

***Olea europaea* L. Ve *Vitis vinifera* L.
EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
VE ARA ÜRÜN FORMULASYONUNUN
GELİŞTİRİLMESİ**

Hatice GENÇ
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Ağustos, 2011

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hatice GENÇ'in "*Olea europaea* L. Ve *Vitis vinifera* L. Ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi ve araürün formülasyonunun geliştirilmesi" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 27/ 07/ 2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr. A. TANSU KOPARAL	
Üye	: Prof.Dr. KADRIYE BENKLİ	
Üye	: Yard.Doç.Dr. EMEL ERGENE	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

***Olea europaea* L. Ve *Vitis vinifera* L. EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE ARA ÜRÜN
FORMULASYONUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

Hatice GENÇ
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL
2011, 66 sayfa

Doğal maddeler son yıllarda ilaç etken maddesi keşfinde önemli bir kaynak olarak görülmektedir. İnsanoğlu doğal kaynaklardan ve aromatik bitkilerden tedavi ve korunma amaçlı olarak asırlardır yararlanmıştır.

Zeytin yaprağı (*Olea europaea*), sağlığa yararlı biyoaktif fitokimyasallarca zengin ve oldukça kolay ulaşılabilen doğal bir materyaldir. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan yüksek antioksidant özelliğine sahip fitokimyasalların, bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve antitümoral etkiye sahip olduğu çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır. Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği proantosiyanidin özütleri (GSPE) pek çok flavonid bileşeninden oluşan bir karışımdır ve etkili antioksidant aktivite gösterdiği bilinmektedir. GSPE'lerin düşük toksisiteye sahip bileşikler olduğu ve antiproliferatif, antioksidatif ve antikarsinogenetik etkileri olduğu açıklanmıştır.

Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalar antianjiyojenik mekanizmaların gelecekte kanser tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu tez kapsamında son yıllarda halk arasında kullanımı gittikçe artan zeytin yaprağı ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının ayrı ayrı ve birlikte kullanımının sitotoksik, anjiyojenik ve antianjiyojenik aktiviteleri *in vitro* testler kullanılarak araştırılmıştır. Her iki ekstreye de altın kompleksleri bağlanarak oluşan yeni ara ürününün A549 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve HUVEC hücreleri üzerindeki anjiyojenik ve antianjiyojenik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstresinin belirgin bir sitotoksik etkisi bulunmamasına karşın zeytin yaprağı ekstresinin sitotoksik etkileri belirlenmiş ve her iki ekstrenin ayrı ayrı ve bir arada anti-anjiyojenik olduğu bulgulanmıştır. Au bileşikleriyle elde edilen yeni bileşikler ise hücre canlılığına etki etmezken anti-anjiyojenik etkiye sahiptir.

Anahtar kelimeler: Zeytin yaprağı, Üzüm çekirdeği, Anjiyojenez, Sitotoksisite

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Olea europaea* L. and
Vitis vinifera L. EXTRACTS AND INTERVAL PRODUCT
FORMULATION DEVELOPMENT**

Hatice GENÇ
Anadolu University
Graduate School of Science
Department of Advanced Technologies
Program in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. A. Tansu KOPARAL
2011, 66 pages

Natural products constitute an important resource for drug discovery in recent years. For centuries, men benefited from aromatic plants and natural resources for medical treatment and protection.

Olive leaf is an easily accessible natural material which is rich for healthy bioactive phytochemicals. Many researches proved that phytochemicals, which have antioxidant properties, strengthen the immune system and have antitumoral effects. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) is a compound which contains many flavanoids and has effective antioxidant activity. Proanthocyanidins are used as antioxidant, in preventing atherosclerosis and cardiovascular diseases, and for dyslipidemia treatment. It is demonstrated that GSPE have antiproliferative, antioxidative and anticarcinogenic effects.

