Hafif etki için %2, kuvvetli etki için ise %5 derişim uygulanması tavsiye edilmektedir (Yeşilada, 2011).

Demleme (infüzyon) yöntemiyle çay hazırlamak için, bitki üzerine, 85-90°C sıcaklıkta su ilave edilerek kabın ağzı kapatılır. Belirli bir süre bekletildikten sonra süzgeçten geçirilerek içilir. Demleme, genellikle bitkinin çiçek ve yaprak karışımları için kullanılan bir yöntemdir. *Kaynatma* (dekoksiyon) yönteminde bitki üzerine soğuk su ilave edilir, kabın ağzı kapatılır, belirli bir süre boyunca kaynatılır ve süzgeçten geçirilerek içilir. Genellikle sert dokuya sahip olan, bitkinin meyve, kök, kabuk gibi çeşitli kısımlarının etken maddelerinin çaya daha iyi nüfuz edebilmesi için kaynatma yöntemi kullanılır. *Oda sıcaklığında hazırlama* (maserasyon) yöntemi, ısıyla bozulan maddeler içeren bitkilerden hazırlanacak çaylar için tercih edilir. Bitkiler uygun bir kaba konur, üzerine oda sıcaklığındaki su eklenir, bir gece oda sıcaklığında bekletilir ve daha sonra süzülerek çay elde edilir (Baytop, 1984; Yeşilada, 2011).

2.6.2. Bitki çaylarının kullanımı

Zayıf etkili bitki çayların tedavi amaçlı kullanılması durumunda etkisini arttırabilmek amacı ile yemeklerden 1-2 saat önce ya da sonra yani mide boş iken içilmelidir. Böylelikle diğer besinler ile etkileşimi önlebilir ve emilimi kolaylaştırılabilir (Yeşilada, 2011) Bitki çayları çok az kalori içerdiğinden kalorisiz olarak kabul edilmektedir. Ancak çaylara eklenebilecek olan süt, şeker, bal vb. besinlerin kalorileri, kalori hesaplarken ayrıca eklenmelidir (Köksal ve Manav, 1973). Tüm bunların yanı sıra uzman kişiler dışında popülerleşmiş bazı isimlerin de medyada söz sahibi olması sebebiyle yer alan eksik bilgilendirme, yapay olmayan her şeyin faydalı olduğu şeklinde yanlış bir inanışa sebebiyet vermektedir. Bitkilerin

içerdiği yüzlerce çeşit bileşen, hazırlama koşulları gibi birçok etkene bağlı olarak beklenmedik yan etkiler geliştirebilir, toksisite oluşturabilir veya kişinin kullandığı ilaçlar ile etkileşime girebilir (Erden ve ark., 2009). Bununla birlikte bitki çaylarının satışı yapılırken yeterince denetlenmemesi sebebiyle bitkisel ürünlerin beyan edilmemiş güçlü farmasötik maddelerle karıştırılması, toksik bitki türleriyle ikame veya yanlış tanımlama ve mikrobiyal metabolitler gibi potansiyel olarak tehlikeli maddelerle kontamine olmuş bitkilerin kullanılması, radyoaktif parçacıklar, ağır metaller ve zirai kimyasal kalıntıların bulunduğu bitkilerin satın alınması da zarara yol açabilir (Koalec ve ark., 2009).

2.7. Zeytin Yaprağı

Zeytin ağacından elde edilen ürünler, çoğunlukla zeytin ağaçlarının doğal olarak yetiştiği Akdeniz ülkelerinde gıda maddesi olarak ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Özellikle zeytin yaprağı Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde geleneksel ilaçlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Avrupa Sağlık Ajansı'nın (EMA) 2011 yılında yayınladığı rapora göre zeytin yapraklarının İspanya, İtalya, Fransa ve Almanya'da geleneksel ilaç, Slovakya'da ise ticari ilaç olarak kullanım kaydı bulunmaktadır (European Medicines Agency, 2011). Türkiye, zeytin üreticisi ülkeler arasında dünyada ilk sıralarda yer almaktadır (Savran, 2017; Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Zeytin ağacının meyveleri ve zeytin yağı günlük beslenme amacıyla sıkça kullanılırken yaprak gibi kısımları genel olarak ülkemizde hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Hatta çoğu zaman zeytini çeşitli işleme süreçlerinden geçirdikten sonra ya da ağaçların budanmasından sonra atıl duruma getirilmekte veya yakılmak işlemi ile imha edilmektedir. Son yıllarda artan çalışmalar ile gıda katkı maddeleri ve fonksiyonel gıdalarda kullanım için zeytin yapraklarına olan talep artmıştır (Lafka ve ark., 2013).

Zeytin yaprağının hipotansif, antiaritmik, antiaterosklerotik (Somova ve ark., 2003; Somova ve ark., 2004), antidiyabetik (Al-Attar ve Alsalmi, 2017), vazodilatatör, antimikrobiyal (Sudjana ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010), antiviral (Lee-Huang ve ark., 2003; Micol ve ark., 2005), anti-kanser (Boss ve ark., 2016) ve

antiinflamatuvar etkinliği olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, ham zeytin yaprağı özütünün ve zeytin yaprağından elde edilen polifenollerin meme, mesane, mezotelyoma ve lösemi dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptoz indükleyici (Goulas ve ark., 2009; Fares ve ark., 2011; Samet ve ark., 2014) etkiler sergilediği gösterilmiştir. Goulas ve ark. (2009), zeytin yaprağı ekstraktının MCF-7 meme ve T-24 mesane kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Samet ve ark. (2014), zeytin yaprağı ekstresinin K562 hücrelerinde apoptozu indüklemesinin yanı sıra hücrelerin monosite/makrofaja farklılaşma sürecini başlattığını da bulmuşlardır. Fares ve ark. (2011), zeytin yaprağı ekstresinin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu, insan lösemi hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya çıkarmışlardır.

2.8. Oleuropein

Oleuropein ($C_{25}H_{32}O_{13}$; ma: 540.51g/mol), zeytin ağacının meyve ve özellikle yapraklarında bulunan bir sekoiridoiddir (Duke, 1992). Zeytine ve zeytinyağına acımsı-buruk tadını veren oleuropein, hidroksitirozol ve elenolik asitin glikozidik esteridir (Panizzi ve ark., 1960; Andrewes ve ark., 2003).

Bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen fenolik bileşenler, bitkilerde tat ve kokunun oluşturulmasının yanı sıra renk oluşumu ve değişimi reaksiyonlarına neden olurlar (Acar, 1998). Ayrıca insan ve hayvan sağlığı için de önemli bileşiklerdir. Antioksidan, fitoöstrojenik ve antimikrobiyal etkiler ile çeşitli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Patel ve diğ., 2004). Oleuropein, zeytin ağacı ve bilhassa yapraklarında bulunan (Duke, 1992), zeytine ve zeytin yağına acımsı-buruk tadı veren fenolik bileşendir (sekoiridoid) (Ozdemir ve ark., 2014). Günümüze dek yapılan çalışmalarla oleuropeinin antioksidan, kan damarlarını genişletici (Duke, 1992), antimikrobiyal (Harborne ve ark., 1999), aritmi giderici, spazm çözücü ve tansiyon düşürücü (Wagner ve Wolf, 1977), sitotoksik ve antikanser (Abe ve ark., 2011) etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Bulotta ve ark. (2011), perasetillenmiş oleuropeinin antioksidan aktivitesinin fazla olduğunu bulmuşlar ve bu bileşiğin meme kanseri hücre soyları MCF-7 ve T-47D üzerinde antiproliferatif aktivite

sergilediğini belirlemişlerdir. Acquaviva ve ark., (2012), benign prostat hiperplazisi (BPH-1) ve prostat kanseri hücreleri (LNCaP ve DU145) üzerine oleuropein uygulanmasının BPH-1 hücreleri üstünde antioksidan ve kanser hücreleri üstünde ise prooksidan etkiye neden olduğunu göstermişlerdir. Elamin ve ark. (2013) ise meme kanseri hücrelerine (MDA-MB-231 ve MCF-7) uygulanan oleuropeinin, daha agresif karakterli MDA-MB-231 hücreleri üstünde MCF-7 hücrelerinden daha yüksek oranda etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar, oleuropeinin apoptozu mitokondriyal yolla indüklediğini, hücre döngüsünü S safhasında geciktirerek hücre çoğalmasını engellediği ve sikline bağımlı inhibitör p21'i upregüle ettiği; anti-apoptoz ve proproliferasyon proteini NF-κB ile siklin D1'i inhibe ettiğini de tespit etmişlerdir (Elamin ve ark., 2013). Başka bir çalışmada, oleuropeinin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu baskılayıp apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Han ve ark., 2009). Seçme ve ark. (2016), SH-SY5Y nöroblastoma hücre soyu ile yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre bu hücre soyunda oleuropeinin IC_{50} değerini 350 μM olarak tespit etmişlerdir. Oleuropeinin bu hücrelerde; siklinD1, siklinD2, siklinD3, CDK4, CDK6'nın aşağı regülasyonu ve p53, CDKN2A, CDKN2B, CDKN1A'nın ise yukarı regüle edilmesi yoluyla hücre döngüsünün durmasına neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca oleuropeinin Bcl-2'yi inhibe ederek ve Bax, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonlarını aktive ederek apoptozu uyardığı da rapor edilmiştir (Seçme ve ark., 2016; Sirianni ve ark., 2010), oleuropeinin MCF-7 hücrelerinde östrojenin indüklediği proliferasyonu inhibe edebildiğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

- Diseksiyon setleri (markasız, Türkiye)
- Gastrik gavaj kanülü (markasız, Türkiye)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Thoma lamı
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- Oleuropein (Santa Cruz Biotech, USA)
- 1 ml, 5 ml, 10 ml hacimli tek kullanımlık enjektörler (Ayset, Türkiye)
- 15 ml ve 50 ml'lik tüpler (Greiner, Almanya)
- 96 kuyucuklu pleytler (Isolab, Almanya)
- Pozitif yüklü lam (Marienfeld, Almanya)
- Hidroklorik asit (Merck)
- Bradford ayracı (Sigma Aldrich, USA)
- ALT analiz kiti (BIOLABO, Fransa)
- AST analiz kiti (BIOLABO, Fransa)
- LDH analiz kiti (BIOLABO, Fransa)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvan deneyleri

Bu çalışma için oluşturulan deney grupları ve bu gruplar arasında yapılacak karşılaştırmalar aşağıdaki soruları cevaplamak üzere kurgulanmıştır:

(A) Zeytin yaprağı çayının (ZY);

1) Tümör oluşumundan koruyucu etkisi var mıdır?

2) Tümör inisiyasyonu (tümör başlama) üzerinde etkisi var mıdır?

3) Organizmada tümör tespit edildikten sonra tümör büyümesi üzerinde tedavi edici etkisi var mıdır?

(B) Oleuropein (OL) zeytin yaprağında en fazla miktarda bulunan bileşen olması nedeniyle zeytin yaprağından elde edilecek olası etkilerin nedeni oleuropein midir?

Çalışma için gerekli etik kurul onayı Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (karar no: 2019/002/02) (EK 1). Hayvan deneyleri, Harran Üniversitesi Hayvan Deneyi Uygulama ve Araştırma Merkezi (HRÜ-HDAM)'nde gerçekleştirilmiştir. Her birinde Balb/c ırkı, yaklaşık 2.5 aylık, ortalama 25 gr ağırlığında inbred erkek fare bulunan gruplar oluşturulmuştur. Deney gruplarında bulunan hayvan sayısı, bu hayvanlara yapılan uygulamalar; koruyucu etki, tümör inisiyasyonu üzerindeki etki ve tümör büyümesi üzerindeki etki için sınıflandırılarak Çizelge 3.1'de verilmiştir. Grupların 10 tanesindeki hayvanlara 3×10^5 EAT hücresi inoküle edilmiştir (1 EAT'li kontrol + 9 deney). 2 gruba 0.2 ml dengeli tuz solüsyonu (BSS) intraperitonal yolla enjekte edilmiştir (2 EAT'siz kontrol). 1 gruba ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır (Sham kontrol). Son üç grup, biyokimyasal analizler için kontrol grupları olarak değerlendirilecektir. Deney ve EAT'siz kontrol gruplarındaki hayvanlara zeytin yaprağı çayı (400 mg/kg, oral, her gün), zeytin yaprağının sulu ekstraktlarında en yüksek oranda bulunduğu bildirilen oleuropein maddesi (150 mg/kg, oral, her gün) ve 5-Fluorourasil (5-FU) antitümör ajanı (20 mg/kg, intraperitonal, tek doz) ayrı ayrı ve kombinasyonlar halinde uygulanmıştır. Hayvanlar iki günde bir aynı saatte tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir.

Deneyin 9. ve 16. günlerinde hayvanlar ketamin/xylazine anestezisi altında iken peritonları açılarak tümör hücrelerini içeren asit sıvısı toplanmıştır. Asit sıvısının total hacmi ölçülmüş, tripan mavisi kullanılarak 1 ml'deki canlı EAT hücre sayısı tespit edilmiş, böylece hücre çoğalması üzerindeki etki ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu hayvanlardan uygun yöntemlerle alınan karaciğer dokuları biyokimyasal analizler için kullanılmıştır. Biyokimyasal analizler, literatüre uygun şekilde (Uçkun, 2013) kit kullanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney grupları

	Gruplar	Yapılan uygulama	Kanser (EAT)	Denek sayısı (n)
ZEYTİN YAPRAĞI ÇAYININ	Sham Kontrol	Hiçbir uygulama yapılmadı	Yok	4
Tümör büyümesi üzerindeki etkisi	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
	BSS Kontrol (ZY 8gün)	0. gün BSS enjekte edildi + 0. gün başlanarak 8 gün süreyle ZY içirildi	Yok	4
	EAT + ZY (6gün)	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün başlanarak 6 gün süreyle ZY içirildi	Var	7
	EAT + 5-FU	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün tek doz 5-fluoro urasil uygulandı	Var	7
	EAT+5-FU+ZY (6gün)	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün tek doz 5-fluoro urasil uygulandı + 2. gün başlanarak 6 gün süreyle ZY içirildi	Var	7
Koruyucu etkisi	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
	BSS Kontrol (ZY 15gün)	0. gün BSS enjekte edildi, 0. gün başlanarak 15 gün süreyle ZY içirildi	Yok	4
	EAT + ZY (15gün)	Toplam 15 gün süreyle ZY çayı içirildi, uygulamanın 8. gününde kanser hücresi verildi	Var	7
Tümör inisiyasyonu üzerindeki etkisi	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
	BSS Kontrol (ZY 8gün)	0. gün BSS enjekte edildi, 0. gün başlanarak 8 gün süreyle ZY içirildi	Yok	4
	EAT + ZY (8gün)	0. gün kanser hücresi verildi ve ZY içirildi, ZY'ye toplam 8 gün devam edildi	Var	7
OLEUROPEİNİN	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
Tümör büyümesi üzerindeki etkisi	BSS Kontrol (OL 8gün)	0. gün BSS enjekte edildi, 0. gün başlanarak 8 gün süreyle OL içirildi	Yok	4
	EAT + OL (6gün)	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün başlanarak 6 gün süreyle OL içirildi	Var	7
	EAT + 5-FU	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün tek doz 5-fluoro urasil uygulandı	Var	7
	EAT+5-FU+OL (6gün)	0. gün kanser hücresi verildi + 2. gün tek doz 5-fluoro urasil uygulandı + 2. gün başlanarak 6 gün süreyle OL içirildi	Var	7
Koruyucu etkisi	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
	BSS Kontrol (OL 15gün)	0. gün BSS enjekte edildi, 0. gün başlanarak 15 gün süreyle OL içirildi	Yok	4
	EAT + OL (15gün)	Toplam 15 gün süreyle OL çayı içirildi, uygulamanın 8. gününde kanser hücresi verildi	Var	7
Tümör inisiyasyonu üzerindeki etkisi	EAT Kontrol	Sadece kanser hücresi verildi, tedavi uygulanmadı	Var	7
	BSS Kontrol (OL 8gün)	0. gün BSS enjekte edildi, 0. gün başlanarak 8 gün süreyle OL içirildi	Yok	4
	EAT + OL (8gün)	0. gün kanser hücresi verildi ve OL içirildi, OL'ye toplam 8 gün devam edildi	Var	7

3.2.2. Zeytin yaprağı çayının hazırlanması ve uygulanması

Deneysel işlemlerde kullanılan zeytin yaprakları, 2020 yılı ağustos ayında Mersin ili Karayakup mahallesi Çakalahmetyeri mevkiinden (36°45′13.8398″N, 34°23′7.9814″E) toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri yıkanıp kurulandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuş, kullanılacağı zamana kadar hava almayacak şekilde ambalajlanarak buzdolabında saklanmıştır. Ayrıca bitki örneklerinin teşhisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yaptırılarak herbaryum kaydı oluşturulmuştur (OMUB-8817) (Şekil 3.1.).

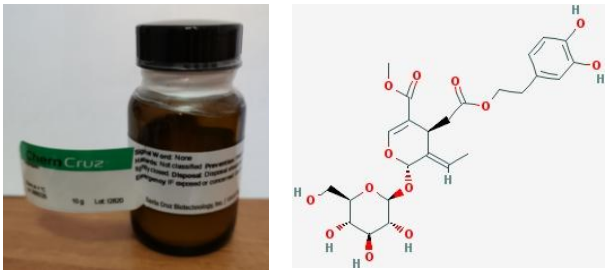


Şekil 3.1. Yaprak örneklerinin alındığı zeytin ağacı ve herbaryum örneği

Zeytin yaprağı çayı (ZY) hazırlamak için 250 mg kuru zeytin yaprağı elle kabaca parçalanmış; kaynatılıp 95°C'ye soğutulmuş 5 ml distile su içerisinde 10 dk demlenmiştir. Böylece 50 mg/ml konsantrasyonda ZY hazırlanmıştır. ZY, filtre kağıdından süzüldükten sonra 0.45 µm por çaplı enjektör ucu bakteriyolojik filtre ile steril edilmiştir. Hayvanların tartılmasıyla kaydedilen ağırlıkları dikkate alınarak, hayvan başına 400 mg/kg olacak şekilde, içirilecek çay miktarı (hacim) hesaplanmıştır. Taze hazırlanmış ZY, hergün aynı saatte, gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. İşleme, Çizelge 3.1.'de gösterilen şekilde; 6, 8 veya 15 gün devam edilmiştir.

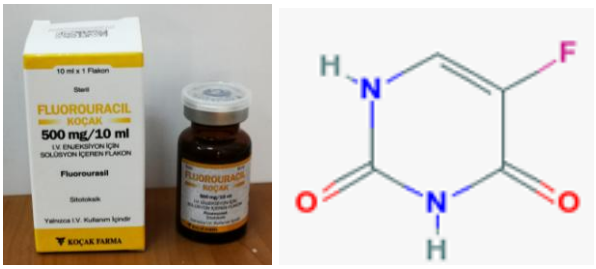
3.2.3. Oleuropein ve 5-Fluorourasilin hazırlanması ve uygulanması

Oleuropein (Şekil 3.2.), 30 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış, 0.45 µm por çaplı enjektör ucu bakteriyolojik filtre ile steril edilmiştir. Hayvanların tartılmasıyla kaydedilen ağırlıkları dikkate alınarak, hayvan başına 150 mg/kg olacak şekilde, içirilecek OL miktarı (hacim) hesaplanmıştır. Taze hazırlanmış OL, hergün aynı saatte, gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. İşleme Çizelge 3.1.'de gösterilen şekilde; 6, 8 veya 15 gün devam edilmiştir.



Şekil 3.2. Oleuropein ticari ambalajı ve kimyasal yapısı (Santa Cruz Biotechnology, 2022)

5- Fluorourasilin enjeksiyonluk formu satın alınmış (Şekil 3.3.), hayvan başına 20 mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde Çizelge 3.1.'de gösterilen gruplardaki hayvanlara, her hayvanın güncel ağırlığına göre hacim hesaplaması yapılmış ve periton içerisine tek doz olarak enjekte edilmiştir.



Şekil 3.3. 5-Fluorourasil ticari ambalajı ve kimyasal yapısı (ilactr, 2022)

3.2.4. Hücre sayısının belirlenmesi

Çizelge 3.1.'de belirtilen günlerde hayvanlara ketamin / xylazine anestezisi verilmiştir. Anestezi altındaki hayvanların peritonu açılarak EAT hücrelerini içeren asit sıvısı toplanmış; sıvının total hacmi belirlenmiş ve daha sonraki analizler için uygun koşullarda saklamak amacıyla 1:10 – 1:50 oranında fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içerisinde dilüe edilmiştir. Canlı – ölü hücre ayrımını yapabilmek için hacimce 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılmış ve Thoma lamında sayım yapılmıştır.

3.2.5. Biyokimyasal analizler

Sağlıklı ve meme kanserli bireylerde ZY ve OL'nin günlük diyetle birlikte tüketiminin organizma üzerinde hasar oluşturma ya da hasardan koruma potansiyelini değerlendirmek için hayvanlardan toplanan karaciğer dokusu örneklerinde Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerinin düzeyine bakılmıştır. Doku örnekleri hayvandan alınır alınmaz derhal sıvı azot içerisine alınarak dondurulmuş ve analizlerin yapılacağı zamana kadar donmuş olarak saklanmıştır. Analizler, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Enzim aktivitelerinin ve toplam protein miktarının ölçümü için öncelikle doku örnekleri homojenize edilmiş, ardından santrifüj yapılmıştır. Örnekler bekletilmeden mikroplaka okuyucu sistem (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) ile absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her örnek için 4 tekerrürlü çalışılmıştır. Bir grupta tekerrürler arasında %10'dan daha büyük korelasyon farkı bulunan örnekler için absorbans ölçümleri tekrarlanmıştır. Toplam protein düzeyleri Bradford yöntemiyle ölçülmüştür (Bradford, 1976).

3.2.5.1. Alanin aminotransferaz aktivitesinin ölçümü

Alanin Aminotransferaz (ALT) aktivitesi diagnostik kit (BIOLABO, Fransa) kullanılarak ölçülmüştür. Öncelikli olarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda, hazır kite 10 ml distile su ilave edilerek içerisinde ALT substratı mevcut çözelti hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakaların her bir kuyucuğuna 20 µl örnek pipetlenmiştir. Örneklerin üzerine 200 µl ALT çözeltisinden eklenerek reaksiyon karışımı 1 dakika inkübe edilmiş, ardından 25 °C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile absorbasyon değişimi belirlenmiştir. Spesifik ALT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (NADH için Є=6220 $M^{-1}cm^{-1}$).

3.2.5.2. Aspartat aminotransferaz aktivitesinin ölçümü

Aspartat Aminotransferaz (AST) enzim aktivitesinin ölçümü için diagnostik kit (BIOLABO, Fransa) kullanılmıştır. Supernatant örneği kuyucuk başına 20 µl olacak şekilde mikroplaka kuyucuklarına pipetlenmiş, ardından üretici firma tarafından belirtilen protokole göre, hazır kite 10 ml distile su ilave edilerek hazırlanan AST çözeltisinden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Absorbans değişimi, 25 °C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile ölçülmüştür. Spesifik AST aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (NADH için Є=6220 $M^{-1}cm^{-1}$).

3.2.5.3. Laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümü

Laktat Dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesi ölçümünde, 340 nm dalga boyunda LDH diagnostik kiti (BIOLABO, Fransa) kullanılmıştır. Örnekler, toplam reaksiyon karışımında 5 µl süpernatant olacak şekilde mikroplaka kuyucuklarına pipetlenmiştir. Üretici firmanın protokolüne göre, LDH substratı içeren tampon çözeltisi içerisinde koenzim eritilerek LDH çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 200 µl, örneklerin üzerine seri olarak çok kanallı mikropipet ile eklenmiştir. Karışım mikroplaka okuyucuda 15 saniye süreyle çalkalanmış ve 25 °C'de 2 dakika süre ile 340 nm'de absorbans değişimi kaydedilmiştir. Spesifik LDH aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (NADH için Є=6220 $M^{-1}cm^{-1}$).