Research into experimental angiogenesis shows that this can be a strategy with an important role in cancer therapy in near future. In this thesis, we investigated olive leaf and grape seed extracts, alone and combination and also gold-binded forms by using *in vitro* tests. Cytotoxicity was investigated against A549 and HUVEC cell lines and angiogenic-antiangiogenic effects were assessed on HUVEC cells with *in vitro* techniques. Although GSPE didn't show any significant cytotoxic effect, olive leaf extracts showed dose-dependent cytotoxicity and both extracts together and severely showed anti-angiogenic effect. Also the combined form with Au complexes didn't present cytotoxicity but showed significant anti-angiogenic effect.

Keywords: Olive leaf, grape seed, Angiogenesis, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve deneysel çalışmalarım boyunca her türlü yardım, bilgi ve desteği ile yanımda olan danışman hocam sayın Doç.Dr. A. Tansu KOPARAL'a

Deneysel çalışmalarımda kullandığım maddeleri sentezleyen ve desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Kadriye BENKLİ'ye

Laboratuvar çalışmalarım boyunca sabırla ve sevgiyle bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım R. Beklem BOSTANCIOĞLU, Murat KAYA ve Kenan IŞIK'a

Ayrıca bu süreç boyunca her zaman yanımda olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hatice GENÇ

Ağustos, 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.	x

1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	2
1.2. Anjiyogenez	3
1.2.1. Anjiyogenez nedir?	3
1.2.2. Anjiyogenez mekanizması	5
1.2.3. Bazal membran, endotel hücreleri ve VEGF ilişkisi.....	7
1.2.3.1 Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	8
1.3. Kanser ve Anjiyogenez İlişkisi	10
1.4. Metastaz	11
1.5. Kanser Tedavisi ve Doğal Ürünler	13
1.5.1. Üzüm	15
1.5.1.1 Resveratrol	18
1.5.2. Zeytin	21
1.5.2.1 Oleuropein.....	24
1.6. Metallerin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	25

2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1. Materyal	28
2.1.1 Kullanılan kimyasal malzemeler	28
2.1.2 Kullanılan sarf malzemeler	28
2.1.3 Kullanılan aletler	28
2.1.4 Kullanılan hücreler	29
2.1.4.1 A549 hücre kültürü	29
2.1.4.2 HUVEC hücre kültürü	29
2.1.4.3 Test maddelerinin ekstraksiyonu	29
2.1.4.4 Test maddelerinin dozlarının hazırlanması	30
2.1.4.5 Kullanılan araç, gerecin hazırlanması	31
2.2. Yöntem	31
2.2.1 Hücre kültürü	31
2.2.1.1 Hücrelerin testler için hazırlanması	32
2.2.1.2 MTT ölçümü	32
2.2.1.3 Matrijel tüp ağı oluşturma deneyi	32
2.2.2 İstatistiksel Değerlendirme	33
3. BULGULAR	34
3.1. Zeytin Yaprığı Ekstresinin Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi	34
3.1.1 Zeytin yaprağı ekstresinin A549 hücreleri üzerindeki etkisi	34
3.1.2 Zeytin yaprağı ekstresinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi	35

3.2 Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi.....	36
3.2.1 Üzüm çekirdeği ekstresinin A549 hücreleri üzerindeki etkisi	36
3.2.2 Üzüm çekirdeği ekstresinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi	37
3.3. Zeytin Yapağı ve Üzüm Çekirdeği Ekstrelerinin Kombine Kullanımlarının Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatlarındaki Etkileri	38
3.3.1 Zeytin yapağı ve üzüm çekirdeği ekstrelerinin kombine olarak kullanıldıklarında A549 hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	38
3.3.2 Zeytin yapağı ve üzüm çekirdeği ekstrelerinin kombine olarak kullanıldıklarında HUVEC hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi	41
3.4. Sodyum tetrakloroaurat (NaAuCl ₄) Kullanılarak, Au(III) Kompleksi Halinde Zeytin Yapağı Ekstresinden Çöktürülen Oleuropein ve Üzüm Çekirdeği Ekstresinden Çöktürülen Resveratrol Bileşiklerinin Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkileri.....	43
3.4.1 Zeytin yapağı ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki etkileri	43
3.4.2 Zeytin yapağı ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri	45
3.4.3 Üzüm çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki etkileri	46
3.4.4 Üzüm çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri.....	47