3.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Deneylerden elde edilen bulgular, aritmetik ortalamalar ve her bir ortalama değerin standart hatası (ortalama ± standart hata) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı; Excel (Office 2019) ve SPSS 16.0 programlarında ONE WAY ANOVA varyans analizi, student *t*-testi, Tukey ve LSD testleri kullanılarak değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, zeytin yaprağı çayı ile zeytin yaprağında fazla miktarda bulunan oleuropein bileşiği, kullanışlı bir meme kanseri modeli olan Ehrlich asit tümörü (EAT) taşıyan farelere Çizelge 3.1.'de özetlenen şekilde uygulanmıştır. Böylece (A) Zeytin yaprağı çayının (ZY); *i*) tümör oluşumundan koruyucu, *ii*) tümör inisiyasyonu (tümör başlaması) üzerinde ve *iii*) organizmada tümör tespit edildikten sonra tümör büyümesi üzerinde tedavi edici etkisi olup olmadığı; ayrıca (B) ZY'nin muhtemel etkilerinin oleuropeinden (OL) kaynaklı olup olmadığı sorularının cevapları aranmıştır. Deney süresince hayvanların vücut ağırlıkları kaydedilmiş; deney süresi sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan EAT hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkiler incelenmiş ve karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim seviyeleri ölçülerek zeytin yaprağı çayının ve/veya oleuropeinin doku hasarı oluşturup oluşturmadığı biyokimyasal olarak araştırılmıştır.

4.1. Zeytin Yaprağı Çayının Etkileri

4.1.1. Koruyucu etki

Zeytin yaprağı çayının organizmayı meme kanseri oluşumundan koruyucu etkisi olup olmadığını belirlemek için [grup adı: EAT + ZY (15gün), n=7] farelere 15 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanmış ZY, 400mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. Uygulamanın 8. gününde 3×10^5 EAT hücresi grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiş ve ZY uygulamasına devam edilmiştir.

4.1.1.1. Hücre proliferasyonu

Deneye dahil edilen farelerden toplanan EAT hücrelerini içeren asit sıvısından Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde tripan mavisi ile canlı-ölü hücre ayrımı yapılmak suretiyle mikroskopta toplam hücre sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.1.'de izlenmektedir. Herhangi bir tedavi uygulanmamış kontrol grubunda deney sonunda tespit edilen toplam hücre sayısı

314770000 ± 58331000 olarak bulunmuştur. 15 gün boyunca ZY içirilen grupta elde edilen EAT hücre sayısının ise kontrole göre azalarak 211500000 ± 28956000 olduğu dikkat çekmektedir (Çizelge 4.1.). Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre aradaki fark anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Zeytin yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (±standart hata).

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + ZY (15gün)	211 500 000 ± 28 956 000*

*: İstatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.1. Zeytin Yaprağı çaynın koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı
*: EAT kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

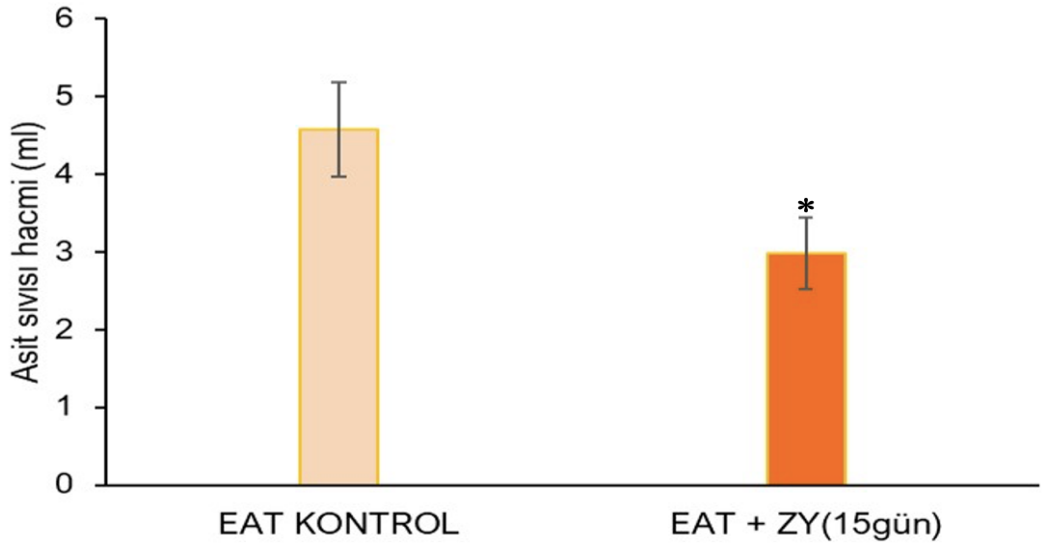
4.1.1.2. Asit sıvısı hacmi

Hücre sayısı ile benzer şekilde asit sıvısı hacminin de azaldığı görülmüştür. Çizelge 4.2.'den izlendiği şekilde, tedavi uygulanmamış kontrol grubunda 4.58 ± 0.60 ml olarak ölçülen asit sıvısı hacminin 15 gün ZY içirilen grupta azalarak 2.98 ±

0.46 ml olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur (Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. Zeytin Yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata)

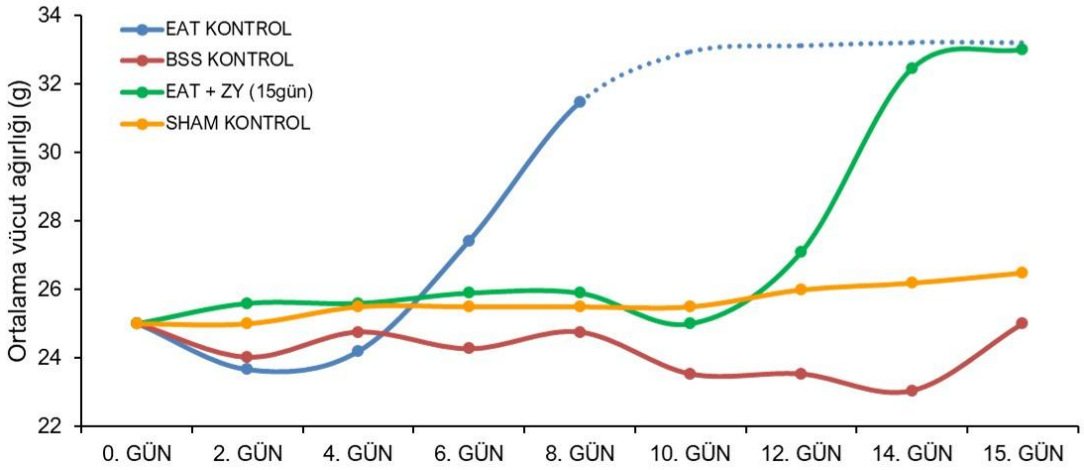
Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + ZY (15gün)	2.98 ± 0.46*



Şekil 4.2. Zeytin Yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen asit sıvısı hacmi
*: İstatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.1.3. Vücut ağırlığı

Deney ve kontrol gruplarındaki hayvanların ağırlıkları, gün aşırı tartılarak kaydedilmiştir. Herhangi bir uygulamanın yapılmadığı sham kontrol grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları 25 – 25.5 g aralığında iken sağlıklı olup ZY verilen BSS kontrol grubunda da benzer eğilimle 25 g seviyelerinde seyretmiştir (Şekil 4.3.). EAT taşıyan farelerin vücut ağırlığı, tümör hücre sayısı ve asit sıvısı hacminin artışına bağlı olarak 4. günden itibaren, sham grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde artmıştır. EAT kontrol grubundaki hayvanlar 8. günde sakrifiye edildikleri için 10-15 gün aralığında tartım yapılmamıştır. 15 gün süreyle ZY verilen grupta vücut ağırlıkları 10. güne kadar BSS kontrol grubu ile benzer şekilde seyrederken bu gruba uygulamanın 8. gününde EAT hücre enjeksiyonu yapılmıştır. Buna bağlı olarak bu gruptaki hayvanların vücut ağırlıkları 12. günden (EAT inokülasyonunun 4. günü) itibaren artış eğilimine girmiştir. Bu artış ile sham kontrol grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.



Şekil 4.3. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.1.1.4. Biyokimyasal analizler

Hücre hasarı (sitotoksisite), karaciğer hasarı (hepatotoksisite) ve histopatolojik durumlarda, karaciğere özgü enzimler olan aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotrasferaz (ALT) ile hayvan dokularında bulunan ve sitoplazmik bir enzim olan Laktat dehidrogenazın (LDH) seviyelerinde değişimler ortaya çıkmaktadır. (Nelson ve Cox, 2004).

Bu bölümde zeytin yaprağı çayının uzun süreli uygulamasının sağlıklı ve meme kanserli bireylerde toksik etki oluşturup oluşturmayacağını gözlemlemek amacıyla Bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.3.'te gösterilmiş olup bu veriler kullanılarak grafikler çizilmiştir (Şekil 4.4. – 4.6.). Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir (n = 7).

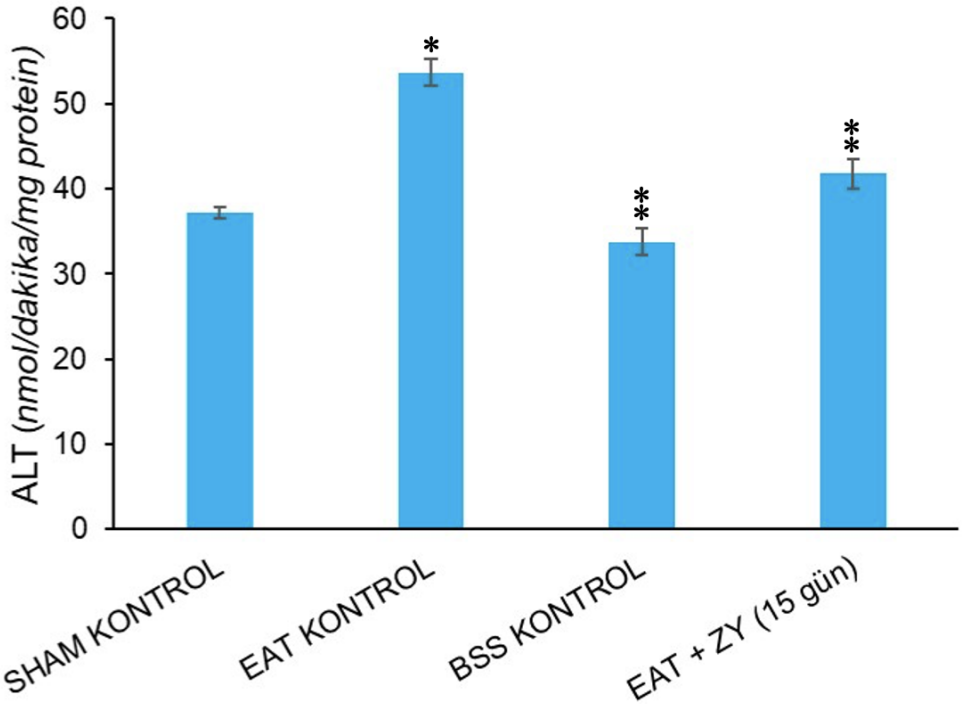
Çizelge 4.3. Zeytin yaprağı çayının koruyucu etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

	Biyokimyasal parametreler		
Grup	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	33.76 ± 1.58^{z}	31.17 ± 0.90^{z}	278.44 ±17.02
EAT + ZY(15gün)	41.75 ± 1.75^{z}	33.50 ± 1.25^{z}	346.70 ± 27.27^{b}

SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:p<0.05, b:p<0.01, c:p<0.001
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:p<0.05, y:p<0.01, z:p<0.001

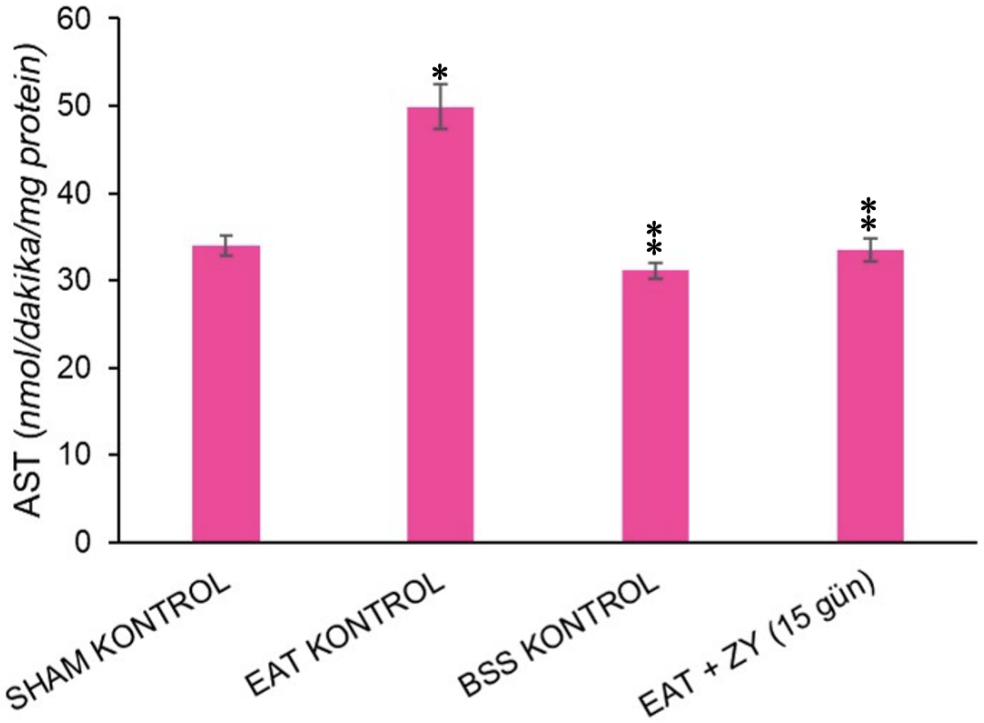
Çizelge 4.3.'e göre ALT düzeyleri sham kontrol grubunda 37.14 ± 0.67 nmol/dk/mg protein olarak ölçülürken, meme kanserli farelerden oluşan EAT kontrol grubunda 53.68 ± 1.64'e çıktığı görülmüştür. 15 gün süreyle ZY verilen ve uygulamanın 8.gününde EAT inokülasyonu yapılan grupta ise ALT düzeyi, sham kontrole göre hafifçe artmakla birlikte, tedavi uygulanmamış (EAT kontrol) gruba göre azalarak 41.75 ± 1.75 nmol/dk/mg protein olmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre EAT kontrol grubu ile EAT + ZY (15gün) arasındaki fark

anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı olup 15 gün süreyle ZY içirilen grupta da ALT değerleri sham grubu ile yaklaşık çıkmıştır (Şekil 4.4.).



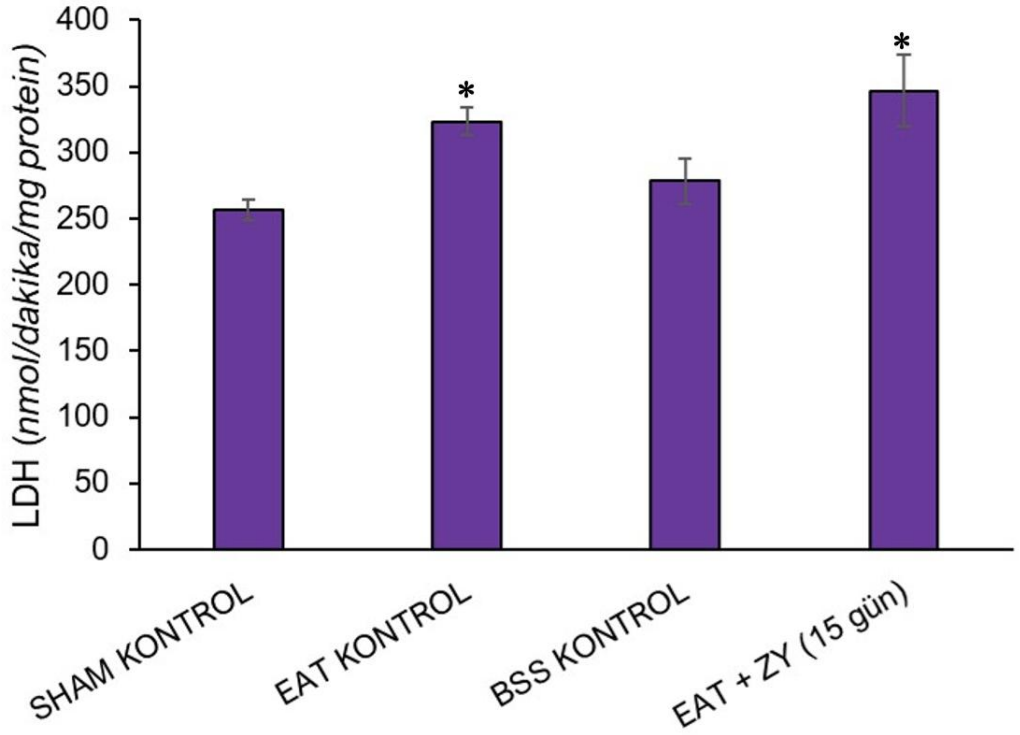
Şekil 4.4. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Karaciğer dokusu AST düzeyleri, ALT ile benzer şekilde, EAT kontrol grubunda (49.85 ± 2.55 nmol/dk/mg protein) sham kontrole (33.99 ± 1.22 nmol/dk/mg protein) göre yüksek olup aradaki ayrım istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. 15 gün süreyle ZY uygulamasının EAT taşıyan farelerde karaciğer AST miktarını (33.50 ± 1.25 nmol/dk/mg protein) azaltarak sham kontrol düzeyine getirdiği; sağlıklı bireylerde ise yine sham kontrole göre hafifçe azalttığı (31.17 ± 0.90 nmol/dk/mg protein) tespit edilmiştir. EAT + ZY (15 gün) ve BSS kontrol grupları ile EAT kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3., Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Hücre ve doku hasarının bir diğer belirteci olan LDH enzim düzeyleri Çizelge 4.3.'te gösterilmiş olup bu verilerle grafik çizilmiştir (Şekil 4.6.). Buna göre meme kanseri modeli EAT hücresi taşıyan grupta LDH düzeyi 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüş olup sham kontrol grubuna (256.54 ± 8.14 nmol/dk/mg protein) göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde arttığı görülmüştür. Sağlıklı farelere 15 gün süreyle ZY içirilen grupta (278.44 ±17.02 nmol/dk/mg protein) anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken 15 gün ZY içirilen ve uygulamanın 8. gününde EAT inokülasyonu yapılan grupta LDH düzeyinin yükselerek 346.70 ± 27.27 nmol/dk/mg protein olduğu dikkati çekmiştir. Bu artış, sham kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.



Şekil 4.6. 15 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı (ZY) uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.1.2. Tümör inisiyasyonu üzerindeki etki

Meme kanserinin başlaması üzerinde zeytin yaprağı çayının herhangi bir etkisi olup olmadığını belirlemek için [grup adı: EAT + ZY(8gün), n=7] grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine 3×10^5 EAT hücresi enjekte edilmiştir. EAT hücre inokülasyonu ile aynı gün başlanarak deney sonlandırılana kadar 8 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanmış ZY, 400mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir.

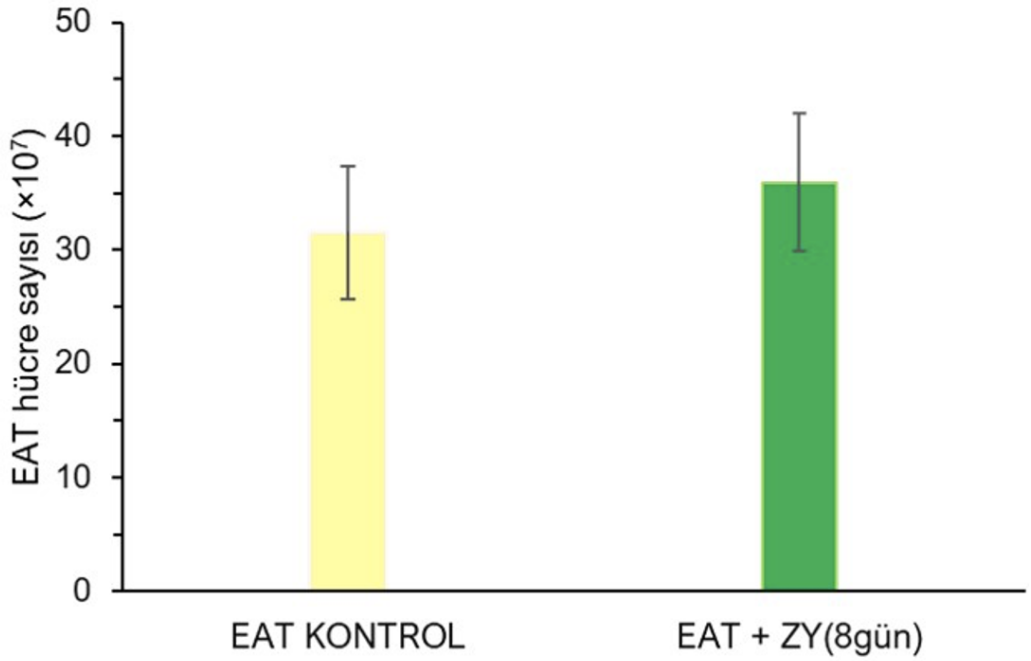
4.1.2.1. Hücre proliferasyonu

Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde gerçekleştirilen tripan mavisi ile boyayarak Thoma lamında hücre sayımı sonucunda elde edilen verilerle tablo oluşturulmuş (Çizelge 4.4.) ve grafik çizilmiştir (Şekil 4.7.). Tümör hücre inokülasyonu ile aynı gün başlayarak 8 gün boyunca ZY verilen farelerde tespit edilen hücre sayısının

kontrole göre hafifçe artarak 359310000 ± 60033000 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4.). Ancak istatistik değerlendirme sonucuna göre bu artışın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standard hata)

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + ZY (8gün)	359 310 000 ± 60 033 000



Şekil 4.7. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı

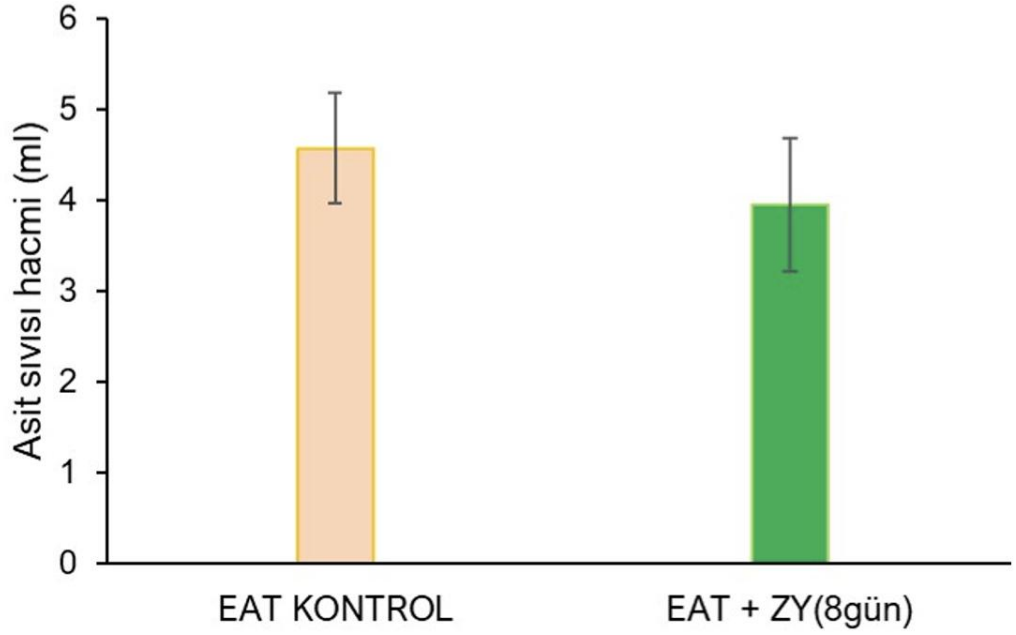
4.1.2.2. Asit sıvısı hacmi

Asit sıvısı hacminin bu grupta tedavi uygulanmamış kontrole göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.5.'ten izlendiği şekilde, tedavi uygulanmamış kontrol grubunda 4.58 ± 0.60 ml olarak ölçülen asit sıvısı hacmi, 8 gün ZY uygulanması sonucunda hafifçe azalarak 3.95 ± 0.74 ml olmuştur. Kontrol ve deney

grupları arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlı olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür (Şekil 4.8.).