3.5. Test Maddelerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri	48
3.5.1 Zeytin yaprağı ekstresinin anjiyogenez üzerindeki etkisi	49
3.5.2 Üzüm çekirdeğı ekstresinin anjiyogenez üzerindeki etkisi	50
3.5.3 Zeytin yaprağı ekstresi ve üzüm çekirdeğı ekstresinin kombine uygulamasının anjiyogenez üzerindeki etkisi	51
3.5.4 Sodyum tetrakloroaurat (NaAuCl ₄) kullanılarak, Au(III) kompleksi halinde zeytin yaprağı ekstresinden çöktürülen oleuropein ve üzüm çekirdeğı ekstresinden çöktürülen resveratrol bileşiklerinin anjiyogenez üzerine etkileri	52
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Vaskülojenez ve anjiyojenez süreci	4
1.2. Anjiyojenez süreci.....	6
1.3. Üzüm (<i>Vitis Vinifera</i>).....	16
1.4. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene; RV)	19
1.5. Zeytin (<i>Olea Europaea</i>)	22
1.6. Oleuropeinin moleküler yapısı	24
3.1 A549 hücreleri üzerinde Zeytin (<i>Olea europaea</i>) yaprağı ekstraktının zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi.....	35
3.2 HUVEC hücreleri üzerinde Zeytin (<i>Olea europa</i>) yaprağı ekstraktının zamana ve doza bağlı sitotoksik etkisi.	36
3.3 Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdek ekstresinin A549 hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı sitotoksik etkisi	37
3.4 Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdek ekstresinin HUVEC hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı sitotoksik etkisi.	38
3.5 Zeytin (<i>Olea Europa</i>) yaprağı ve Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdeği ekstrelerinin bir arada uygulandıklarında A549 hücreleri üzerindeki etkileri	40
3.6 Zeytin (<i>Olea Europa</i>) yaprağı ve Üzüm (<i>Vitis vinifera</i> sp.) çekirdeği ekstrelerinin bir arada uygulandıklarında HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri.	42
3.7 Zeytin yaprağı (<i>Olea europaea</i>) ekstresinden Au (III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin A549 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi	44
3.8 Zeytin yaprağı (<i>Olea europaea</i>) ekstresinden Au (III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi	45
3.9 Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin A549 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi	47

3.10 Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleks halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi	48
3.11 HUVEC hücreleri üzerinde Zeytin (<i>Olea europaea</i>) yaprağı ekstraktının anjiyojenik etkisi	49
3.12 HUVEC hücreleri üzerinde Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdeği ekstresinin anjiyojenik etkisi	50
3.13 HUVEC hücreleri üzerinde Üzüm (<i>Vitis Vinifera</i>) çekirdeği ekstresi ile Zeytin (<i>Olea Europa</i>) yaprağı ekstraktının bir arada uygulanmalarının anjiyogenez üzerine etkisi	51
3.14 Zeytin (<i>Olea europaea</i>) yaprağı ve Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>) çekirdeği ekstrelerinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein ve retverastrol bileşiklerinin anjiyogenez üzerine etkisi.....	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
Ham's-F12	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Hams F-12
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrozolyum bromid
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)

1.GİRİŞ

Kanser, son yıllarda kanser terapisinin geliştirilmesi için yapılan sayısız çalışmalara karşın hala bilinen büyük bir sağlık problemidir (Sarkar ve Li 2009). 2008 yılında Avrupa’da yapılan istatistiki bir araştırmada yılda 3,2 milyon insanının kansere yakalandığı ve bu vakaların 1,7 milyonunun ölümle sonuçlandığı rapor edilmiştir. Araştırmalar mevcut vakalardan yalnızca % 5-10 kadarının genetik bozukluklardan kaynaklandığını geriye kalan % 90-95’lik kısmın ise sigara kullanımı, diyet, alkol tüketimi, yeterli fiziksel harekette bulunmama, obezite ve güneş ışınları gibi yaşam şekliyle alakalı faktörlerden kaynaklandığını göstermektedir (Gonzalez ve Riboli 2010).

Akciğer kanseri, kansere ilişkin ölümlerin başında yer alan büyük bir sağlık problemidir. Her yıl dünya genelindeki kanser ölümlerinin 1,38 milyonu akciğer kanserinden kaynaklanmaktadır (Lee ve ark. 2011, Khan ve ark. 2010). Akciğer kanserine yakalanan hastaların % 90’ı hayatını kaybetmektedir ve hastalığa yakalandıktan sonra 5 yıl hayatta kalabilen hasta oranı ise % 10 civarındadır. Erkeklerde % 90 kadınlarda ise % 79 oranındaki akciğer kanseri vakaları sigara kullanımından kaynaklanmaktadır, ancak sigara kullanan bireylerde kanser vakasının gelişimi metabolik aktivasyon ve detoksifikasyon oranındaki dengeyle yakından ilişkilidir. Özellikle beslenmeye dikkat edilerek ve sebze, meyve tüketimini yüksek tutarak akciğer kanserine yakalanma riskinin en aza indirgenebileceği çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır (Khan ve ark. 2010).

Bitkiler, deniz organizmaları ve mikro-organizmalar gibi doğal kaynaklardan türev alarak üretilen moleküller olan doğal ürünler olası sağlık faydalarından dolayı pek çok hastalık için hedef araştırma alanlarıdır (Nesaretnam 2008, Cragg ve Newman 2004). Çeşitli rahatsızlıklardan koruma ve tedavi edebilme yeteneğine sahip olan bu ürünler sentetik ve daha toksik olan diğer tedavi ürünlerine göre daha fazla tercih görmektedir (Nesaretnam 2008). Gıda desteği olarak kullanılan bazı ürünlerin de kansere karşı korunma ve tedavi maksatlı kullanılmaları son yıllarda araştırmacılara çeşitli kanser oluşumlarını kontrol edebilmek için yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Velmurugan ve ark. 2010). Özellikle polifenol içeriği yüksek olan meyve, sebze, meyve suyu, çay,

kahve, şarap, çikolata ve zeytin yağı gibi gıdalar antioksidan kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı antikarsinojenik aktiviteleri olabileceği üzerine çeşitli kanser tiplerinde çalışılmaktadır (Hayes ve ark. 2011, Katiyar 2008).

Bu tez kapsamında, antioksidan, antitümöral, antianjiyojenik ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu bilinen ve yurdumuz Akdeniz ve Ege kıyılarında rahatlıkla yetiştirilebilen zeytin (*Olea europaea* L.) ve üzüm (*Vitis vinifera* L.) bitkilerinin, yaprak ve çekirdek özütlerinden elde edilen ekstraktların ayrı ayrı ve bir aradaki etkilerine kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında bakılmıştır. Piyasadan temin edilen maddeler A549 (İnsan akciğer adenokarsinoma hücresi) ve HUVEC (İnsan göbek kordonu endotel hücresi) hücreleri üzerinde sitotoksik ve damar oluşumuna etkileri değerlendirilmiştir. Ayrıca iki maddenin de altın kompleksleri ile bağlanarak elde edilen yeni ürün formülasyonlarının etkilerine bakılmış ve sitotoksik ve antianjiyojenik etkileri değerlendirilerek ilaç komplekslerine ek madde olarak kullanılıp kullanılamayacakları değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sağlık sektöründe tedavi ürünü pazarında bulunan güvenilir ve yerli ürün açığına katkıda bulunacak niteliktedir.