Çizelge 4.5. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata)

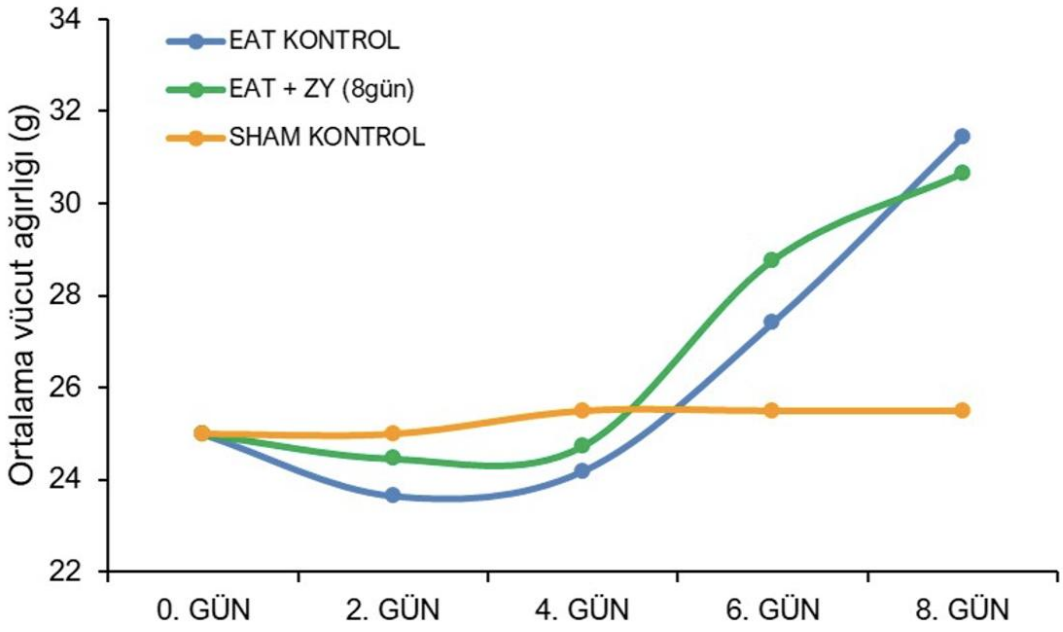
Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + ZY (8gün)	3.95 ± 0.74



Şekil 4.8. Zeytin Yaprağı çayının tümör başlangıcı üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden toplanan asit sıvısı hacmi

4.1.2.3. Vücut ağırlığı

EAT taşıyan farelerde tümör hücre sayısı ve asit sıvısı hacminin artışına bağlı olarak 4. günden itibaren vücut ağırlığı sham grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde artmıştır. Vücut ağırlığı artışının EAT inokülasyonu ile aynı gün ZY başlanan grupta da EAT kontrol ile benzer eğilimde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. EAT taşıyan ve 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.1.2.4. Biyokimyasal analizler

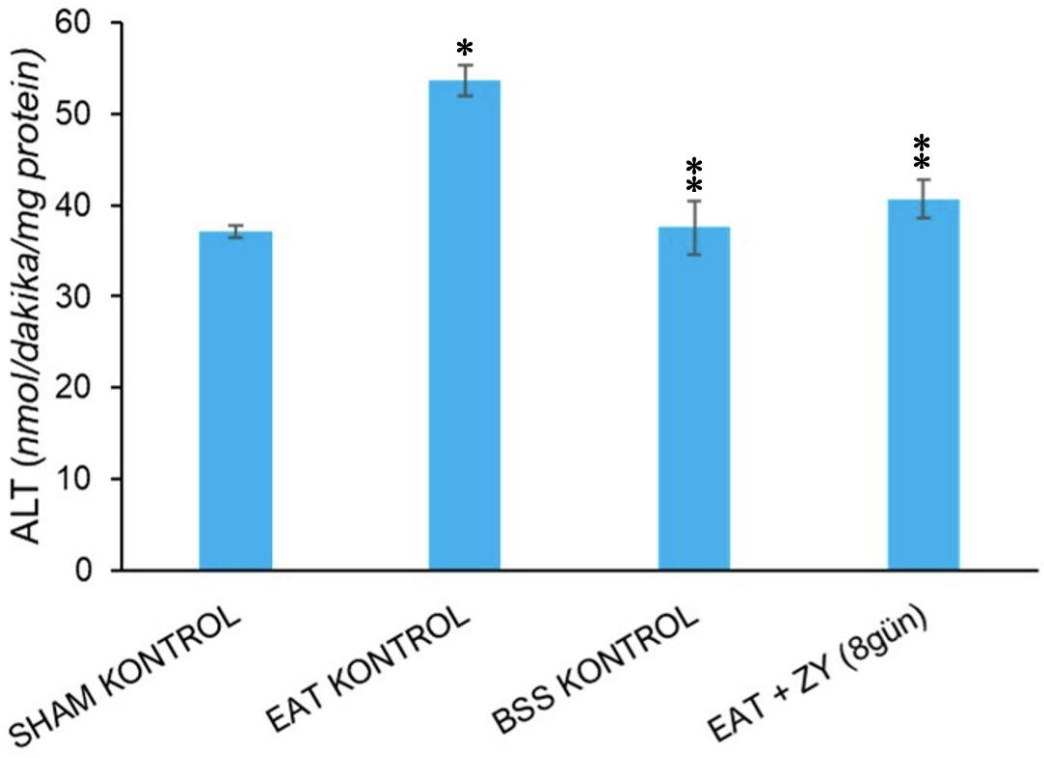
EAT inokulasyonu ile aynı gün başlanarak 8 gün boyunca zeytin yaprağı çayı verilen grupta uygulamanın karaciğer üzerinde toksik etkisi olup olmadığını araştırmak için Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.6.'da özetlenmiş olup grafikler çizilmiştir (Şekil 4.10. – 4.12.). Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir (n = 7).

Çizelge 4.6. Zeytin yaprağı çayının tümör inisiyasyonu üzerinde etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

	Biyokimyasal parametreler		
Grup	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	37.58 ± 2.92^{z}	31.10 ±1.19^{z}	312.44 ± 11.85
EAT + ZY(8gün)	40.68 ± 2.13^{z}	34.29 ± 1.20^{z}	304.91 ± 18.48

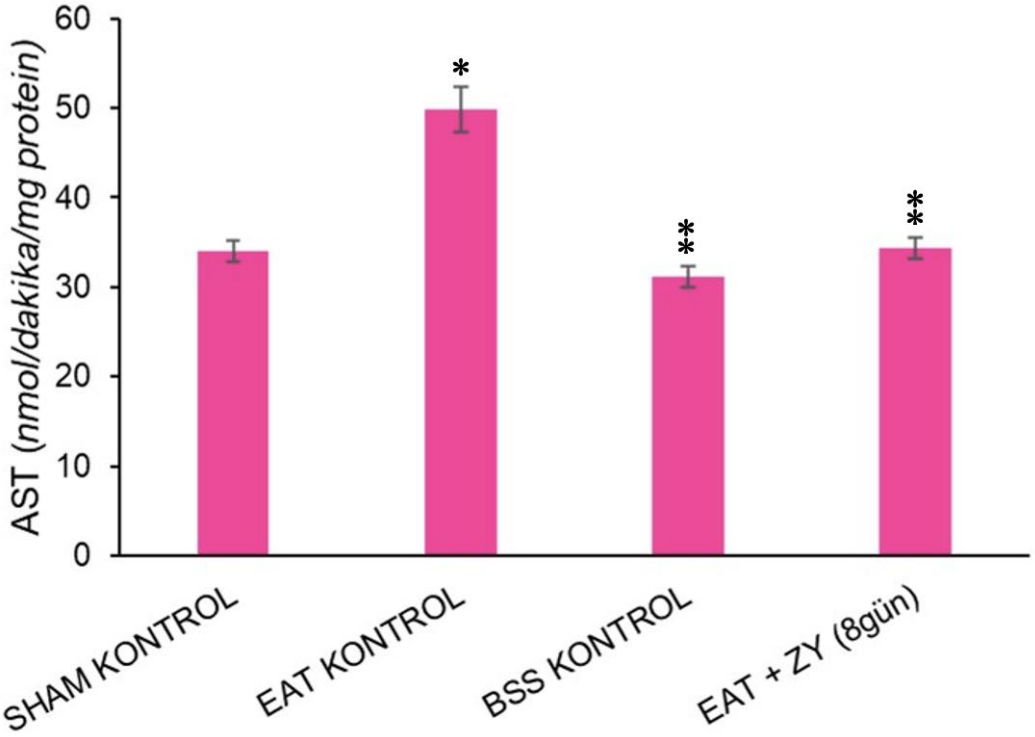
SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:$p<0.05$, b:$p<0.01$, c:$p<0.001$
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:$p<0.05$, y:$p<0.01$, z:$p<0.001$

Çizelge 4.6. ve Şekil 4.10. incelendiğinde 8 günlük ZY uygulamasının, karaciğeri, kanserin sebep olduğu hasara karşı koruyabileceği görülmüştür. ALT düzeylerinin, EAT kontrol grubunda 53.68 ± 1.64 nmol/dk/mg protein iken EAT taşıyan ve EAT inokülasyonu ile aynı gün ZY verilmeye başlanan grupta, sham kontrole yaklaşarak, 40.68 ± 2.13 nmol/dk/mg protein olduğu tespit edilmiştir. Bu azalış istatistik bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde 8 günlük ZY uygulamasının ALT düzeylerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir.



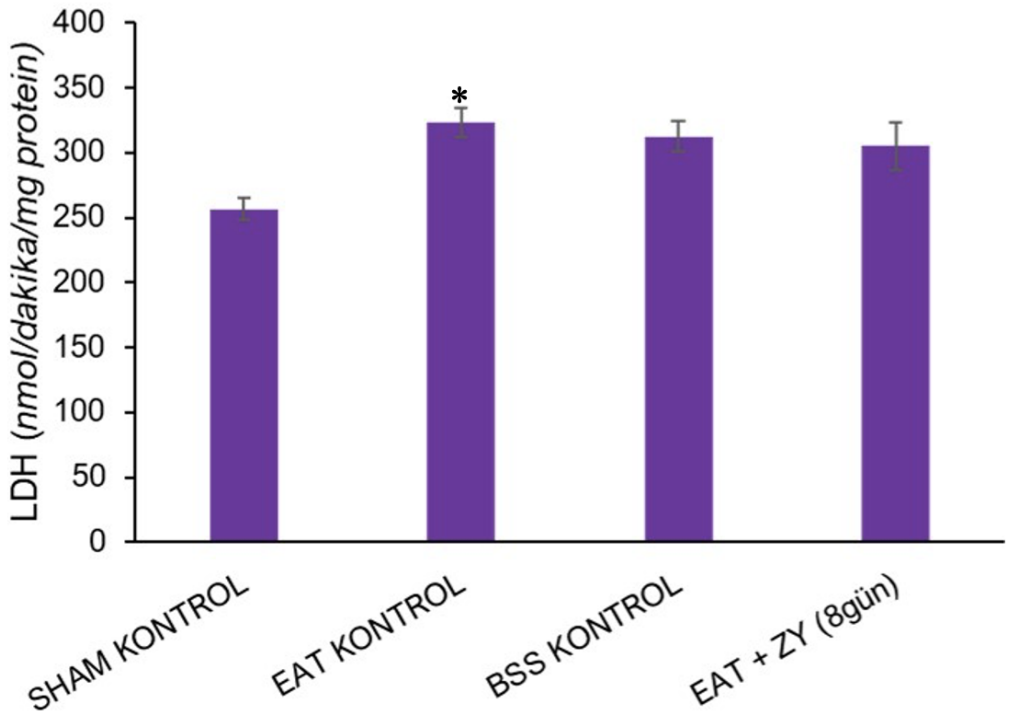
Şekil 4.10. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Karaciğer dokusu AST düzeylerinin ALT ile benzer şekilde EAT + ZY(8 gün) grubunda sham kontrol seviyelerinde seyrettiği tespit edilmiş olup 34.29 ± 1.20 nmol/dk/mg protein ölçülmüştür (Çizelge 4.6., Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

LDH enzim düzeyinin karaciğerdeki hasarın bir belirteci olarak herhangi bir tedavi uygulanmamış EAT taşıyan farelerde sham grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde artarak 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6., Şekil 4.12.). EAT + ZY(8 gün) grubu (304.91 ± 18.48 nmol/dk/mg protein) ile BSS kontrol grubunda (312.44 ± 11.85 nmol/dk/mg protein) LDH düzeylerinin sham gruba göre yüksek, EAT kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Bu gruplar arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. 8 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.1.3. Tümör büyümesi üzerindeki etki

Zeytin yaprağı çayının bireyde meme kanseri tespit edildikten sonra tümör büyümesi üzerinde tedavi edici etkisi olup olmayacağı sorusunu cevaplayabilmek için bu grup [grup adı: EAT + ZY(6gün), denek sayısı: 7] oluşturulmuştur. Bu grupta 3×10^5 EAT hücresi, grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiştir. EAT hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün başlanarak deney sonlandırılana kadar 6 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanmış ZY, 400mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. Ayrıca meme kanserinin tedavisi için kullanılan bir kemoterapötik ajan olan 5-Fluorourasil de EAT hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün 20 mg/kg konsantrasyonda tek doz olarak periton içerisine enjekte edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla 5-FU ve ZY'nın kombinasyonunun uygulandığı bir grup daha oluşturulmuştur.

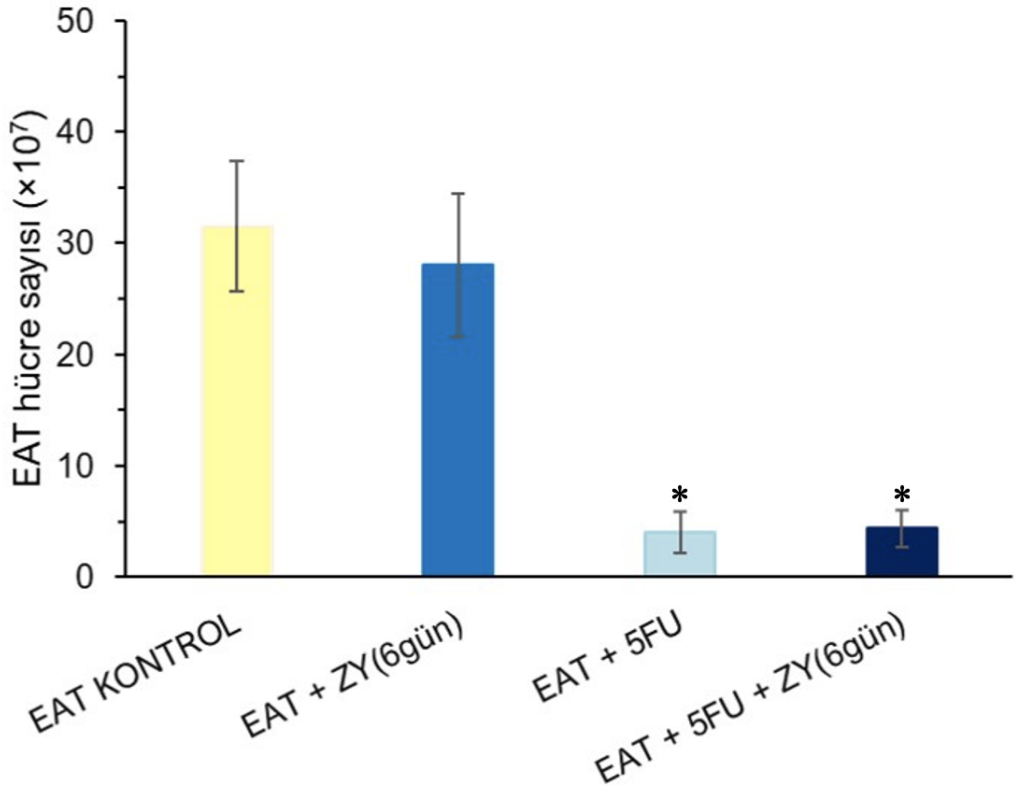
4.1.3.1. Hücre proliferasyonu

Farelere EAT hücre inokülasyonundan sonraki ikinci gün başlayarak 6 gün süreyle ZY içirilmesinin ardından tespit edilen toplam canlı hücre sayısının 280100000 ± 64225000 olduğu belirlenmiştir. Meme kanseri için klinikte kullanılan bir kemoterapötik olan 5-FU, pozitif kontrol amacıyla tek doz uygulanmış ve hücre sayısının, 314770000 ± 58331000 olan kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalarak 39628000 ± 18534000 olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, EAT taşıyan farelere tek doz 5-FU enjeksiyonuna ek olarak ZY'nın da verildiği grupta hücre sayısının tedavi edilmemiş kontrole göre azaldığı ve 43653000 ± 16270000 olduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna göre aradaki ayrım istatistiksel bakımdan anlamlıdır ($p<0.05$). Elde edilen veriler çizelgede (4.7.) gösterilmiş olup bu verilerle grafik (Şekil 4.13.) çizilmiştir.

Çizelge 4.7. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata)

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + ZY(6gün)	280 100 000 ± 64 225 000
EAT + 5FU	39 628 000 ± 18 534 000*
EAT +5FU + ZY(6gün)	43 653 000 ± 16 270 000*

*: EAT kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.13. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı
*: EAT kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

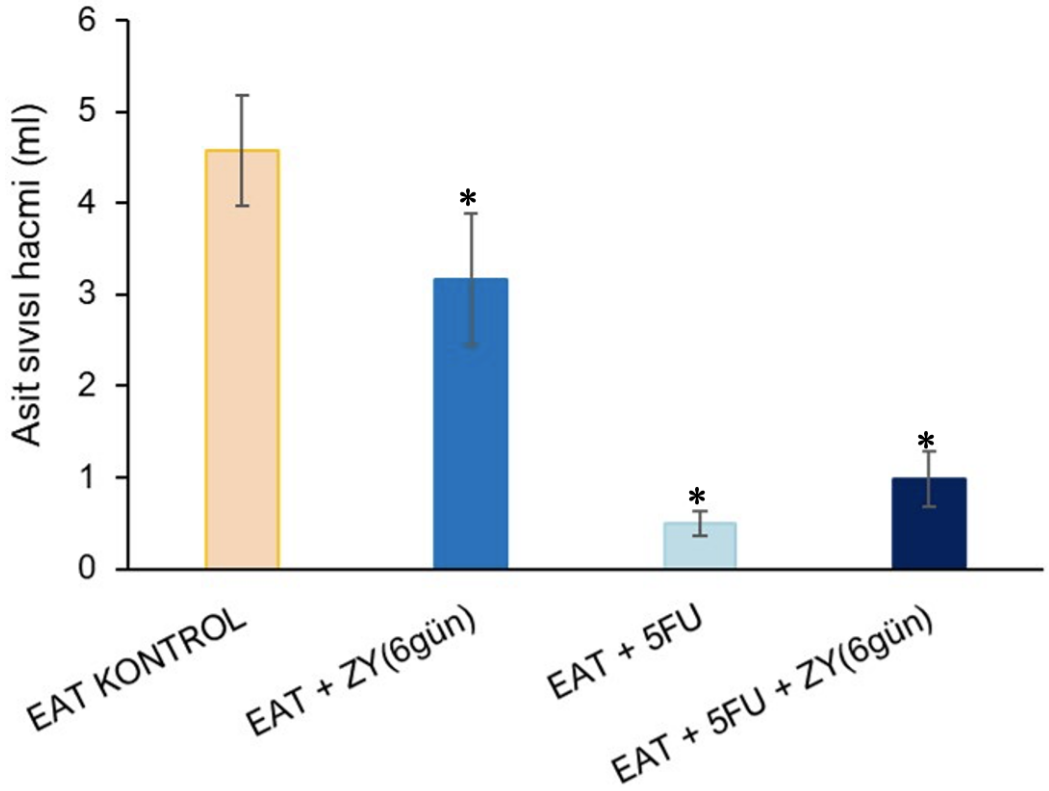
4.1.3.2. Asit sıvısı hacmi

Sakrifiye edilen farelerin peritonundan toplanan asit sıvılarının hacimleri ölçülmüş ve bütün gruplarda kontrole göre azaldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen verilerle çizilen grafik Şekil 4.14.'te izlenmektedir. Çizelge 4.8.'de gösterilen verilere göre ZY içirilen gruptaki asit sıvısı hacmi 3.17 ± 0.73 ml olarak ölçülmüş ve aradaki fark istatistik bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. 5-FU'in tek başına veya ZY ile kombine olarak uygulandığı gruplarda ise asit sıvısı hacminin 1 ml'den daha az olması dikkat çekmiştir. Bu gruplar ile kontrol arasındaki farkın da istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml) (± standart hata)

Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + ZY(6gün)	3.17 ± 0.73*
EAT + 5FU	0.5 ± 0.13*
EAT +5FU + ZY(6gün)	0.98 ± 0.31*

*: Kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

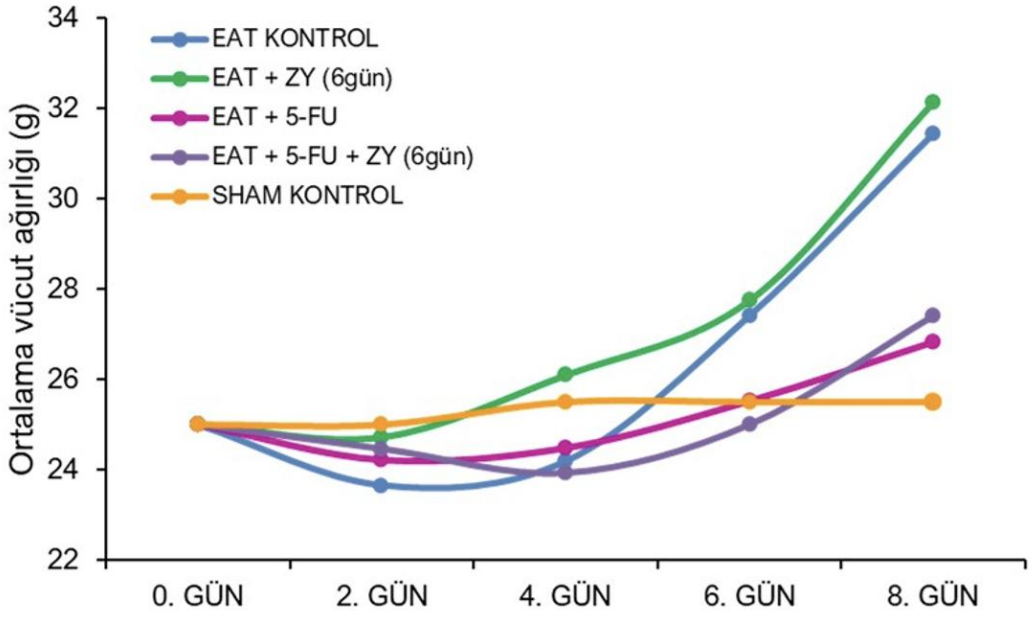


Şekil 4.14. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi
*: EAT kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.1.3.3. Vücut ağırlığı

ZY'nin tümör büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığını gözlemlemek için oluşturulan bu gruplarda, EAT inokülasyonundan sonraki 2. gün ZY içirilmeye başlanarak deney sonuna kadar hergün devam ederek toplamda 6 gün

ZY verilen EAT + ZY (6gün) grubunda vücut ağırlık değişiminin EAT kontrol grubu ile aynı eğilimde olduğu görülmüştür. Tek doz 5-FU ile tedavi edilen kanserli grup ile 5-FU ve ZY kombinasyonunun uygulandığı grupta vücut ağırlığı EAT kontrolde olduğu gibi 4. günden itibaren hafifçe artmıştır (Şekil 4.15.). Bu gruplarda asit sıvısı hacmi ve tümör hücre sayısının EAT kontrole göre çok düşük olması nedeniyle artış hızının az olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.15. EAT taşıyan ve 6 gün süreyle 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.1.3.4. Biyokimyasal analizler

Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerinin incelendiği grupta EAT inokulasyonundan sonraki 2. gün başlayan ve 6 gün devam eden ZY uygulamasının karaciğer üzerindeki etkilerini araştırmak için Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.9.'da özetlenmiş ve bu verilerle çizilen grafikler Şekil 4.16., 4.17. ve 4.18.'de gösterilmiştir. Veriler, ortalama ± standart hata olacak şekilde ifade edilmiştir (n = 7).

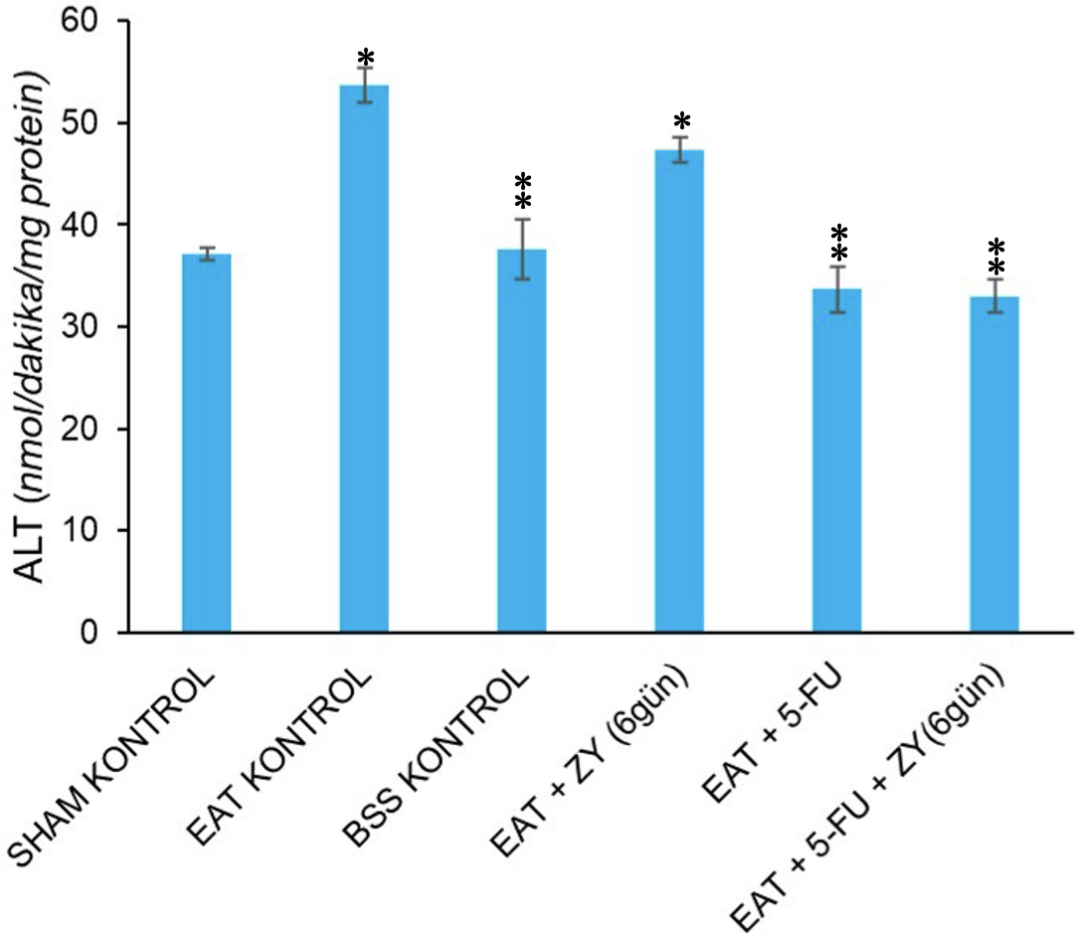
Çizelge 4.9. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

	Biyokimyasal parametreler		
Grup	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	37.58 ± 2.92^{z}	31.10 ± 1.19^{z}	312.44 ± 11.85
EAT + ZY(6gün)	47.31 ± 1.19^{b}	42.54 ± 1.63^{cx}	340.98 ± 15.44^{b}
EAT + 5FU	33.64 ± 2.30^{z}	21.43 ± 1.06^{cz}	244.06 ± 10.90^{y}
EAT +5FU + ZY(6gün)	33.01 ± 1.63^{z}	32.11 ± 1.49^{z}	298.24 ± 24.29

SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:$p<0.05$, b:$p<0.01$, c:$p<0.001$
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:$p<0.05$, y:$p<0.01$, z:$p<0.001$

Çizelge 4.9.'a göre ALT düzeyleri sham kontrol grubunda 37.14 ± 0.67 nmol/dk/mg protein olarak ölçülürken, meme kanserli farelerden oluşan EAT kontrol grubunda 53.68 ± 1.64'e çıktığı görülmüştür. EAT inokülasyonundan sonraki 2.gün başlanarak 6 gün ZY verilen grupta karaciğer dokusundaki ALT düzeyinin azalarak 47.31 ± 1.19 nmol/dk/mg protein olduğu bulunmuş, fakat bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Üstelik bu düzey sham kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde yüksektir. Pozitif kontrol olarak uygulanan 5-FU, ALT düzeyini tedavi edilmemiş EAT kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde azaltmıştır (33.64 ± 2.30 nmol/dk/mg protein). 5-FU ve ZY kombine olarak

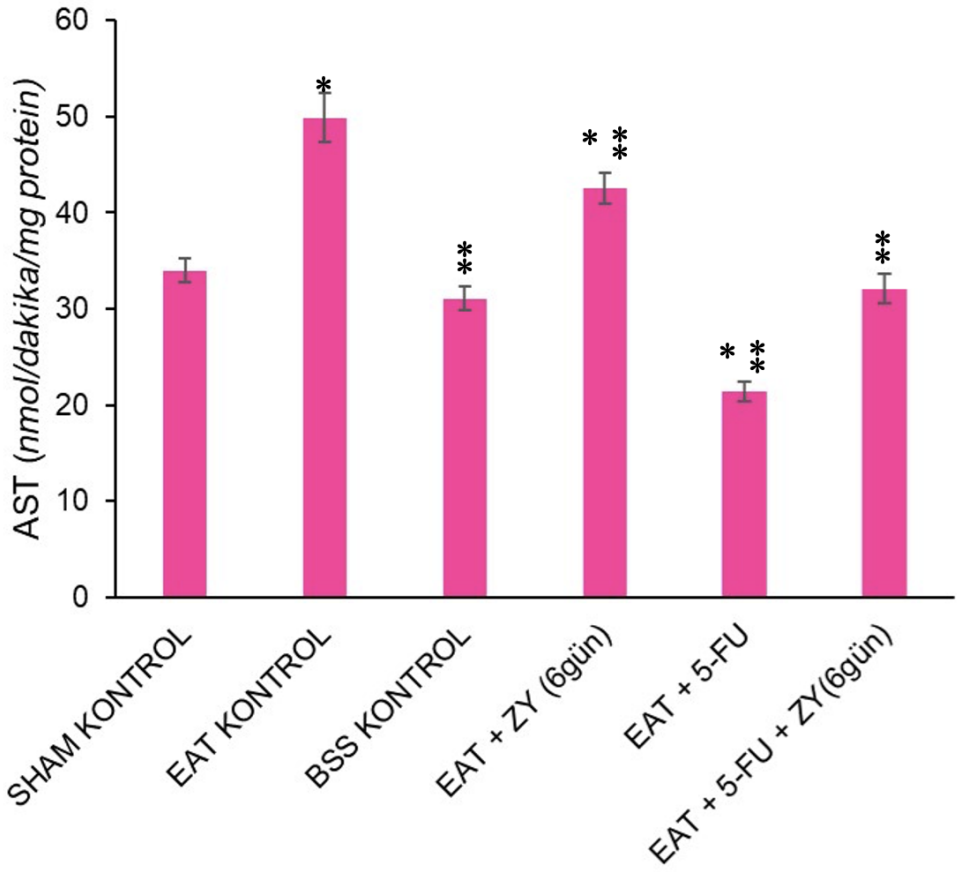
uygulandığında ALT düzeyi daha da azalarak 33.01 ± 1.63 nmol/dk/mg protein olmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda EAT kontrol grubu ile EAT + 5-FU + ZY (6gün) arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı olup 8 gün süreyle ZY içirilen grupta da ALT değerleri sham grubu ile yaklaşık çıkmıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Karaciğer dokusu AST düzeyleri ölçülmüş, sonuçlar Çizelge 4.9.'da ve Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. EAT kontrol grubunda 49.85 ± 2.55 nmol/dk/mg protein bulunan AST, ZY uygulamasıyla azalmış ve 42.54 ± 1.63 nmol/dk/mg proteine gerilemiştir. Ancak bu değer sağlıklı bireylerin yer aldığı sham kontrole (33.99 ±

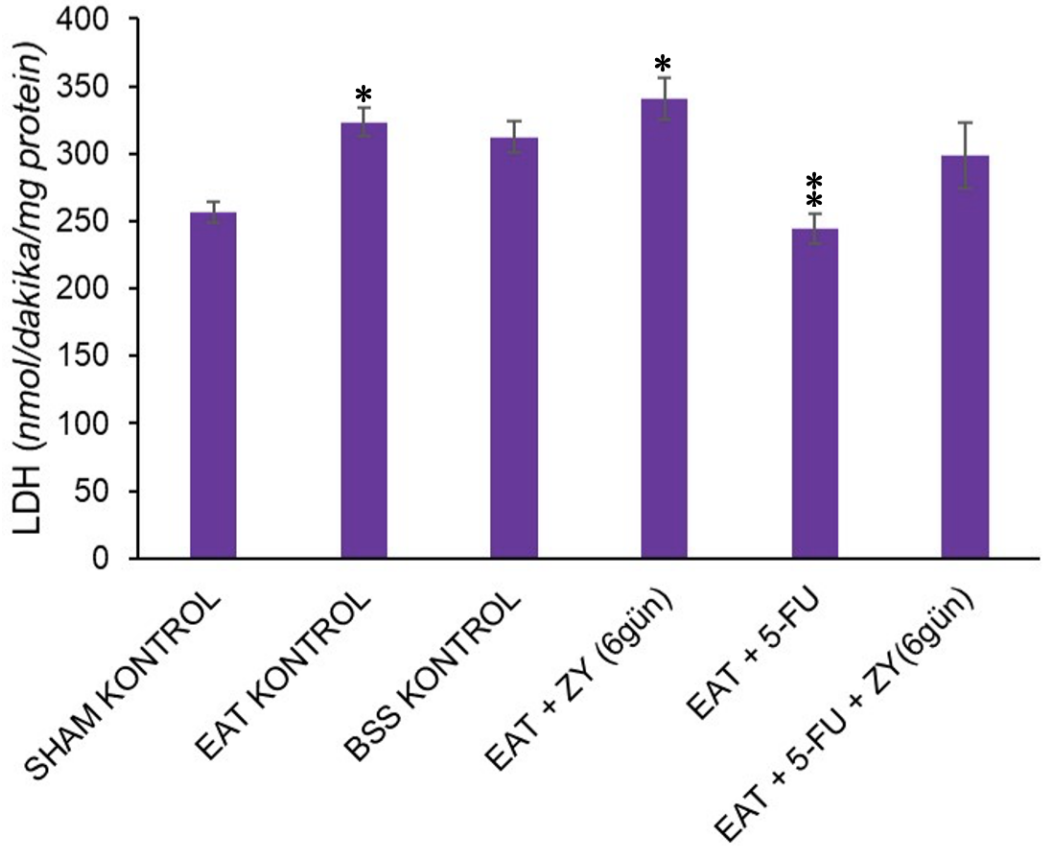
1.22 nmol/dk/mg protein) göre yüksektir. EAT + ZY (6gün) grubu ile hem EAT kontrol hem de sham kontrol grubu arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. 5-FU uygulanmasıyla AST düzeyi 21.43 ± 1.06 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür. EAT + 5-FU grubu ile hem EAT kontrol hem de sham kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0.05$). EAT + 5-FU + ZY (6gün) grubunda AST düzeyi, EAT kontrol grubuna göre azalmış ve 32.11 ± 1.49 nmol/dk/mg protein olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Sağlıklı bireylerden oluşan BSS kontrol grubu 8 gün süreyle ZY uygulamasından etkilenmemiş ve AST düzeyi sham kontrole benzer şekilde 31.10 ±1.19 nmol/dk/mg protein ölçülmüştür.



Şekil 4.17. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

LDH düzeyi de ölçülmüş ve Çizelge 4.9.'daki verilerle çizilen grafik Şekil 4. 18.'de izlenmektedir. EAT kontrol grubunda LDH düzeyi sham kontrole göre

anlamlı ($p<0.05$) şekilde artarak 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olmuştur. LDH düzeyi, EAT + ZY (6 gün) grubunda (340.98 ± 15.44 nmol/dk/mg protein), EAT kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu artış, istatistiksel bakımdan sham kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) bulunurken, EAT kontrol ile aradaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. LDH düzeyi, 5-FU ile tedavi edilen grupta, tedavi edilmemiş gruba göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalmış ve 244.06 ± 10.90 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür. BSS kontrol ve EAT + 5-FU + ZY (6 gün) gruplarında LDH düzeyleri sham kontrole göre artarken EAT kontrole göre azalmıştır. Ancak bu artış ve azalışların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Zeytin yaprağı çayının tümör büyümesi üzerindeki muhtemel etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.2. Oleuropeinin Etkileri

Oleuropein, zeytin yaprağının sulu ekstresinde en yüksek miktarda bulunan bileşenlerden birisidir (Gumushan Aktas ve Ayan, 2021). Bu nedenle çalışmanın bu kısmında, zeytin yaprağı çayının EAT taşıyan fareler üzerindeki muhtemel etkilerinin OL'den kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır.

4.2.1. Koruyucu etki

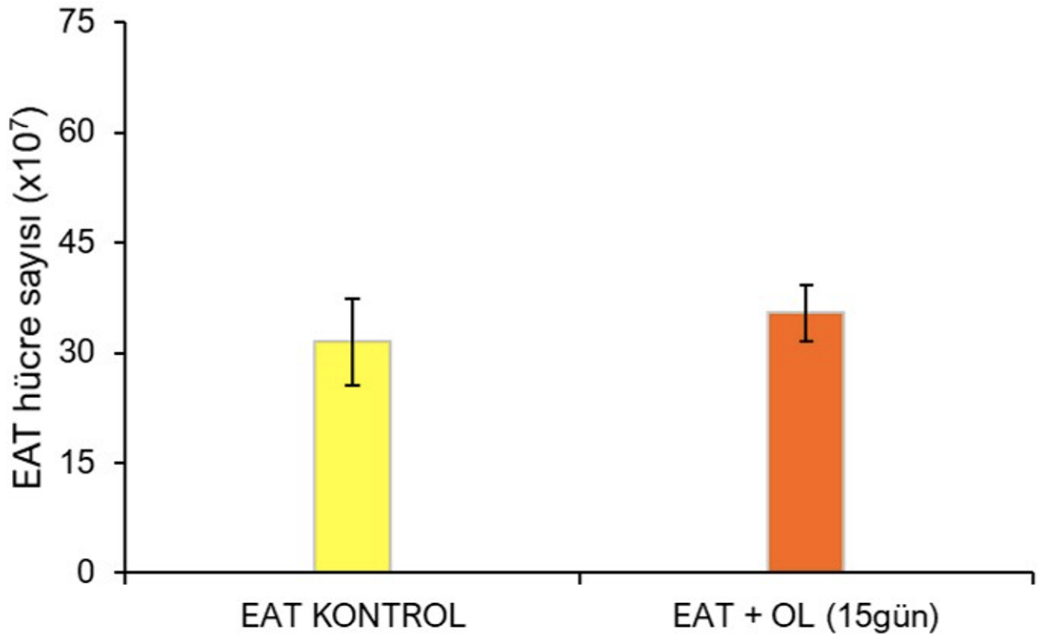
Saf haldeki OL'in organizmayı meme kanseri oluşumundan koruyucu etkisi olup olmadığını belirlemek için [grup adı: EAT + OL (15gün), n=7] farelere 15 gün boyunca her gün aynı saatte, Bölüm 3.2.3.'te anlatılan şekilde taze hazırlanmış OL, 150mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile verilmiştir. Uygulamanın 8. gününde 3×10^5 EAT hücresi grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiş ve OL uygulamasına devam edilmiştir.

4.2.1.1. Hücre proliferasyonu

OL uygulaması sonrası, Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde tripan mavisi kullanılarak Thoma lamında canlı hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.10.'da gösterilmiş olup bu veriler kullanılarak grafik çizilmiştir (Şekil 4.20.). OL uygulaması sonucunda hücre sayısının, herhangi bir tedavi uygulanmamış kontrol grubuna göre artarak 354440000 ± 38421460 olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10.). Deney grubundaki bu artış sonucu oluşan farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata)

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + OL (15gün)	354 440 000 ± 38 421 460



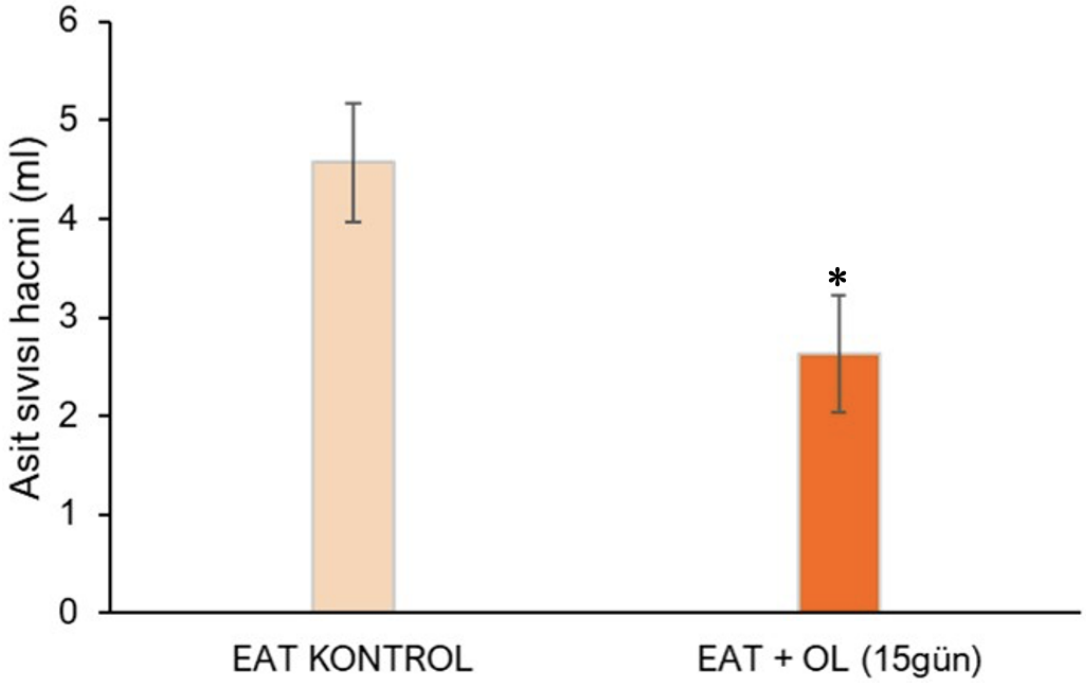
Şekil 4.20. 15 gün süreyle 150 mg/kg/gün oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı (± standart hata)

4.2.1.2. Asit sıvısı hacmi

OL'in 15 günlük uygulaması sonucunda hücre sayısındaki hafif artışa rağmen asit sıvısı hacminin azalarak 2.63 ± 0.56 ml olduğu görülmüştür (Çizelge 4.11.), Şekil 4.21.). Asit sıvısı hacmindeki bu azalma sonucu kontrol ve deney grupları arasında oluşan fark istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.11. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (± standart hata)

Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + OL (15gün)	2.63 ± 0.59*

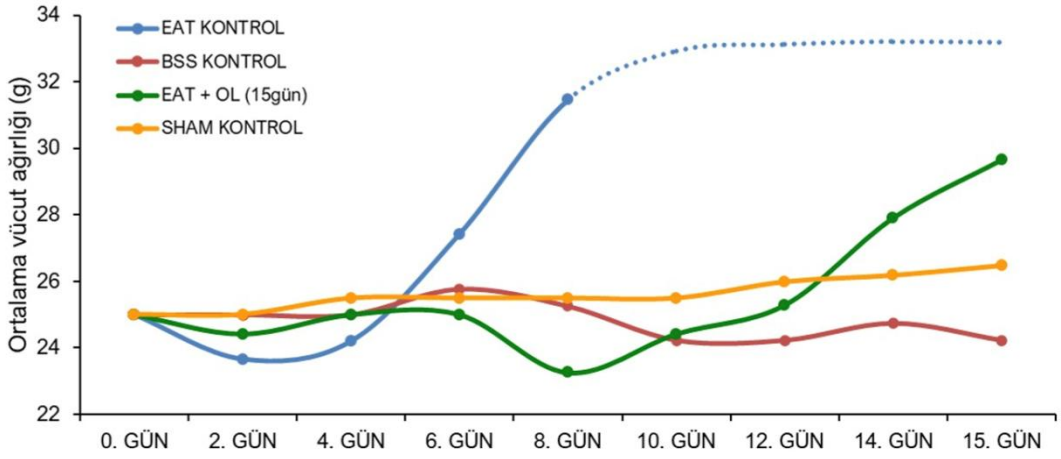


Şekil 4.21. 15 gün süreyle 150 mg/kg/gün oleuropein verilmiş farelerden elde edilen asit sıvısı hacmi
*: EAT kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.2.1.3. Vücut ağırlığı

EAT taşıyan, tedavi edilmemiş ve 8. güne kadar takibi yapılmış hayvanlarda 4. günden itibaren vücut ağırlıklarının sham kontrol grubuna kıyas ile anlamlı ($p<0.05$) şekilde arttığı, bunun tümör hücre sayısı ve asit sıvısı hacminin artışına bağlı olarak geliştiği görülmektedir (Şekil 4.22.). Sham kontrol ve BSS kontrol grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları 8. güne kadar 25 – 25.5 g aralığında iken sağlıklı olup OL içirilen BSS kontrol grubunda 10. günden itibaren azalarak 15. günde ise 24.2 g olarak tespit edilmiştir. Ancak Sham kontrol grubu ile aradaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) bulunmuştur. 15 gün süreyle OL verilen grupta vücut ağırlıkları BSS kontrol grubu ile benzer seyrederken bu gruba uygulamanın 8. gününde EAT hücre enjeksiyonu yapılmış; buna bağlı olarak hayvanların vücut ağırlıkları 12. günden (EAT inokülasyonunun 4. günü) itibaren artış eğilimine girmiş; ancak bu artış EAT kontrol grubundaki kadar yüksek olmamıştır. Bölüm 4.2.1.1. ve 4.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde OL verilen grupta EAT hücre sayısı EAT kontrol grubu ile benzer iken asit sıvısı hacmi anlamlı şekilde az bulunmuştur.

Bununla bağlantılı olarak vücut ağırlığındaki artış hızı EAT kontrol grubundan daha yavaştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, bu artış ile sham kontrol grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.