1.1. Kanser

Kanser dokudaki yapının bozulmasıyla ilgili oldukça kompleks bir hastalıktır. Bu sebeple doku ve dokuyu oluşturan hücreler düzeyinde yapılan gözlemler karsinogenez çalışmaları için oldukça uygundur (Bizzari ve ark. 2011). Hornberg ve arkadaşları kanseri sistem biyolojisi hastalığı olarak tanımlamıştır. Kanser tümör türleri ve tümörler arasında farklılık gösteren karmaşık ve heterojen bir hastalıktır (Prasasya ve ark. 2011).

Kanserli hücreler çok hücreli organizmalar tarafından inşa edilen ve devamlılığı sağlanan biyolojik yapının en temel kurallarının varlığını reddeden hücrelerdir. Bu anormal davranış eninde sonunda ait oldukları organizmanın ölümü ile sonuçlanmaktadır. Kanser için iki belirleyici aile vardır. Birinci aile kontrolsüz çoğalmaya ihtiyaç duyan dokudaki hücrelerin durumunu açıklar. Bunlar büyüme sinyallerindeki yeterlilik, anti-büyüme sinyallerini reddetme, apoptozdan kaçınma ve immortalizasyondur. Bir hücrenin malignant hale geçmesi için bu dört özelliğe birden sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte

organizmanın kesin ölüm nedeni için, tümörün iki farklı belirleyiciye daha ihtiyacı vardır ki bunlar da ikinci aile olarak adlandırılan anjiyogenez ve metastazdır. Anjiyogenez tümörün büyümesi için gerekli olan kan damarlarının oluştuğu süreçtir. Metastaz ise kanser hücreleri tarafından çeşitli hücrelerin istilası, hücrelerin burada kolonizasyonu ve ikincil tümörlerin oluşum sürecidir. Tüm bunların sonucunda konak organ hücreleri besin sağlayamaz ve yoksunluğa düşerek ölür (Kroll ve ark. 2010).

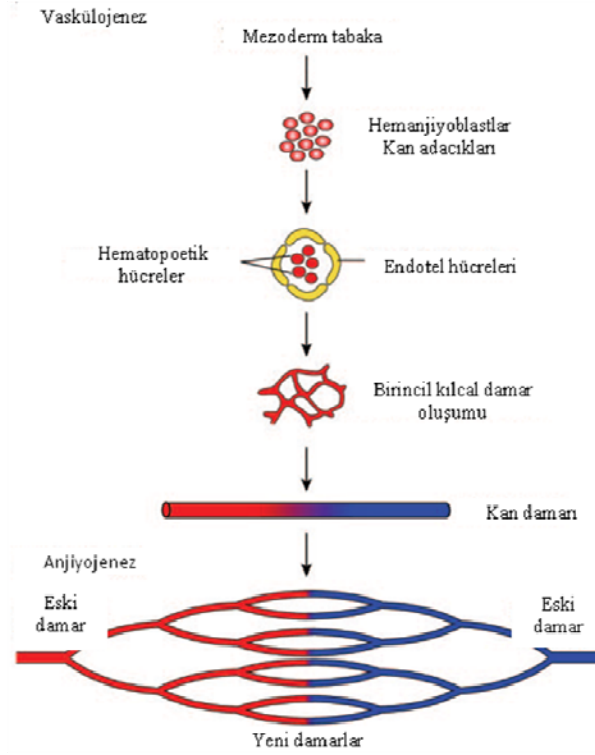
Kanserli dokuda meydana gelen tümörün büyümek ve metastaz yapabilmek için yeni kan damarlarının oluşmasına yani anjiyogenez mekanizmasının başlamasına ihtiyacı vardır. Bu şekilde tümörlü doku kendini besleyerek metastaz yapabilir ve diğer dokulara ulaşarak buraları da kanserleştirebilir (Bamias ve Dimopoulos, 2003). Bu sebeple anjiyogenezi hedef alan tedaviler son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır. Anjiyogenez devingen (dinamik), kompleks, pozitif ve negatif düzenleyicileri olan pek çok enzim türünü içeren çok basamaklı bir enzimatik süreçtir. Sağlıklı bireylerde anjiyogenez genellikle down-regülasyon gösterir, bu sebeple güvenilir anti-anjiyogenik bileşiklerle anjiyogenezi hedef almak, damarların gelişme sürecinde yan etkiye sebep olmadan hasarlı dokuyu öldürebilir. Pek çok anjiyogenik inhibitör fonksiyonel gıdalardan izole edilir. Hücre kültürü ve hayvan modelleriyle yapılan araştırmalar fonksiyonel gıdalar ve bunlardan elde edilen bileşiklerin güvenilir, etkili, toksik etkiye sahip olmayan, tersinir inhibitörler olduğunu göstermiştir. Bu nedenle tedavi için kullanılabilir ve düşük bütçe gerektiren reçeteler olabilirler (Losso 2003).