Şekil 4.22. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.2.1.4. Biyokimyasal analizler

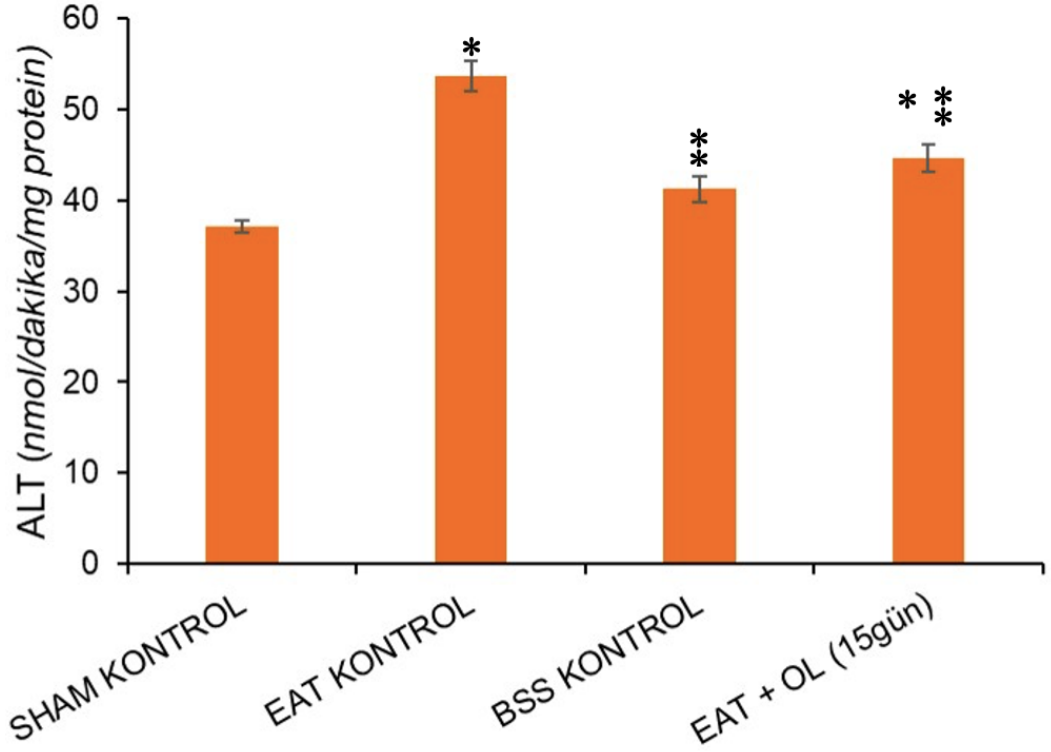
Çalışmanın bu kısmında, oleuropeinin uzun süreli uygulamasının sağlıklı ve meme kanserli bireylerde karaciğerde toksik etki oluşturup oluşturmayacağını gözlemlemek amacıyla Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.12.'de gösterilmiş; bu veriler kullanılarak grafikler çizilmiştir (Şekil 4.23. – 4.25.). Veriler, ortalama ± standart hata olacak şekilde ifade edilmiştir (n = 7).

Çizelge 4.12. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

Grup	Biyokimyasal parametreler		
	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	41.24 ± 1.44^{z}	38.72 ± 2.29^{y}	285.64 ± 9.23^{x}
EAT + OL(15gün)	44.70 ± 1.51^{ay}	39.25 ± 1.57^{y}	319.96 ± 9.60

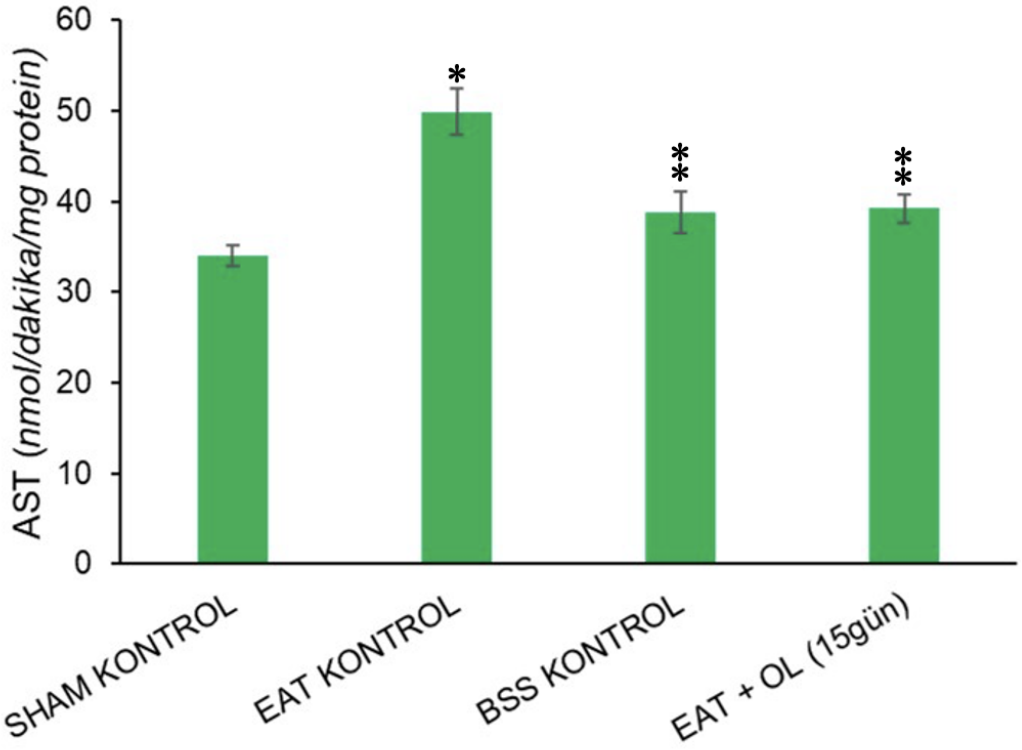
SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:$p<0.05$, b:$p<0.01$, c:$p<0.001$
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:$p<0.05$, y:$p<0.01$, z:$p<0.001$

Sham kontrol grubunda ALT düzeyleri 37.14 ± 0.67 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüş, EAT kontrol grubunda ise bu değerin 53.68 ± 1.64'e çıktığı görülmüştür ($p<0.05$). 15 gün süreyle OL içirilen ve uygulamanın 8.gününde EAT inokülasyonu yapılan EAT + OL (15gün) grubunda ALT düzeyinin (44.70 ± 1.51 nmol/dk/mg protein) EAT kontrol grubuna göre azaldığı; ancak sham kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre, EAT + OL (15 gün) grubu ile hem EAT kontrol grubu hem de sham kontrol grubu arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı olup 15 gün süreyle OL verilen grupta ise ALT değerlerinin sham grubuna göre hafifçe artarak 41.24 ± 1.44 nmol/dk/mg protein olduğu ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. BSS kontrol grubu verisi, EAT kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamlı ($p<0.05$) olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.12., Şekil 4.23.).



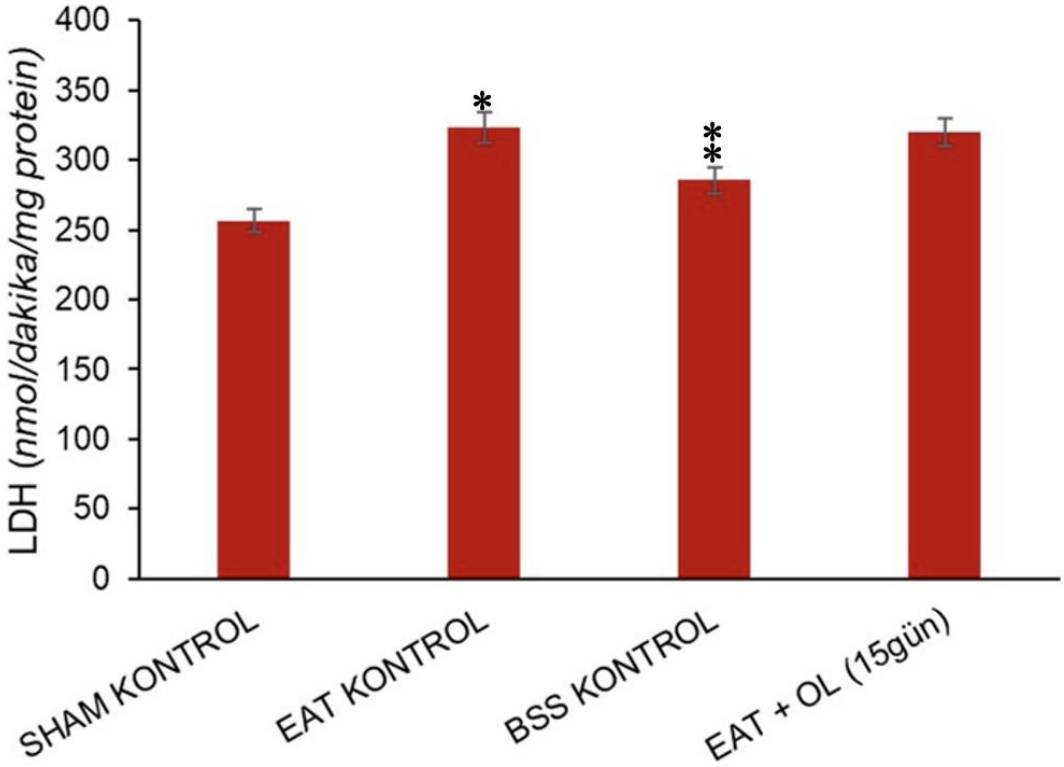
Şekil 4.23. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Çizelge 4.12.'e göre EAT kontrol grubunda karaciğer dokusu AST düzeyinin, sham kontrole göre arttığı görülmüş ve 49.85 ± 2.55 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür ($p<0.05$). 15 gün süreyle OL uygulamasının AST miktarını hem sağlıklı (BSS kontrol grubu: 38.72 ± 2.29 nmol/dk/mg protein) hem de EAT taşıyan farelerde [EAT + OL(15gün): 39.25 ± 1.57 nmol/dk/mg protein] sham kontrole göre hafifçe arttırmakla birlikte EAT kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.12., Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Sham kontrol grubunda 256.54 ± 8.14 nmol/dk/mg protein olan LDH enzim düzeylerinin EAT kontrol grubunda artarak 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olduğu ($p<0.05$) Çizelge 4.12.'de izlenmektedir. Sağlıklı farelere 15 gün süreyle OL içirilen BSS kontrol grubunda 285.64 ± 9.23 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür. BSS kontrol ile EAT kontrol arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. 15 gün OL verilen ve uygulamanın 8. gününde EAT inokülasyonu yapılan farelerde OL'nin LDH artışına (319.96 ± 9.60 nmol/dk/mg protein) engel olamadığı anlaşılmıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. 15 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilen farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.2.2. Tümör inisiyasyonu üzerindeki etki

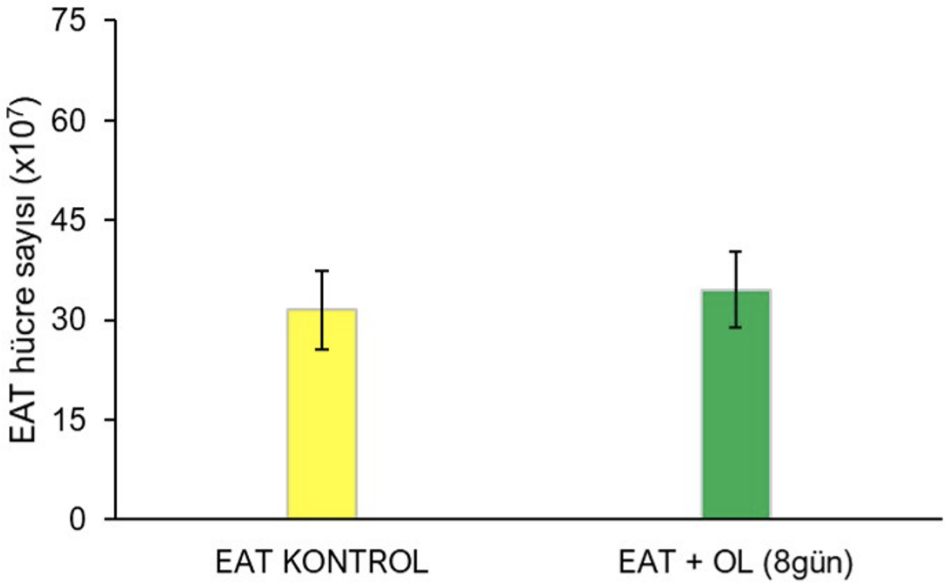
Oleuropeinin meme kanserinin başlaması üzerinde herhangi bir etki oluşturup oluşturmayacağını belirlemek için [grup adı: EAT + OL (8gün), n=7] grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine 3×10^5 EAT hücresi enjekte edilmiştir. EAT hücre inokülasyonu ile aynı gün başlanarak deney sonlandırılana kadar 8 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanmış OL, 150 mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir.

4.2.2.1. Hücre proliferasyonu

Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde tripan mavisi kullanılarak Thoma lamında hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.13.'te izlenmekte olup bu verilerle çizilen grafik Şekil 4.26.'da gösterilmektedir. Tümör hücre inokülasyonu ile aynı gün başlayarak 8 gün boyunca OL verilen farelerde tespit edilen hücre sayısının kontrole göre hafifçe artarak 345140000 ± 56531161 olduğu görülmektedir. Ancak yapılan istatistik değerlendirmeye göre bu artışın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + OL (8gün)	345 140 000 ± 56 531 161



Şekil 4.26. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı

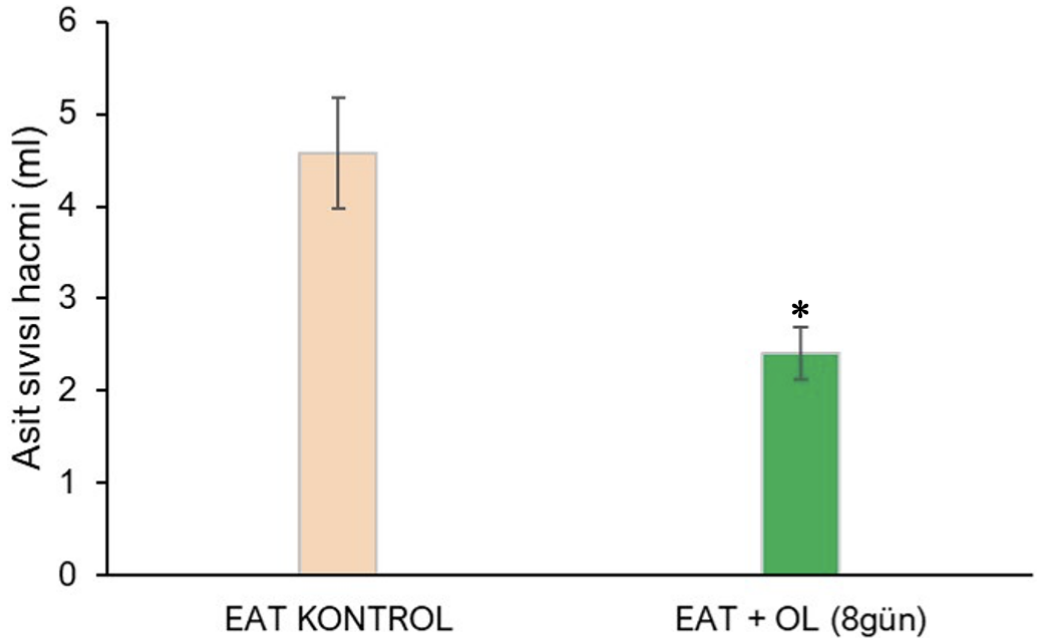
4.2.2.2. Asit sıvısı hacmi

Asit sıvısı hacmi, tedavi uygulanmamış EAT kontrol grubunda 4.58 ± 0.60 ml olarak ölçülmüştür. EAT taşıyan farelere 8 gün OL uygulanması sonucunda azalarak 2.40 ± 0.28 ml olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14.). Kontrol ve deney grupları arasındaki fark istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve anlamlı ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Çizelgedeki (4.14.) veriler kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.27.'de izlenmektedir.

Çizelge 4.14. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin peritonu içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml)

Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + OL (8gün)	2.40 ± 0.28*

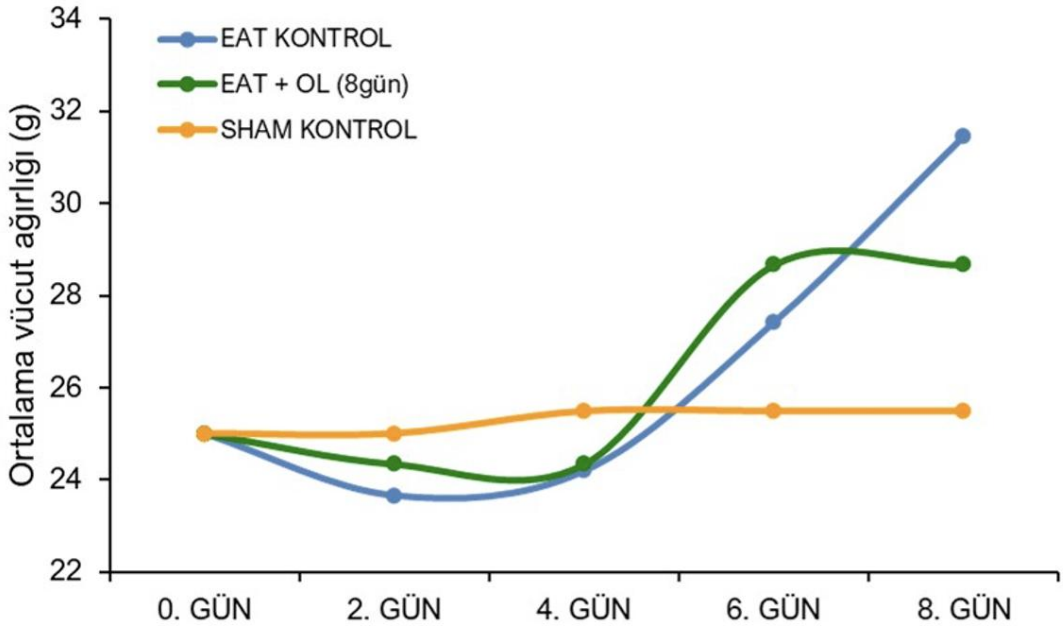
*: EAT kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.27. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin peritonu içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml)
*: EAT kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.2.2.3. Vücut ağırlığı

Herhangi bir tedavi uygulanmamış EAT kontrol grubundaki farelerin ortalama vücut ağırlığı tümör hücre sayısı ve asit sıvısı hacminin artışına bağlı olarak 4. günden itibaren artış eğilimine girmektedir. Bu gruptan elde edilen veriler sham kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı ($p<0.05$) fark olduğu görülmüştür. EAT inokülasyonu ile aynı gün OL başlanan grupta vücut ağırlığı 4. – 6. gün aralığında artarken, 8. günde değişmediği dikkati çekmektedir. Bunun sebebinin asit sıvısı hacminin EAT kontrole göre azalması olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.2.2.4. Biyokimyasal analizler

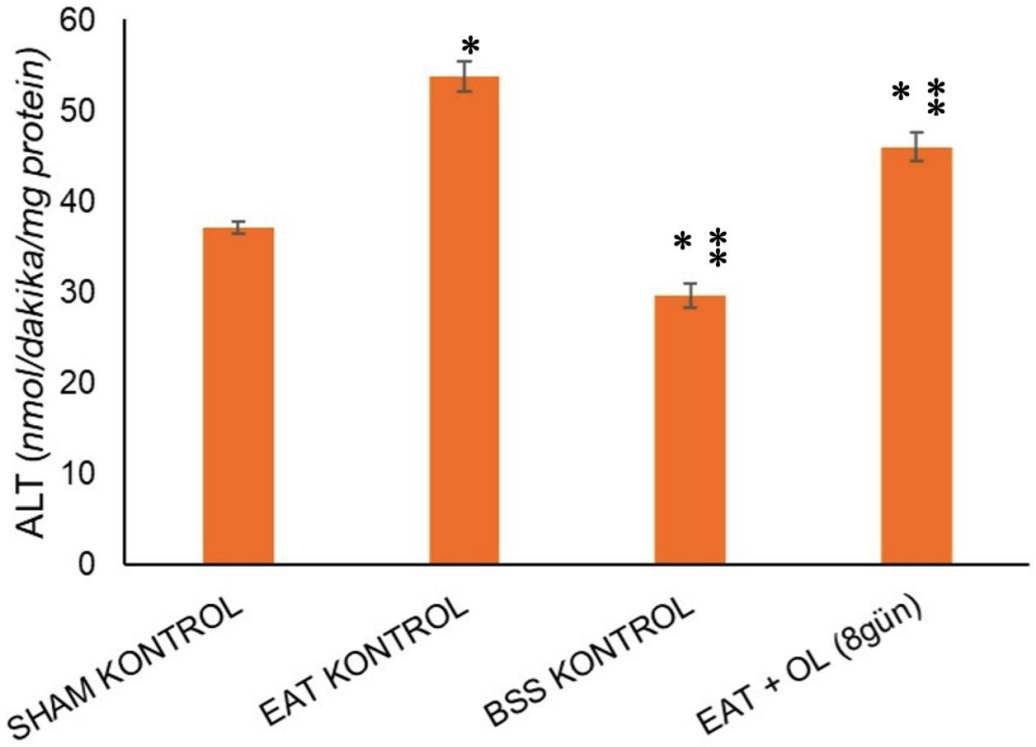
EAT inokulasyonu ile aynı gün başlanarak 8 gün boyunca oleuropein verilen grupta uygulamanın muhtemel hepatotoksisitesini araştırmak için Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.15.'te gösterilmiş olup bu veriler kullanılarak grafikler çizilmiştir (Şekil 4.29. – 4.31.). Veriler, ortalama ± standart hata olacak şekilde edilmiştir (n = 7).

Çizelge 4.15. Oleuropeinin tümör inisiyasyonu üzerinde etkisi olup olmadığını incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

	Biyokimyasal parametreler		
Grup	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	29.60 ± 1.30^{bz}	27.14 ± 1.17^{az}	236.97 ± 8.73^{z}
EAT + OL(8gün)	45.96 ± 1.54^{cy}	42.05 ± 1.58^{ax}	347.34 ± 17.56^{c}

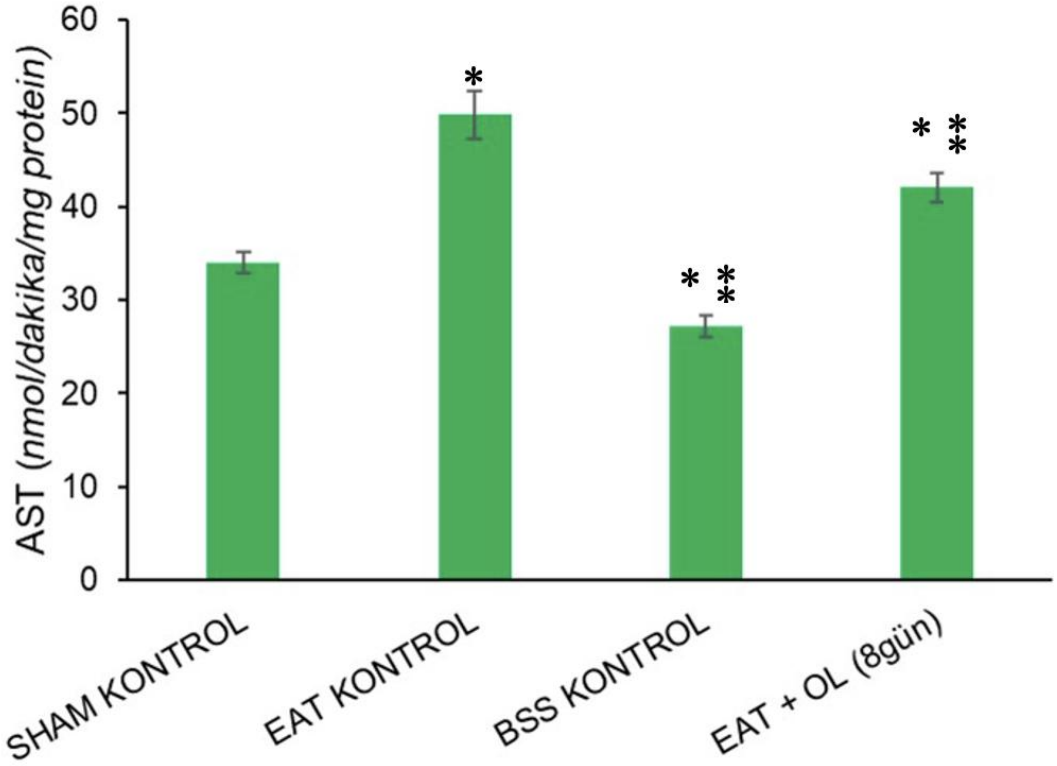
SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:$p<0.05$, b:$p<0.01$, c:$p<0.001$
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:$p<0.05$, y:$p<0.01$, z:$p<0.001$

Çizelge 4.15. ve Şekil 4.29. incelendiğinde, karaciğer dokusu ALT düzeylerinin, EAT kontrol grubunda 53.68 ± 1.64 nmol/dk/mg protein iken EAT taşıyan ve EAT inokülasyonu ile aynı gün OL verilmeye başlanan grupta azalarak 45.96 ± 1.54 nmol/dk/mg protein olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Ancak EAT + OL (8gün) grubunda ölçülen bu değerin, sham kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Sağlıklı bireylerde 8 günlük OL uygulamasının ALT düzeyini (29.60 ± 1.30 nmol/dk/mg protein) sham grubuna ve dolayısıyla EAT kontrol grubuna göre baskıladığı ($p<0.05$) görülmüştür.