1.2. ANJİYOJENEZ

1.2.1 Anjiyogenez nedir?

Vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olan **anjiyogenezis** mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması demektir (Gao ve ark. 2010). Embriyonik gelişim sürecinde temel bir zorunluluk olarak meydana gelen vaskülojenez perfüzyon (kan yoluyla madde taşınması) ile vücut dokularının beslenmesini sağlar. Embriyonik süreçte meydana gelen yahut kök hücre ve

prekürsör hücreler tarafından oluşan damarlanmalar anjiyojenez değil vaskülojenezdir (Geva ve Jaffe 2004 Lamalice ve ark. 2007).



Şekil 1.1. Vaskülojenez ve anjiyojenez süreci

İlkin damar oluşumu sürecinde mezodermal hücreler hemanjiyoblastlara farklılaşır ve böylece küçük kan adacıkları oluşur. Adacığın merkezindeki hemanjiyoblastlar hematopetik kök hücreleri uyararak olgun endotel hücrelerin öncüleri olan anjiyoblastlara dönüştürür. Anjiyojenik faktörlerle uyarılan endotel hücreleri hareket etmeye başlar ve kan adacığının birleşerek tübül bir form oluşturmasını sağlar. Tübül yapının şekillenmesiyle birlikte birincil damarsal ağ oluşmuş olur. Vaskülojeneze karşılık anjiyojenezde yeni kan damarları bir önceki damarsal ağdan köken alarak çıkar (Şekil 1.1.) (Lamalice 2007).

Anjiyojenez organizmanın büyüme ve gelişmesini sağlamak için gerekli ve hayati bir süreçtir. Aynı zamanda yara iyileştirme gibi hasarlı organizmanın iyileştirilmesini gerektiren süreçlerde de gereklidir. Bununla birlikte solid tümörün yapabilmesi için de olmazsa olmaz bir bşamaktır (Piotrowska ve Forsy 2011). Yetişkin bireylerde yara iyileştirme, yorgun kasın adaptasyonu, büyüme,