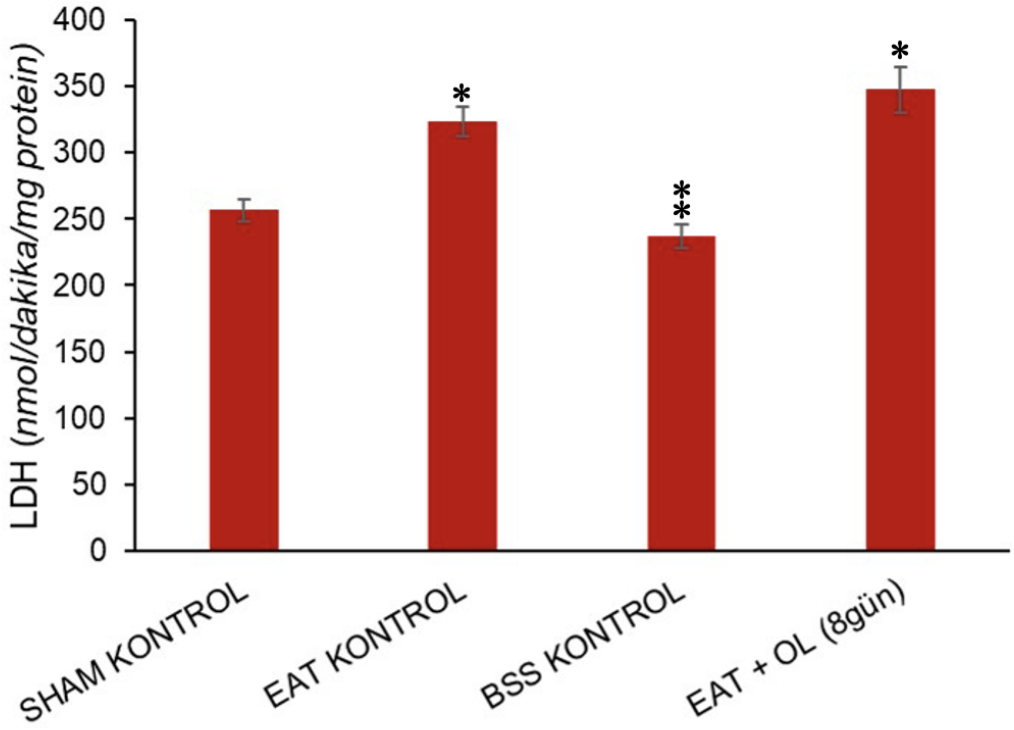
Şekil 4.29. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Çizelge 4.15.'te, ALT ile benzer şekilde, AST düzeylerinin EAT + OL (8 gün) grubunda (42.05 ± 1.58 nmol/dk/mg protein) EAT kontrole (49.85 ± 2.55 nmol/dk/mg protein) göre azaldığı ancak sham kontrole (33.99 ± 1.22 nmol/dk/mg protein) göre arttığı görülmektedir. Bu değişimler istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı bireylere 8 gün OL verilmesi sonucunda AST değerinin (27.14 ± 1.17 nmol/dk/mg protein) sham kontrole göre ve dolayısıyla EAT kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

EAT taşıyan farelerde, karaciğer hasarının bir belirteci olarak, LDH enzim düzeyi 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olarak belirlenmiştir. OL uygulaması sonucunda LDH düzeyinin artarak (347.34 ± 17.56 nmol/dk/mg protein) EAT kontrol grubu verisinin de üzerine çıktığı, bu artışın sham kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) olduğu fark edilmiştir. Sham grubunda 256.54 ± 8.14 nmol/dk/mg protein olan LDH düzeyinin, sağlıklı bireylere 8 gün OL verilen BSS kontrol grubunda 236.97 ± 8.73 nmol/dk/mg protein seviyesine gerilediği gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede EAT kontrol ile BSS kontrol grupları arasındaki farkın anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.15., Şekil 4.31.).



Şekil 4.31. Tümör inisiyasyonu üzerinde etkili olup olmadığını gözlemlemek için 8 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerin karaciğer dokusunda ölçülen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.2.3. Tümör büyümesi üzerindeki etki

Çalışmanın bu kısmında oleuropeinin tümör büyümesi üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. 3×10^5 EAT hücresi, EAT + OL (6 gün), (n=7) grubundaki her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiştir. EAT hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün başlanarak deney sonlandırılana kadar 6 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanmış OL, 150 mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. Ayrıca meme kanserinin tedavisi için kullanılan bir kemoterapötik ajan olan 5-Fluorourasil de EAT hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün 20mg/kg konsantrasyonda tek doz olarak periton içerisine enjekte edilmiş ve pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Karşılaştırma amacıyla 5-FU ve OL'in kombinasyonunun uygulandığı bir grup daha oluşturulmuştur.

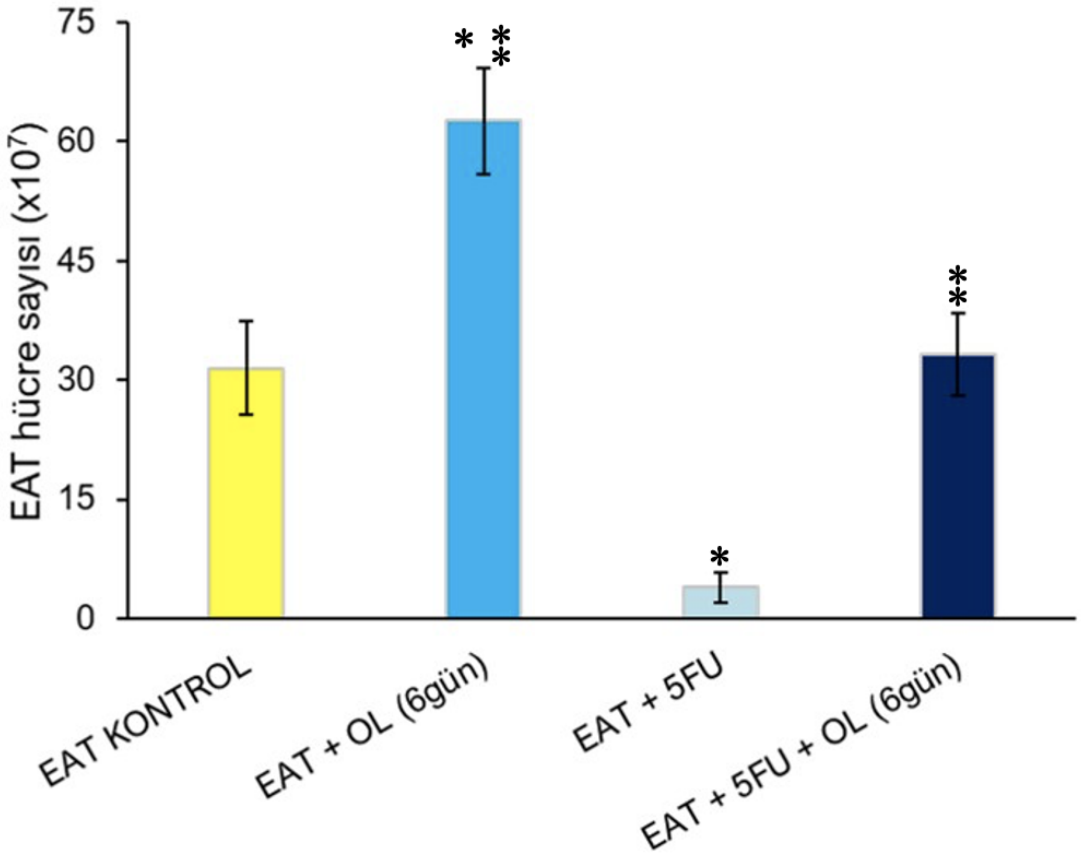
4.2.3.1. Hücre proliferasyonu

Oleuropeinin tümör büyümesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu grupta elde edilen veriler Çizelge 4.16.'da gösterilmiş olup bu verilerle çizilen grafik Şekil 4.32.'de izlenmektedir. Tedavi uygulanmamış EAT kontrol grubunda deney sonunda toplam canlı hücre sayısı 314770000 ± 58331000 iken farelere EAT hücre inokülasyonundan sonraki ikinci gün başlayarak 6 gün süreyle OL içirilmesinin ardından toplam canlı hücre sayısının yaklaşık iki katına çıktığı ve 625910000 ± 67018000 olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Meme kanseri için klinikte kullanılan bir kemoterapötik olan 5-FU, pozitif kontrol amacıyla tek doz uygulanmış ve hücre sayısının kontrole göre azalarak 39628000 ± 18534000 olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). EAT taşıyan farelere tek doz 5-FU enjeksiyonuna ek olarak OL'in verildiği grupta hücre sayısı, tedavi edilmemiş kontrole göre hafifçe artarak 332076000 ± 52138866 olmuştur. Bu veriler, EAT + 5-FU grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısındaki artışın anlamlı ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Ayrıca EAT + OL (6 gün) grubu ile EAT + 5-FU + OL (6 gün) grupları arasında da anlamlı fark ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde OL uygulamasının hücre çoğalmasını teşvik ettiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.16. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerden elde edilen EAT hücre sayısı

Grup	Tümör hücre sayısı (toplam)
EAT KONTROL	314 770 000 ± 58 331 000
EAT + OL(6gün)	625 910 000 ± 67 018 000* ‡
EAT + 5FU	39 628 000 ± 18 533 774*
EAT +5FU + OL(6gün)	332 076 000 ± 52 138 866‡

*: EAT Kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT + 5FU'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.32. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein uygulanmış farelerden elde edilen EAT hücre sayısı
*: EAT Kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT + 5FU'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

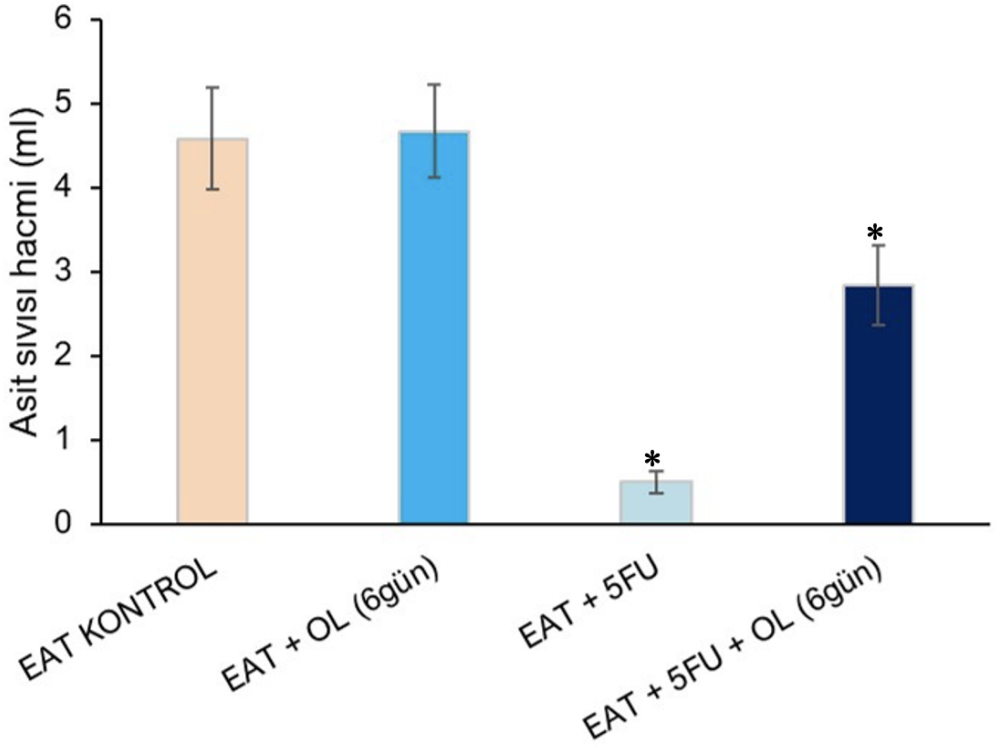
4.2.3.2. Asit sıvısı hacmi

Sakrifiye edilen farelerin peritonundan toplanan asit sıvılarının hacimleri ölçülmüş, elde edilen veriler Çizelge 4.17.'de gösterilmiştir. Çizelge (4.17.) ve buna göre çizilen grafik (Şekil 4.33.) incelendiğinde EAT + OL(6gün) grubundaki asit sıvısı hacminin EAT kontrol ile benzer olduğu görülmüştür. EAT + 5-FU grubunda asit sıvısı hacmi 0.5 ml iken OL'in 6 gün uygulanmasıyla [EAT + 5FU + OL(6gün) grubu] asit sıvısı hacminin artarak 2.84 ± 0.48 ml olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu hacim EAT kontrol ile karşılaştırıldığında azalma ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.17. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml)

Grup	Asit sıvısı hacmi (ml)
EAT KONTROL	4.58 ± 0.60
EAT + OL(6gün)	4.67 ± 5573
EAT + 5FU	0.5 ± 0.13*
EAT +5FU + OL(6gün)	2.84 ± 0.48*

*: EAT Kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

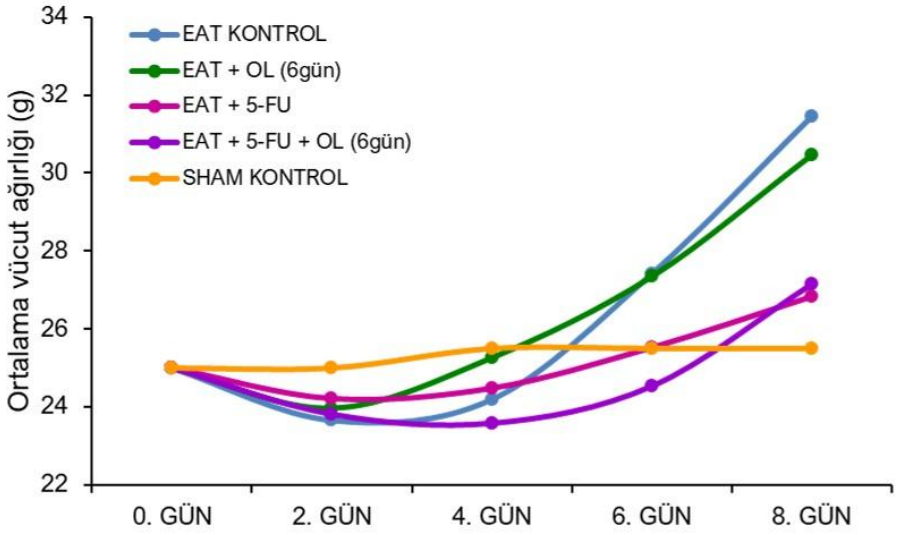


Şekil 4.33. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin periton içerisinden toplanan asit sıvısı hacmi (ml)
*: EAT Kontrole göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.2.3.3. Vücut ağırlığı

Oleuropeinin tümör büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığını gözlemlemek için oluşturulan bu gruplarda, EAT inokülasyonundan sonraki 2. gün

OL içirilmeye başlanan gruptaki hayvanların ortalama vücut ağırlık değişiminin EAT kontrol grubu ile aynı eğilimde olduğu görülmüştür. Tek doz 5-FU ile tedavi edilen kanserli grup ile 5-FU ve ZY kombinasyonunun uygulandığı grupta vücut ağırlığı EAT kontrolde olduğu gibi 4. günden itibaren hafifçe artmıştır (Şekil 4.34.). Bu gruplarda asit sıvısı hacminin EAT kontrole göre düşük olması nedeniyle artış hızının az olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.34. EAT taşıyan ve 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş farelerin ortalama vücut ağırlıkları

4.2.3.4. Biyokimyasal analizler

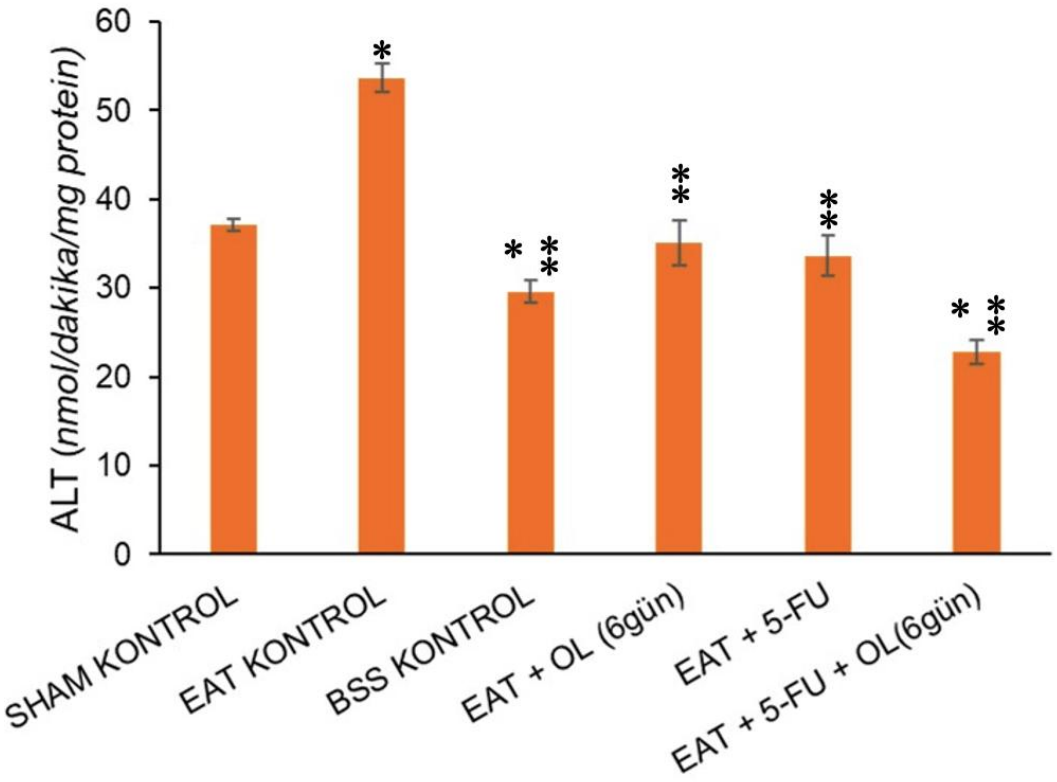
Oleuropeinin tümör büyümesi üzerindeki olası etkilerinin incelendiği grupta EAT inokulasyonundan sonraki 2. gün başlayan ve 6 gün devam eden OL uygulamasının karaciğer üzerindeki etkilerini araştırmak için Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde karaciğer dokularında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri (nmol/dk/mg protein) ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.18.'de özetlenmiş ve bu verilerle çizilen grafikler Şekil 4.35., 4.36. ve 4.37.'de gösterilmiştir. Veriler, ortalama ± standart hata olacak şekilde ifade edilmiştir (n = 7).

Çizelge 4.18. Oleuropeinin tümör büyümesi üzerindeki etkilerini incelemek için oluşturulan gruplarda karaciğer dokusunda ölçülen ALT, AST ve LDH düzeyleri (nmol/dk/mg protein) (ortalama±standart hata)

Grup	Biyokimyasal parametreler		
	ALT	AST	LDH
SHAM KONTROL	37.14 ± 0.67	33.99 ± 1.22	256.54 ± 8.14
EAT KONTROL	53.68 ± 1.64^{c}	49.85 ± 2.55^{c}	323.28 ± 10.76^{a}
BSS KONTROL	29.60 ± 1.30^{az}	27.14 ± 1.17^{az}	236.97 ± 8.73^{z}
EAT + OL(6gün)	35.13 ± 2.52^{z}	32.32 ± 1.86^{z}	273.21 ± 9.07^{x}
EAT + 5FU	33.64 ± 2.30^{z}	21.43 ± 1.06^{cz}	244.06 ± 10.90^{y}
EAT +5FU + OL(6gün)	22.73 ± 1.35^{cz}	27.30 ± 1.48^{z}	248.14 ± 11.99^{z}

SHAM KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: a:$p<0.05$, b:$p<0.01$, c:$p<0.001$
EAT KONTROL grubuna göre diğer grupların karşılaştırılması: x:$p<0.05$, y:$p<0.01$, z:$p<0.001$

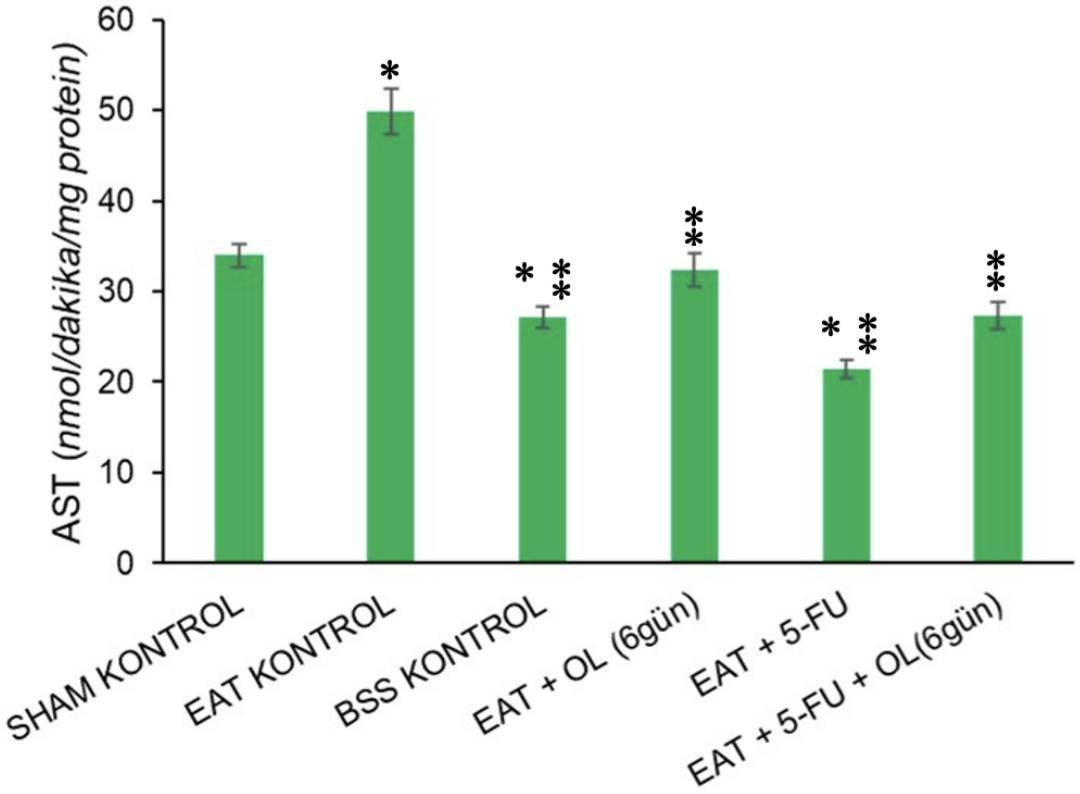
Çizelge 4.18.'e göre ALT düzeyleri sham kontrol grubunda 37.14 ± 0.67 nmol/dk/mg protein olarak ölçülürken, meme kanserli farelerden oluşan EAT kontrol grubunda 53.68 ± 1.64'e çıktığı görülmüştür ($p<0.05$). EAT inokülasyonundan sonraki 2.gün başlanarak 6 gün OL verilen grupta karaciğer dokusundaki ALT düzeyinin EAT kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalarak 35.13 ± 2.52 nmol/dk/mg protein olduğu bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak uygulanan 5-FU, ALT düzeyini EAT kontrol grubuna kıyas ile anlamlı ($p<0.05$) şekilde azaltmıştır (33.64 ± 2.30 nmol/dk/mg protein). 5-FU ve OL kombine olarak uygulandığında ALT düzeyi, dikkat çekici biçimde azalarak 22.73 ± 1.35 nmol/dk/mg protein olmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda EAT + 5-FU + OL (6gün) grubu ile hem EAT kontrol grubu hem de sham kontrol grupları arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Benzer şekilde, sağlıklı olup 8 gün süreyle OL verilen grupta BSS kontrol grubunda ALT değeri (29.60 ± 1.30 nmol/dk/mg protein) hem sham kontrol hem de EAT kontrol grubuna kıyas ile anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalmıştır (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

Oleuropein uygulaması sonucunda elde edilen karaciğer dokusu AST düzeyleri Çizelge 4.18.'de ve Şekil 4.36.'da gösterilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmaış sağlıklı bireylerde 33.99 ± 1.22 nmol/dk/mg protein olan AST düzeyi EAT kontrol grubunda 49.85 ± 2.55 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür. EAT taşıyan farelere 6 gün süreyle OL verilmesiyle AST düzeylerinin sham kontrol değerlerine geri dönmesinin sağlandığı görülmektedir. EAT + OL (6 gün) grubunda AST düzeyi 32.32 ± 1.86 nmol/dk/mg protein olarak tespit edilmiştir. OL, 5-FU ile kombine şekilde uygulandığında AST daha da azalmış ve 27.30 ± 1.48 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüştür. Bu iki grupla EAT kontrol grubu arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. AST, pozitif kontrol olarak değerlendirilen EAT + 5FU grubunda 21.43 ± 1.06 nmol/dk/mg protein iken sağlıklı bireylerden

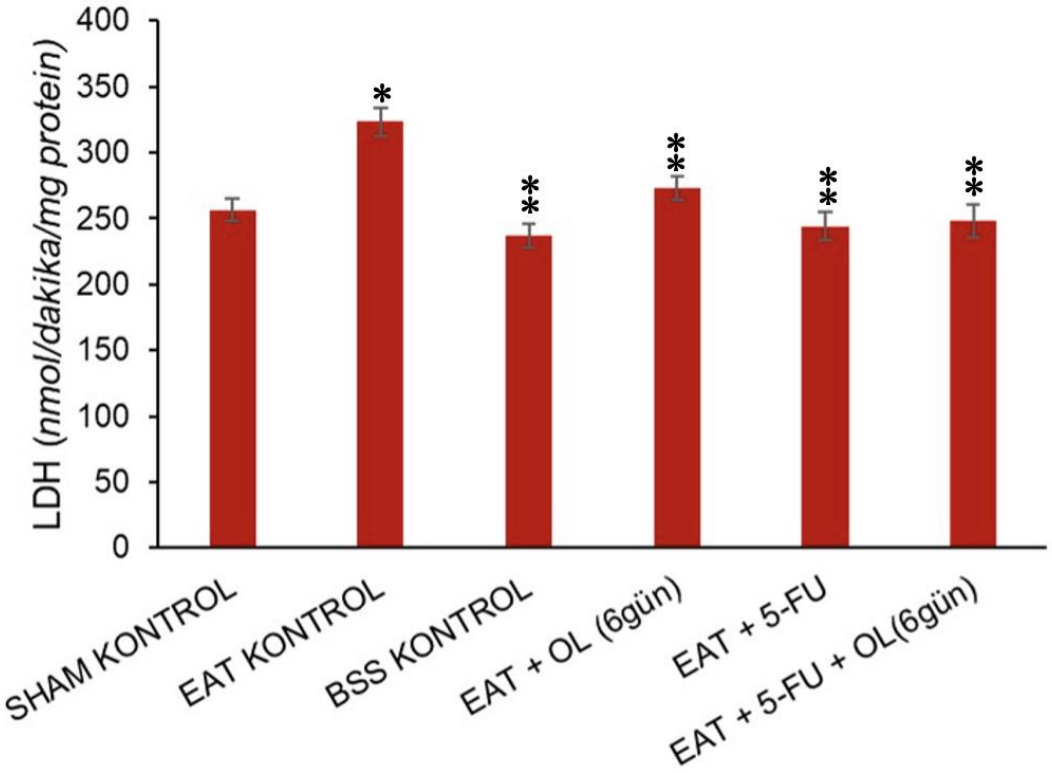
oluşan ve 8 gün süreyle OL verilen BSS kontrol grubunda 27.14 ± 1.17 nmol/dk/mg protein olarak tespit edilmiştir. Bu gruplarla hem sham kontrol hem de EAT kontrol grupları arasında anlamlı ($p<0.05$) fark vardır.



Şekil 4.36. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

LDH düzeyi, sham kontrol grubunda 256.54 ± 8.14 nmol/dk/mg protein olarak ölçülmüş (Çizelge 4.18., Şekil 4.37.); EAT kontrol grubunda anlamlı ($p<0.05$) şekilde artarak 323.28 ± 10.76 nmol/dk/mg protein olmuştur. EAT taşıyan farelere OL ve 5-FU'in tek tek ve kombine olarak uygulanması sonucunda LDH düzeyleri EAT kontrole göre anlamlı şekilde azalmış ve EAT + OL (6 gün) grubunda 273.21 ± 9.07 nmol/dk/mg protein; EAT + 5FU grubunda 244.06 ± 10.90 nmol/dk/mg protein ve EAT + 5FU + OL (6 gün) grubunda 248.14 ± 11.99 nmol/dk/mg protein olarak tespit edilmiştir. Bu gruplar ile EAT kontrol arasındaki fark istatistiksel bakımdan değerlendirilmiş ve anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Sağlıklı bireylere 8 gün süreyle

OL verilen BSS kontrol grubunda LDH düzeyi (236.97 ± 8.73 nmol/dk/mg protein) sham kontrol grubuyla benzer bulunmuştur.



Şekil 4.37. Tümör büyümesi üzerindeki etkiyi gözlemlemek için 6 gün süreyle 150 mg/kg oleuropein verilmiş fare karaciğer dokusunda tespit edilen Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri
*: Sham kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).
‡: EAT kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.3. Genel Değerlendirme ve Tartışma

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde, kadınlarda hem görülme sıklığı hem de ölüm oranı bakımından ilk sırada yer almaktadır (IARC, 2022). Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla meydana gelir. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %5 ila 10'unun ailesel geçişli olduğu bildirilmektedir. *BRCA1, BRCA2, TP53* ve *PTEN* ailesel geçişli meme kanserinden sorumlu genler arasında ilk akla gelenlerdir (Petrucelli ve ark., 1998). Meme kanseri için genel olarak genetik (cinsiyet, mutasyonlar, etnisite, vb.), çevresel, hormonal ve psikososyal etkenler ile ileri yaş, fiziksel aktivite, obezite, beslenme ve yaşam tarzı önemli risk faktörleridir. (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). Beslenme, pek çok kanser çeşitinde olduğu gibi meme kanserinde de en önemli faktörlerden biridir (Bingham ve Riboli, 2004). Doğru beslenme ve uygun fiziksel aktivite ile vücut kütlesinin korunmasıyla zaman içinde kanser görülme sıklığının azaltılabileceği öngörülmektedir (World Cancer Research Fund, 2018). Birçok çalışmada meme kanseri riskinin alkollü içeceklerin tüketim miktarı ile doğru orantılı olduğunu gösterilmiştir (Suzuki ve ark., 2005; Allen ve ark., 2009; Shield ve ark., 2016). Diyet bileşenlerinin kanser hücrelerinin temel özellikleri üzerinde etkili olabileceği rapor edilmektedir (Wiseman, 2019). Örneğin bitkiler tarafından üretilen çeşitli metabolitler, bazı pestisitler, aflatoksinler gibi besinlerde çoğalan küfler tarafından ortaya çıkarılan ikincil metabolitler ile besin hazırlama ve muhafaza etme yöntemleri de kansere neden olabilmektedir (Bode ve Dong, 2015). Bitki metabolitleri, aynı zamanda, kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılabilmektedir.

Zeytin yaprağı, özellikle Akdeniz ülkelerinde geleneksel ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (EMA, 2011). İçeriğindeki bileşenler sayesinde hipotansif, antiaritmik, antiaterosklerotik (Somova ve ark., 2003; Somova ve ark., 2004), antidiyabetik (Al-Attar ve Alsalmi, 2017), vazodilatatör, antimikrobiyal (Sudjana ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010), antiviral (Lee-Huang ve ark., 2003; Micol ve ark., 2005) etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Çeşitli kanser hücre hatları üzerinde çalışmalar

yapılmış ve hücre proliferasyonunu baskılayıcı, programlı hücre ölümünü indükleyici etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Goulas ve ark., 2009; Fares ve ark., 2011; Samet ve ark., 2014). Zeytin yapraklarında en yüksek oranda bulunan fenolik bileşenlerden olan Oleuropeinin (Duke, 1992; Luque de Castro ve Priego Capote, 2010; Gumushan Aktas ve Ayan, 2021), antioksidan, damar genişletici (Duke, 1992), antiviral (Omar, 2010) ve antimikrobiyal (Harborne ve ark., 1999) aktiviteler sergilediği ve kalp sağlığını korumaya yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca oleuropeinin prostat, mesane, meme kanseri gibi çeşitli hücre hatlarına karşı antikanser aktivite sergilediği de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Bulotta ve ark., 2011; Acquaviva ve ark., 2012; Elamin ve ark., 2013). Literatürde, zeytin yaprak ekstraktlarının veya oleuropeinin Ehrlich ascites meme kanseri modeli taşıyan farelere etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, zeytin yaprağı çayının bir meme kanseri modeli olan Ehrlich ascites tümörü taşıyan farelerde, hücre çoğalması üzerindeki etkileri incelenmiş; sağlıklı ve tümörlü hayvanlarda doku hasarı oluşturup oluşturmadığı biyokimyasal olarak araştırılmıştır. Bunun için, Bölüm 3.2.1.'de anlatılan şekilde, sağlıklı veya EAT inoküle edilmiş farelere ZY ve OL ayrı ayrı 6, 8 veya 15 günlük sürelerle uygulanmıştır. Deney prosedürü boyunca hayvanlar günlük olarak gözlemlenmiş ve gün aşırı tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir. Günlük takip sırasında hayvanlarda ZY veya OL nedeniyle herhangi bir aktivite kaybı, iştah azalması vb. değişiklik gözlemlenmemiştir. Sağlıklı veya meme kanserli bireylere 6, 8 ya da 15 gün süreyle ZY veya OL uygulanmasının, hayvanların vücut ağırlıklarında pozitif ya da negatif yönde bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir. EAT taşıyan gruplardaki hayvanların ortalama vücut ağırlıklarındaki artış, hayvanların sahip olduğu tümör hücre sayısı ve asit sıvısı hacminden kaynaklanmıştır.

Çalışma kapsamında, zeytin yaprağı çayı (ZY), meme kanserinden koruyucu etkisi olup olmadığını gözlemlemek için, 15 gün süreyle hergün aynı saatte, taze hazırlanarak 400 mg/kg konsantrasyonda olacak şekilde gruptaki her bir fareye gastrik gavaj kanülü ile içirilmiştir. Uygulamanın 8. gününde, 3×10^5 EAT hücresi, grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiş ve ZY uygulamasına

devam edilmiştir. Uygulama sonucunda EAT hücre sayısınının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda asit sıvısı hacminde de anlamlı bir azalış belirlenmiştir. Böylece, zeytin yaprağı çayının, tümör oluşumundan önce başlamak üzere, hergün taze hazırlanmak suretiyle 400 mg/kg konsantrasyonda farelere içirildiğinde, çalışılan deneysel model bazında, meme kanserinden koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. ZY'nın gösterdiği bu koruyucu etkinin OL'den kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için saf haldeki OL, farelere 15 gün boyunca her gün aynı saatte, taze hazırlanarak 150mg/kg konsantrasyonda içirilmiştir. Uygulamanın 8. gününde 3×10^5 EAT hücresi grupta yer alan her hayvanın peritonu içerisine enjekte edilmiş ve OL uygulamasına devam edilmiştir. Uygulama sonucunda EAT hücre sayısı kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Asit sıvısı hacminde ise anlamlı bir azalış görülmüştür.

Çalışmamızda, ZY'nın, EAT hücre enjeksiyonuyla aynı gün başlanarak 8 gün süreyle yine hergün aynı saatte, taze hazırlanarak 400 mg/kg konsantrasyonda uygulanmasının tümör inisiyasyonu üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı saptanmıştır. Ne hücre sayısı ne de asit sıvısı hacminde anlamlı değişiklik görülmüştür. Benzer şekilde, OL uygulamasına tümörün oluşumu aşamasında başlanması durumunda EAT hücre sayısında anlamlı değişiklik oluşmadığı; ancak asit sıvısı hacminin azaldığı tespit edilmiştir. Böylece OL'in çalışılan meme kanseri modelinde organizmayı tümör oluşumuna karşı koruyucu etki göstermediği, tümör inisiyasyonu üzerinde de baskılayıcı bir etki yapmadığı anlaşılmıştır.

ZY'nın, organizmada tümör tespit edildikten sonra, tek başına ya da kemoterapi ajanı ile birlikte uygulanmasıyla ortaya çıkacak etkiler de araştırılmıştır. EAT hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün başlanarak 6 gün süreyle hergün aynı saatte, taze hazırlanan ZY, farelere 400 mg/kg konsantrasyonda verildiğinde hücre sayısında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. ZY, kemoterapi ajanı 5-FU ile kombine olarak uygulandığında tespit edilen hücre sayısı, 5-FU'nun tek başına uygulanmasıyla belirlenenden farklı bulunmamıştır. Asit sıvısı hacmindeki azalma, EAT kontrole göre anlamlıdır.

ZY'nın aksine, OL'in, organizmada tümör tespit edildikten sonra tedavi amacıyla tek başına ve kemoterapi ajanı ile birlikte uygulanması durumunda hücre proliferasyonunu teşvik ederek tümör büyümesini hızlandırdığı görülmüştür. EAT taşıyan farelere, hücre inokülasyonundan sonraki 2. gün başlanarak 6 gün süreyle hergün aynı saatte, taze hazırlanan OL 150 mg/kg konsantrasyonda verildiğinde hücre sayısının tedavi edilmemiş grupta tespit edilenin yaklaşık 2 katına ulaştığı saptanmıştır. OL, kemoterapi ajanı 5-FU ile kombine olarak uygulandığında belirlenen hücre sayısı, tedavi edilmemiş EAT kontrol grubu ile benzer olmuştur. Hücre sayısındaki artışa rağmen, asit sıvısı hacmi, kontrol grubu değerlerine yakın bulunmuştur.

Literatürde zeytin yaprağı ekstraktları ve özellikle oleuropeinin meme kanseri hücreleri üzerindeki *in vitro* etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Goulas ve ark. (2009), zeytin yaprağı ekstraktının MCF-7 meme ve T-24 mesane kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, yüksek antioksidan aktivite sergileyen perasetillenmiş oleuropeinin T-47D ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferatiferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Bulotta ve ark., 2011). Köçkar ve ark. (2010) ise farklı konsantrasyonlarda hazırladıkları oleuropeini, MCF-7, PC-3 ve HEP3B hücrelerine uygulamışlar ve antiproliferatif aktivite tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Korkmaz ve ark. (2016), zeytin yaprağı ekstresinin, epirubisinin oluşturduğu sitotoksisiteyi MDA-MB-231 hücrelerinde güçlendirdiğini, MCF-7 hücrelerinde ise azalttığını ortaya çıkarmışlardır. Zeytinyağının başlıca fenolik bileşiği olan oleuropein ve hidroksitirozolün kullanıldığı bir çalışmada, bileşiklerin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyon hızını azaltıp apoptozu indükleyerek hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. Araştırıcılar, hidroksitirosol ve oleuropeinin hücrelerin G1 fazından S fazına geçişini blokladığını da belirtmişlerdir (Han ve ark., 2009). Elamin ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ve MCF-7 kullanılmıştır. Oleuropeinin, bu hücrelerden daha agresif karakterli MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondri aracılı apoptozu indükleyerek, MCF-7 hücreleri üzerindekinden daha fazla etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, bileşiğin hücre siklusunu S fazında geciktirerek

proliferasyonu engellediği, p21'i upregüle ettiği, NF-κB ve siklin D1'i inhibe ettiği de bildirilmiştir (Elamin ve ark., 2013). Yapılan bir diğer çalışmada; oleuropein bileşiğinin insan meme kanseri hücreleri üzerinde (MCF-7) östrojenin indüklediği proliferasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Sirianni ve ark., 2010). Zeytin yaprağının su ve metanol ekstraktlarını metformin ile kombine ederek MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulayan Isleem ve ark. (2020), ekstrakt ve metforminin güçlü bir sinerjik inhibitör etki göstererek MCF-7 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltabileceğini ortaya çıkarmışlardır. Zeytin yağının kullanıldığı bir *in vivo* çalışmada Demirkan ve ark. (2017), Antep fıstığı reçinesi, polen, nar kabuğu, sumak reçinesi, çörek otu tohumu ve zeytinyağının kombinasyonu şeklindeki bir bitkisel karışımın etkinliğini Ehrlich asites karsinomlu farelerde incelemişlerdir. Araştırıcılar, karışımın antitümör etkisi olduğunu ve farelerin sağ kalım süresini uzattığını bildirmişlerdir (Demirkan ve ark., 2017). Milanizadeh ve Bigdeli (2019), bir fare meme kanseri modelinde 150 ve 225 mg/kg/gün zeytin yaprak ekstraktı (OLE) tedavisinden sonra tümör ağırlık ve hacminde azalma olduğunu göstermişlerdir. Bu azaltılmış büyümenin, OLE'nin polifenol içeriği ile ilişkili olduğunu ve bunun da süperoksit dismutaz ve katalaz dahil olmak üzere antioksidan enzim aktivitesinde bir artışa neden olduğunu öne sürmüşlerdir.

Son yıllarda, zeytin ürünlerinin ve oleuropeinin çeşitli ajanlarla oluşturulan karaciğer hasarına karşı organizmayı koruyucu etki sergilediğine dair kanıtlar giderek artmaktadır. Bir çalışmada Siklofosfamid ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda oleuropein ve quercetinin serum ALT, AST ve ALP düzeylerini iyileştirdiği ve karaciğerde oksidatif stres belirteçlerini baskıladığı tespit edilmiştir (Sheriff, 2017). Zeytin yağı ve zeytin yaprak ekstresinin sıçanları fluoksetin ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı koruduğu, apoptoz belirteçlerini aşağı yönde düzenlediği ve antioksidan savunmayı güçlendirdiği belirtilmiştir (Elgebaly ve ark., 2018). Oleuropein ve hidroksitirozol bakımından zengin zeytin yaprağı ekstraktlarının, sıçanlarda Bisfenol A'nın neden olduğu metabolik bozukluklara karşı hipolipidemik ve hepatoprotektif aktivite sergilediği bildirilmiştir. Ekstraktın serum ALT, AST, LDH, ALP ve TNF-α düzeylerini normal kontrol seviyelerine indirdiği, karaciğer dokusunda protein düzeyinde p53 ve COX-2 ekspresyonunu azaltıp, bcl-2

ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Mahmoudi ve ark., 2018). Jemai ve ark. (2019), kadmiyum toksisitesine karşı uyguladıkları oleuropeince zengin zeytin yaprağı ekstraktının farelerde serum ALT, AST, LDH, ALP ile karaciğer MDA, SOD ve katalaz düzeylerini iyileştirdiği; karaciğer dokusundaki iyileşmenin histolojik olarak da izlendiğini bildirmişlerdir. Taamalli ve ark. (2020), taze ve kurutulmuş zeytin yaprağı ekstrelerinin, sıçanlara CCl_4 uygulaması sonucu bozulmuş biyokimyasal parametreleri iyileştirdiğini ve karaciğer fibrozunu iyileştirmeye yardımcı olduğunu göstermişlerdir. Meme kanserinin tedavisi için kullanılan bir kemoterapötik ajan olan Tamoksifen ile hasar oluşturulan fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, farelere 30 mg/kg oleuropein 30 gün boyunca verilmiş ve tamoksifen hasarı nedeniyle bozulan enzim düzeylerinin (ALT, AST, SOD, CAT, vb.) iyileştiği tespit edilmiştir (Jamshed ve ark., 2014).

Bilindiği üzere karaciğer enzimleri olan ALT ve AST ile sitozolik bir enzim olan LDH'ın dokularda ve kan serumundaki seviyeleri herhangi bir nedenle oluşan hücre ve doku hasarında, histopatolojik durumlarda artar. Bu nedenle karaciğer hasarının belirteci olarak değerlendirilirler (Nelson ve Cox, 2004). Çalışmamızda, tedavi uygulanmamış EAT kontrol grubunda ALT, AST ve LDH düzeyleri beklendiği üzere sham kontrole göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. EAT taşıyan farelere, ZY'nın 15 gün boyunca uygulanması sonucunda ise ALT ve AST düzeylerinin, herhangi bir tedavi uygulanmamış EAT kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı; üstelik bu baskılanmanın OL'nin oluşturduğu inhibisyondan daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Ancak ZY uygulamasıyla LDH seviyesinin hem EAT kontrol hem de sham kontrol değerlerinden daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. OL ise LDH seviyesinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Hem ZY hem de OL'nin 6 veya 8 gün süreyle uygulandığında karaciğer dokusunda ALT ve AST'yi EAT kontrole göre anlamlı şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Ancak ZY'nin oluşturduğu inhibisyon OL'den daha yüksektir. Ayrıca ZY'nin uygulama süresi uzadıkça ALT ve AST düzeylerindeki inhibisyon oranının arttığı da gözlemlenmiştir. Ancak hem ZY hem de OL, LDH düzeyindeki artışa engel olamamışlardır.

Sağlıklı bireylere 8 veya 15 gün boyunca ZY veya OL verilmesi sonucunda ALT, AST ve LDH enzim düzeylerinin sham kontrol ile benzer olduğu ve karaciğerde toksisite oluşturmadığı saptanmıştır. Literatürde fareler için zeytin yaprağının LD_{50} değeri 3000 mg/kg, olarak bildirilmiştir (Duke, 2002). Başka bir çalışmada ise farelere oral yolla uygulanan zeytin yapraklarının metanol ekstraktının LD_{50} değeri 3475 mg/kg olarak bulunmuştur (Amabeoku ve Bamuamba, 2010). Oleuropeinin farelere 7 günlük süre zarfında, günde 1000 mg/kg oral yolla verildiği bir çalışmada herhangi bir toksik tesir görülmediği, bu çalışma ile LD_{50} değerinin belirlenemediği ve oleuropeinin güvenli madde olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir (Alonso, 2004).