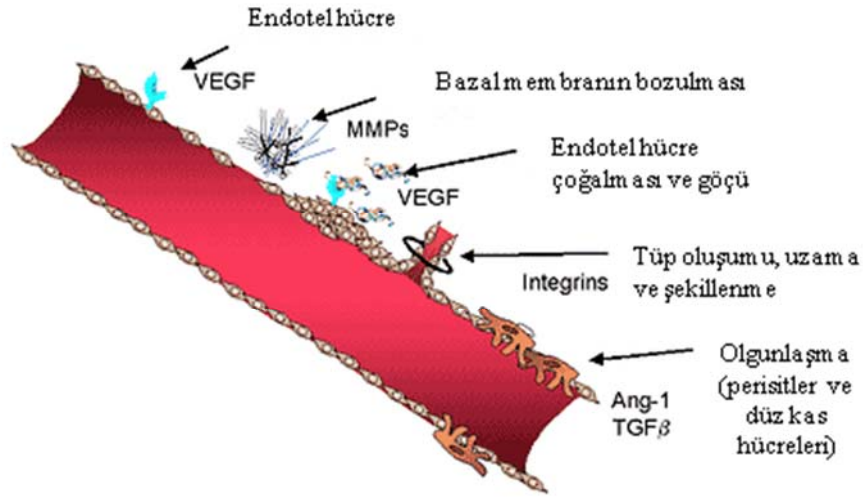
olgunlaşma, kadınlarda menstrual dönem gibi fizyolojik süreçlerde ve kanser, diyabetik retinopati, yaşa bağlı maküler dejenerasyon (göz hastalığı), romatoid artrit, endometriyoz ve sedef hastalığı gibi patolojik durumlarda gerçekleşen damar oluşumları anjiyogenez olarak isimlendirilebilir. (Mouta ve ark. 2003).

1.2.2 Anjiyogenez mekanizması

Anjiyogenez mekanizması oldukça karmaşık bir süreçtir. Ekstrasellüler matriks ile matriksi çevreleyen hücreler tarafından salınan büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar. Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci esnasında en önemli role sahip temel hücrelerdir. Endotel hücreleri perisitler ile birlikte kapiller hücre damarını meydana getirirler ve ana damarları, bu damarlardan çıkan dalları ve kapiller ağı oluşturacak olan genetik bilgileri içerirler. Erişkin insanlardaki vasküler endotelial hücreler düşük yenilenme hızına sahip olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturabilme yeteneğindedirler. 70 kg'lık bir insanda bir trilyondan fazla endotelial hücre, kan damarlarının içini döşer ve bu da yaklaşık 1000 m²'lik bir alana eşittir. Endotelial hücrelerin yenilenme süresi (yaşam siklusu) 1000 günü geçer (Konukoğlu ve Turhan 2005).

Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Anjiyogenik süreçte birinci basamak vazodilatasyon yani damar genişlemesi ile başlar, bunu membran geçirgenliğindeki artış takip eder ki bu da damarlardaki por oluşumunu, vezikovuoler organelleri plâtel endotel hücre adhezyon molekülü(PECAM)-1 ile vasküler endotel (VE)-kadeherinin yeniden dağılımını tetikler. Kararsız hale gelen damar endotel hücrelerinin hücre içindeki kararlılıklarını ve hücre dışı endotel hücre desteğini kaybetmelerini sağlar. Bunun yanında bazal membrandaki proteolitik değişiklik ve indirgenme plazminojen aktivatör, matriks metaloproteinazlar, kollojenler, kimaz ve heparinaz proteinazları tarafından yeni oluşan damarların etrafını kuşatır. Ekstrasellüler matriksin bozulması da fibroblast büyüme faktörü (bFGF ya da FGF-2), asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF ya da FGF-1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi endotel hücre çoğalmasını uyaran anjiyogenik büyüme faktörlerinin salınımı ve aktivasyonu ile

sonuçlanır. Böylece çoğalan endotel hücreleri birbirlerine tutunarak yeni lümenlerin ya da kapillerlerin tomurcuklanmasını ve uzamasını sağlar. Yeni lümeninde endotel hücreler değişerek göçtükleri dokuya uygun karakteristikte hücrelere dönüşürler. Vasküler ağ oluşumunun tamamlanmasıyla süreç tamamlanır ve damarlar olgunlaştıktan sonra ortamdaki anjiyogenik faktörlerde azalmaya başlar ve anti anjiyogenik faktörlerin salınımı ile anjiyogenez tamamlanır, damarlar kan akışını sağlayabilecek hale gelmiş olurlar (Tassi ve Wellstein 2007).