Bütün sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde zeytin yaprağı çayının meme kanseri oluşmadan önce tüketilirse hücre çoğalmasını (tümör büyümesini) engelleyerek koruyucu etki yapabileceği belirlenmiştir. Ancak tümör tespit edildikten sonra tek başına kullanımının etkili olmadığı, bir kemoterapi ajanıyla birlikte uygulanması durumunda ilacın aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği anlaşılmıştır. ZY tüketimi, sağlıklı bireylerde karaciğerde toksisite oluşturmazken meme kanserli bireylerde ALT ve AST düzeyini normal seviyelere çekebildiği görülmüştür. Ancak LDH düzeyini yükseltebilmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, Balb/c ırkı 2.5 aylık, ortalama 25 gr ağırlığında Ehrlich asit tümörü (EAT) taşıyan inbred erkek farelere 400 mg/kg zeytin yaprağı çayı veya 150 mg/kg oleuropein uygulanmış, zeytin yaprağı çayı ve oleuropein maddesinin oral yol ile tüketilmesiyle koruyucu etki gösterip göstermeyeceği, tümör oluşumu ve tümör büyümesi üzerindeki olası etkileri incelenmiştir. Özgün olarak kurulan deney düzeneğinde elde edilen veriler ışığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Zeytin yaprağı çayının, Ehrlich asit tümör modelinde meme kanserine karşı koruyucu etki yaptığı tespit edilmiştir.
- Zeytin yaprak ekstresinde en fazla miktarda bulunan bileşen olan oleuropein tek başına uygulandığında koruyucu etki göstermemektedir.
- Organizmada tümör tespit edildikten sonra zeytin yaprağı çayının bir kemoterapi ajanıyla birlikte uygulanması durumunda ilacın aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği belirlenmiştir.
- Tümör tespit edildikten sonra oleuropeinin tek başına veya bir kemoterapi ajanıyla birlikte uygulanmasının hücre çoğalmasını teşvik ederek tümör büyümesini hızlandırdığı tespit edilmiştir.
- Zeytin yaprağı çayı ve oleuropein tüketiminin, sağlıklı bireylerde karaciğerde toksisite oluşturmadığı, meme kanserli bireylerde ALT ve AST düzeylerini normal seviyelere çekebildiği görülmüştür. Üstelik zeytin yaprağı çayı, saf oleuropeinden daha yüksek inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Hem zeytin yaprağı çayı hem de oleuropein, LDH düzeyini yükseltmiş veya etkilememiştir.

Tüm bulgular birlikte incelendiğinde zeytin yaprağı çayının tüketiminin hücre proliferasyonunu baskılayıp, hepatotoksik etki oluşturmadığı dolayısıyla metabolizmanın onkolojik sürece girmesini engelleyici yönde dikkatten kaçmayacak seviyede etki yapabileceği görülmüştür. Tümör tespit edildikten sonra ise oleuropein bileşiğinin tek başına ya da bir kemoterapötik ajan ile kombine uygulanması meme kanseri büyümesini arttırabileceğinden onkolojik tedavi sürecinde temkinli

yaklaşılmalıdır. Zeytin yaprağında bulunan diğer bileşenlerin bu iki zıt etkinin ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

ABE, R., BECKETT, J., ABE, R., NIXON, A., ROCHIER, A., YAMASHITA, N. and SUMPIO, B., 2011. Olive oil polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. Eur J Vasc Endovasc Surg., 41; 814-820.

ACAR, J., 1998. "Gıda Kimyası" Editör: İlbilge Saldamlı, Hacettepe Ü Yayınları, Ankara.

ACQUAVIVA, R., DI GIACOMO, C., SORRENTI, V., GALVANO, F., SANTANGELO, R., CARDILE, V., GANGIA, S., D'ORAZIO, N., ABRAHAM, N. G. and VANELLA, L., 2012. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. International Journal Of Oncology, 41; 31-38.

AFACAN, I. D., 2006. Ehrlich Asit Tümörü Taşıyan Balb/C Irkı Farelerde Plantago major L. Ekstraktının Antitümöral Etkisinin in vivo Olarak 135 Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.

AKTAŞ, E., 1996. Erlich Asit Tümörünün L Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.

AL-ATTAR, A. M. and ALSALMI, F. A., 2017. Effect of *Olea europaea* leaves extract on streptozotocin induced diabetes in male albino rats.Saudi Journal of Biological Sciences.

ALLEN, N. E., BERAL, V., CASABONNE, D., KAN, S. W., REEVES, G. K., BROWN, A. and GREEN, J., 2009. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. Journal of the National Cancer Institute, 101(5), 296–305.

ALONSO, J., 2004. Tratado de Fitofarmacos Nutraceuticos. Barcelona: Corpus, p 822.

AMABEOKU and BAMUAMBA, 2010. Evaluation of the effects of Olea europaea L. subsp. Africana (Mill.) P.S. Green (Oleaceae) leaf methanol extract against castor oil-induced diarrhoea in mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62: 368–373.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020. Cancer Facts & Figures 2020. In American CancerSociety(pp.1–52). http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/ documents/document/caff2007pwsecuredpdf.pdf

ANDREWES, P., BUSCH, J. L. H. C., DE JOODE, T., GROENEWEGEN, A. and ALEXANDRE, H., 2003. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. J Agric Food Chem., 51: 1415-1420.

BACAC, M., and STAMENKOVIC, I., 2008. Metastatic Cancer Cell. Annu Rev Pathol Mech Dis., 3: 221–247.

BAILLIF, R. N., 1954. The solid phase of the Ehrlich Ascites tumor in mice. Cancer Research. 14 (8): 554-558.

BANDERA, E.V. and KUSHİ, L.H. (2006). Alcohol and Cancer. D. Heber (Ed.). Nutritional Oncology (s. 219-272). Burlington: Academic Press.

BARTEK, J., LUKAS, J., and BARTKOVA, J., 1999. Perspective: defects in cell

cycle control and cancer. J Pathol., 187 (1): 95-99.
BAYTOP, T., 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları.
BELARDI, V, GALLAGHER, E. J., NOVOSYADLYY, R. and LEROITH, D.,2013. Insulin and IGFs in obesity-related breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 18(3–4):277–89.
BERTRAM, J. S., 2000. The molecular biology of cancer. Molecular aspects of medicine. 21(6):167-223.
BINGHAM, S. and RİBOLİ, E., 2004. Diet and cancer the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Nat Rev Cancer 4, 206–215.
BODE, A. M. and DONG, Z., 2015. Toxic phytochemicals and their potential risks for human cancer. Cancer Prev Res (Phila), 8(1): 1–8.
BOSS, A., BISHOP K. S., MARLOW, G., BARNETT, M. P. G. and FERGUSON, L.R., 2016. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. Nutrients, 8: 513.
BRADFORD, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
BULOTTA, S., CORRADINO, R., CELANO, M., D'AGOSTINO, M., MAIUOLO, J., OLIVERIO, M., PROCOPIO, A., IANNONE, M., ROTIROTI, D. and RUSSO, D., 2011. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. Food Chemistry, 127; 1609–1614.
CALLE, E. E., RODRIGUEZ, C., WALKER-THURMOND, K. and THUN, M. J.. 2003. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. N Engl J Med, 348:1625-1638
CENTERS FOR DİSEASE CONTROL AND PREVENTİON, 2022. What are the risk factors for breast cancer? https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm
CHANDRASEKARA, A. and SHAHIDI, F., 2018. Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction. A review. Journal of traditional and complementary medicine, 8(4), 451–458.
ÇAĞINDI, Ö. ve ÖTLEŞ, S., 2008. Farklı Demleme Sürelerinde Hazırlanan Bitki Çaylarının Antioksidan Aktiviteleri İle Renkleri Arasındaki Korelasyonun Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi. Erzurum, Türkiye
DEMİRKAN, İ., ERTEKİN, T., KORKMAZ, M., KILIÇ, İ., ÇEVİK-DEMİRKAN, A., BOZKURT, F. ve KONUKTÜRK, A., 2017 Antitumorigenic activity of the herbal mixture-AK27 on ehrlich ascites carcinoma in mice. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 23 (5): 817-823, 2017.
DOLL, R. and PETO, R., 1981. The causes of cancer. Oxford, Oxford University Press.
DUKE, J. A., 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton, FL. CRC Press.
DUKE, J. A., 2002. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Boca Raton, p:536.
EKİNCİ, G., 2000. Katı Erlich Ascites Tümörünün Büyüme Kinetiği. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 178s.
ELAMIN, M. H., DAGHESTANI, M. H., OMER, S. A., ELOBEID, M. A., VIRK, P., AL-OLAYAN, E. M., HASSAN, Z. K., MOHAMMED, O. B. and

ABOUSSEKHRA, A., 2013. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. Food and Chemical Toxicology, 53; 310–316.

ELGEBALY, H. A., MOSA, N. M., ALLACH, M., EL-MASSRY, K. F., EL-GHORAB, A. H., AL HROOB, A. M. and MAHMOUD A. M., 2018. Olive oil and leaf extract prevent fluoxetine-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 98, 446-453.

EMA, 2011. Assessment report on Olea europaea L., folium. European Medicines Agency, 32 sayfa.

ERDEM, S., ATA, EREN, P., 2009. Tedavi amacıyla kullanılan bitkiler ve bitkisel ürünlerin yan etkileri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.133-141.

FARES, R., BAZZI, S., BAYDOUN, S. E. and ABDEL-MASSIH, R. M., 2011. The Antioxidant and Anti-proliferative Activity of the Lebanese Olea europaea Extract. Plant Foods Hum Nutr, 66: 58–63.

FITZMAURICE, C., DICKER, D., PAIN, A., HAMAVID, H., MORADI-LAKEH, M., MACINTYRE, M. F., and ALLEN, C., 2013. The Global Burden of Cancer. JAMA Oncol. 2015;1(4):505-27.

FONT-BURGADA, J., SUN, B. and KARIN, M., 2016. Obesity and Cancer: The Oil that Feeds the Flame. Cell Metabolism, 23: 48-62.

GOULAS, V., EXARCHOU, V., TROGANIS, A. N., PSOMIADOU, E., FOTSIS, T., BRIASOULIS, E., and GEROTHANASSIS, I. P., 2009. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. Mol. Nutr. Food Res. 53: 600 – 608.

GUMUSHAN AKTAS, H. ve AYAN, H., 2021. Oleuropein: A potential inhibitor for prostate cancer cell motility by blocking voltage-gated sodium channels. *Nutrition and Cancer*, *73*(9), 1758-1767.

HAN, J., TALORETE, T. P.N., YAMADA, P. and ISODA, H., 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. Cytotechnology, 59; 45–53.

HANAHAN, D., and WEINBERG, R. A., 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation."

HARBORNE, J. B., BAXTER, H. and MOSS, G. P., 1999. Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. CRC Press, 2nd edition. 976 pp.

IARC, 2022. Cancer today. [online], http://gco.iarc.fr/today/home. [Ziyaret tarihi: 005 Nisan 2022].

ISLEEM, R. M., ALZAHARNA, M. M., and SHARIF, F. A., 2020. Synergistic anticancer effect of combining metformin with olive (Olea europaea L.) leaf crude extract on the human breast cancer cell line MCF-7. Journal of Medicinal Plants Studies, 8(2): 30-37.

İLACTR, 2022. 5-Fluorouracil kimyasal yapısı. [online], https://www.ilactr.com/ilac/fluorouracil-500-mg.html. [Ziyaret tarihi: 05 Nisan 2022].

JAMSHED, F., AHMAD, W., EMDADUL HAQUE, A.T.M., SAAD, A. and AL-JASSABI, S., 2014. Ameliorative Role of Oleuropein Extracted from Olive Leaf on Tamoxifen-Induced Hepatic 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA of Balb/C Mice. World Applied Sciences Journal 30 (6): 765-769.

JEMAI, H., MAHMOUDI, A., FERYENI, A., FKI, I., BOUALLAGUI, Z., CHOURA, S., CHAMKHA, M. and SAYADI, S., 2020. "Hepatoprotective Effect of Oleuropein-Rich Extract from Olive Leaves against Cadmium-Induced Toxicity in Mice", BioMed Research International, vol. 2020, Article ID 4398924, p9.

JENKINS, D. J., KENDALL, C. W., AUGUSTIN, L. S., FRANCESCHI, S., HAMIDI, M. and MARCHIE, A., 2002. Glycemic index: overview of implications in health and disease. Am J Clin Nutr. 76(1):266–73s.

KALEOĞLU, Ö. ve İŞLİ, N., 1977. Ehrlich-Lettrè Asit Tümörü. İ.Ü. Tıp Fak. Mecmuası, 401: 978-984.

KEY, T. J., ALLEN, N. E., SPENCER, E. A. and TRAVIS, R. C., 2003. Nutrition and breast cancer. The Breast 12, 412–416.

KORKMAZ, S., SARİMAHMUT M., OZEL M. Z. ve ULUKAYA, E., 2016. Olive leaf extract containing oleuropein modulates the cytotoxic effect of epirubicin on breast cancer cells depending on the cell line. Turk J Biochem. 41(6): 385–392

KOSALEC, I., CVEK, J. and TOMIC, S., 2009. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 60: 485-501.

KÖKSAL, G. ve MANAV, N., 1973. "Çay ve Kahvenin Beslenme ve Sağlıkla İlişkisi" Beslenme ve Diyet Dergisi; 2(3): 39

KUMAR, P., RAZA, K., KAUSHİK, L., MALİK, R., ARORA, S. and KATARE, O. P., 2016. Role of Colloidal Drug Delivery Carriers in Taxane-mediated Chemotherapy: A Review. Current Pharmaceutical. Design, 22(33):5127-5143.

LAFKA T.I., LAZOU A.E., SİNANOGLOU J.V. and LAZOS E.S., 2013. Phenolic Extracts From Wild Olive Leaves and Their Potential As Edible Oils Antioxidants. Foods, *2* (1): 18-31.

LAMBERT, A. W., PATTABIRAMAN, D. R., and WEINBERG, R. A., 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. Leading Edge Review Cell, 168: 670-691.

LEE, O. H. and LEE, B. Y., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Bioresource Technology, 101: 3751-3754.

LEE-HUANG, S., ZHANG, L., HUANG, P. L., CHANG, Y. T., and HUANG, P. L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. Biochemical and Biophysical Research Communications 307: 1029–1037.

LODİSH, H., BERK, A., KAİSER, C.A., KRİEGER, M., SCOTT, M.P., BRETSCHER, A., PLOEGH, H. and MATSUDARRA, P., 2011. Moleküler Hücre Biyolojisi. Çeviri Editörleri: Hikmet Geçkil, Murat Özmen, Özfer Yeşilada. Palme Yayınevi, Ankara.

LONGLEY, D. B., HARKİN, D. P. and JOHNSTON, P.G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer. May;3(5):330-8..

LUQUE DE CASTRO, M. D., and PRIEGO CAPOTE, F., 2010. "Extraction of Oleuropein and Related Phenols from Olive Leaves and Branches". 259-273. Olives and Olive Oil in Healthand Disease Prevention. Editors: Victor R.

Preedy, Ronald Ross Watson. Elsevier, USA.
MABUCHI, S., OHMICHI, M., KIMURA, A., NISHIO, Y., ARIMOTO-ISHIDA, E., YADA-HASHIMOTO, N., TASAKA, K. and MURATA, Y., 2004. Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines. Endocrinology. 145(1):49-58
MAHMOUDI, A., HADRICH, F., FEKI, I., GHORBEL, H., BOUALLAGUI, Z., MARREKCHI, R., FOURATIC, H. and SAYADIA, S., 2018. Oleuropein and hydroxytyrosol rich extracts from olive leaves attenuate liver injury and lipid metabolism disturbance in bisphenol A-treated rats. Food Funct., 9, 3220-3234.
MAHONEY, M. C., BEVERS, T., LINOS, E. and WILLETT, W. C., 2008. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. CA Cancer J Clin. 58: 347-371.
MICOL, V., CATURLA, N., PÉREZ-FONS, L., MÁS, V., PÉREZ, L. and ESTEPA, A., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). Antiviral Research 66: 129–136.
MİLANİZADEH, S. and BİGDELİ, R., 2019. M. Pro-Apoptotic and Anti-Angiogenesis Effects of Olive Leaf Extract on Spontaneous Mouse Mammary Tumor Model by Balancing Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin Levels. Nutr Cancer.;71(8):1374-1381.
NELSON D. L. and COX, M. M. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry, (fourth ed.), Worth Publishers, New York, USA, 577 p.
OKAY, 1998. Deneysel EAT oluşturulan fare karaciğer plazmasında Nitrik Oksit metabolizmasının incelenmesi. Yüksek Lisans tezi. İ.Ü. Sağ. Bil. Enst. Biyokimya A.D. İstanbul.
OMAR, S. H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.*, 78: 133-154.
OZDEMIR, Y., GUVEN, E. ve OZTURK, A., 2014. Understanding the Characteristics of Oleuropein for Table Olive Processing. J Food Process Technol., 5; 328.
ÖZMEN, V., FİDANER C. ve AKSAZ, E., 2009. Meme Sağlığı Dergisi. 5:125-134
PANIZZI, L., SCARPATI, M. L., and ORIENTE, G., 1960. Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity. Gazz. Chim. Ital., 90: 1449-1485.
PATEL, A.V., ROJAS-VERA, J. and DACKE, C. G., 2004. Therapeutic constituents and actions of Rubus species. Current Medicinal Chemistry, 11; 1501-1512.
PAVLOPOULOU, A., SPANDIDOS, D. A. and MICHALOPOULOS, I., 2015. Human cancer databases (review). Oncol Rep. Jan;33(1):3-18.)
PETRUCELLI, N., DALY, M. B. and PAL, T., 1993. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2022 Feb 3]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.
PORTER, R., 2006. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc. 2009.
POSWAL, F. S.., RUSSELL, G., MACKONOCHIE, M, MACLENNAN, E.,

ADUKWU, E. C. and ROLFE, V., 2019. “Herbal Teas and their Health Benefits: A Scoping Review.” Plant Foods Hum Nutr.74(3):266-276.
RAVIKUMAR, C., 2014. “Review on Herbal Teas” J. Pharm. Sci. & Res. 6(5), 236 238.
ROSE, D. P. and VONA-DAVIS, L., 2012. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. Endocr Relat Cancer. 19(6):R225–41. https://doi.org/10.1530/ ERC-12-0203.
ROSNER, B., COLDITZ, G. A. and WILLETT, W. C., 1994. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses’ Health Study. Am J Epidemiol. 139: 819-835.
SAMET, I., HAN, J., JLAIEL, L., SAYADI, S. and ISODA, H., 2014. Olive (Olea europaea) Leaf Extract Induces Apoptosis and Monocyte/Macrophage Differentiation in Human Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells: Insight into the Underlying Mechanism. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 927619, 16 pages.
SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, 2022. Oleuropein kimyasal yapısı. https://www.scbt.com/p/oleuropein-32619-42-4
SAVRAN M. K., 2017. Dünyada ve Türkiye’de Zeytincilik. [online], https://www.tarimorman.gov.tr/. [Ziyaret tarihi: 005 Nisan 2022].
SECRETAN, B., STRAIF, K., BAAN, R., GROSSE, Y., EL GHISSASSI, F. and BOUVARD, V., 2009. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. The Lancet Oncology, 10(11), 1033- 1034.
SEÇME, M., EROĞLU, C., DODURGA, Y. and BAĞCI, G., 2016. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Gene, 585; 93–99.
SEILER, A., CHEN, M. A., BROWN, R. L. and FAGUNDES, C. P., 2018. Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. Current Breast Cancer Reports. 10:14–27.
SHERIF, I. O., 2018. The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway. International Immunopharmacology, 61, 29-36.
SHIELD, K. D., SOERJOMATARAM, I. and REHM, J., 2016. Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. Alcoholism: Clinical and Experimental Research.
SIRIANNI, R., CHIMENTO, A., DE LUCA, A., CASABURI, I., RIZZA, P., ONOFRIO, A., IACOPETTA, D., PUOCI, F., ANDO, S., MAGGIOLINI, M. and PEZZI, V., 2010. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. Mol. Nutr. Food Res., 54; 833–840.
SOMOVA, L. I., SHODE, F. O. and MIPANDO, M., 2004. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. Phytomedicine, 11: 121–129.
SOMOVA, L. I., SHODE, F. O., RAMNANAN, P. and NADAR, A., 2003. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies africana leaves. Journal of Ethnopharmacology, 84: 299-305.
STEWART, B. W. and WILD, C. P., 2014. World Cancer Report. Lyon: World

Health Organization; IARC Nonserial Publication, 632s.
SUDJANA, A. N., D'ORAZIO, C., RYAN, V., RASOOL, N., NG, J., ISLAM, N., RILEY, T. V. and HAMMER, K. A., 2009. Antimicrobial activity of commercial Olea europaea (olive) leaf extract. International Journal of Antimicrobial Agents 33: 461–463.
SUZUKI, R., YE, W.., RYLANDER-RUDQVIST, T., SAJI, S., COLDITZ, G. A. and WOLK, A., 2005. Alcohol and postmenopausal breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status: a prospective cohort study. J Natl Cancer Inst. 97: 1601-1608.
TAAMALLI, A., FERIANI, A., LOZANO-SANCHEZ, J., GHAZOUANI, L., EL MUFTI, A., ALLAGUI, M. S., SEGURA-CARRETERO, A., MHAMDI, R. and ARRÁEZ-ROMAN, D., 2020. Potential Hepatoprotective Activity of Super Critical Carbon Dioxide Olive Leaf Extracts against CCl4-Induced Liver Damage. Foods. 9(6):804.
TARIM ve ORMAN BAKANLIĞI, 2021. Tarım Ürünleri Piyasa Raporu: Zeytinyağı. https://arastirma.tarimorman.gov.tr/
TAŞKIN, E. Ş., 2002. Ehrlich Ascites Tümörü ile Balb-C Farelerde OluĢturulmuĢ Solid Tümör Modelinde Curcuminin Apoptoz Üzerine Etkileri. Ġstanbul: Ġstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.
TURGUL, E., YILMAZ, H. K. ve ERGUDEN, B., 2019. "Özel Tenis Kulübündeki Profesyonel Sporcuların Bitkisel Çay Tüketim Sıklığı ve Kullanımını Etkileyen Faktörler" Haliç Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2: 29-40 .
TURNA, G., 2008. Ehrlich Asit Solid Tümör Modeli OluĢturulmuĢ Farelerde Thymus Sipyleus ve Taurinin Karaciğer MDA, Glutatyon, AOPP Düzeylerine ve SOD Aktivitesine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.
UÇKUN M., 2013. Xenopus laevis iribaşlarına thiakloprid ve trifloksistrobin'in akut toksik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 177 s.
WAGNER, H. and WOLFF, P., (eds.) 1977. New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity, 287 pp. ISBN: 9783642666841
WISEMAN, M., 2019. Nutrition and cancer: Prevention and survival. British Journal of Nutrition, 122(5), 481-487. doi:10.1017/S0007114518002222
WORLD CANCER RESEARCH FUND and AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC, American Institute for Cancer Research.
WORLD CANCER RESEARCH FUND and AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2018. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective The Third Expert Report. https://www.wcrf.org/diet-and-cancer/
YEŞİLADA, E., 2011. Doğadan Gelen Sağlık: Bitki Çayları. İstabul: Zebra Yayıncılık, İstanbul.
YOON, S. K., 2018. Oleuropein as an Antioxidant and Liver Protect. The Liver, 323–335.
ZHOUA, R., TREECK, O., HORN, F. and ORTMANN, O., 2005. Effects of prolonged tamoxifen treatment on receptor expression and apoptosis of

ovarian cancer cells. Gynecol Oncol, 96(3):678-83
ZİTVOGEL, L., PİETROCOLA, F. and KROEMER, G., 2017. Nutrition, inflammation and cancer. Nat Immunol, Jul 19;18(8):843-850.

EKLER

EK 1. Etik kurul onay belgesi



Evrak Tarih ve Sayısı: 23/05/2019-E.22314

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
(HRÜ-HADYEK)

Oturum No	Karar	Tarih / Saati	Yeri
2019/002	01-02	29.04.2019/ 15:00	HADYEK Toplantı Salonu

KARAR 2019/002/02: 08/03/2019 tarih ve 6064 sayılı başvuru dosyası incelendi. İnceleme sonucunda; Yürütücülüğünü Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ'ın yapacağı ***"Zeytin yaprağının Ehrlich Ascites Tümörü taşıyan fareler üzerindeki etkileri"*** isimli çalışmaya, Etik Kurul izni verilmesinin uygun olduğuna;

Oy çokluğu/birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hisamettin DURMAZ
Başkan

Doç. Dr. Fatih BOZKAYA
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Sibel TÜREDİ
Başkan V.

Doç. Dr. Füsun TEMAMOĞULLARI
Raportör

Doç. Dr. Sabri YURTSEVEN
Üye

Dr.Öğr. Üyesi Mücahit KAHRAMAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Arif PARMAKSIZ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Ü. BOYRAZ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZGÖÇER
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim DURMUŞ
Üye

Mustafa Hakkı ÇETİNTAŞ
Sivil Üye

Arş. Gör. Gülşah GÜNGÖREN
Üye

Ahmet Mevlut BALIKÇI
STK-Üye

3