Şekil 1.2. Anjiyogenez süreci

Özet olarak anjiyogenez süreci aşağıdaki şekilde gerçekleşir:

- Hastalanma veya yaralanmış doku anjiyogenik büyüme faktörlerini üretir ve salgılar, bu faktörler de difüzyon yoluyla yakın dokulara ulaşır.
- Salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri en yakında bulunan kan damarına ait endotel hücreleri üzerinde bulunan spesifik CD34 reseptörüne bağlanır.
- Büyüme faktörü bir kez endotel hücrelerine bağlandığında endotel hücreleri aktif hale geçer ve sinyal hücre yüzeyinde nükleusa iletilir.

- Aktive olan endotel hücreleri hızla bölünmeye, çoğalmaya ve göç etmeye başlar, bazal membranı parçalayarak küçük delikler açacak olan matriks metalloproteinaz enzimlerini sentezler.
- Göç etmeye başlayan endotel hücreleri sinyalin geldiği hasarlı veya hastalıklı dokuya doğru yönelir ve bu hat üzerinde yeni kılcal damar oluşumunu sağlar.
- Adhezyon molekülleri olan integrinler sayesinde bir önceki kandamarından dışarı filizlenmeye başlayan yeni damar hücreleri bir kanca ile bağlanmışçasına birbirlerine tutunup uzamaya başlar.
- Filizlenen endotel hücreleri tüp oluşturacak şekilde toplanırlar.
- Filizlenen ve daha sonra tüp oluşturan hücreler gelişerek lümenleri oluşturur.
- Oluşan yeni kan damarının sabitliği perisitler ve düz kas hücreleri tarafından sağlanır (Anonim 2011).

1.2.3 Bazal membran, endotel hücreleri ve VEGF ilişkisi

Bazal membran ve endotel hücreleri anjiyogenez sürecinin iki başrol oyuncusudur. Kapiller ve diğer damarları astarlayan endotel hücreleri damar içine yayılmış ve yassılaştırmış forma sahip tek tabakalı hücrelerdir. Damar yüzeyi kollojenler ve laminin ile kaplıdır. Bu kısım bazal lamina olarak adlandırılır. Bu katman devamlıdır ve endotel hücreleri üzerinde bir iskele (ekzoskeleton) görevi görür. Endotel hücreleri temel olarak bazal laminadan köken alır ve endotel hücreleri ile bazal lamina arası ise fibroblast ve düz kas hücreleri tarafından astarlanmıştır. Herhangi bir anjiyojenik sinyal karşısında kapillere yakın olan endotel hücreleri koyu renk bir görünüm alır ve bazal laminanın niteliğini bozacak proteolitik enzimler üretmeye başlar (Sleeman 2003).

Anjiyogenez süreci proanjiyojenik ve antianjiyojenik faktörlerin düzenlediği ve mevcut damardaki vasküler endotel hücrelerinin göç etmesini gerektiren bir süreçtir. Endotel hücre göçü pek çok basamaktan oluşur ve yeni bir damarın oluşması için olmazsa olmazdır (Gao ve ark. 2010). Endotel hücre göçü üç farklı mekanizmada gerçekleşir. Kimyasal ekenlere cevap olarak kemotaksis,

mekanik etkenlere cevap olarak gerçekleşen mekanotaksis ve ligandlara doğru yönlendirilmiş olarak haptotaksis yapan endotel hücreleri anjiyogenez süreci boyunca göç ederek yeni damarın filizlenmesini ve uzamasını sağlarlar. Endotel hücreleri vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve anjiyoproteinler gibi kimyasal moleküllere yanıt olarak çoğalmaya ve göç etmeye başlar. Bu faktörlere cevap olarak çoğalmaya başlayan endotel hücreleri aynı zamanda hücre dışı matriksi parçalayacak ekstra sellüler enzimler üretirler. Hücre dışı matriksi parçalayan matriks metalloproteinaz enzimi matriks bileşenlerine bağlanır ve matriksi parçalayarak endotel hücre göçünü artırır. Artan endotel hücre hareketi ile birlikte bu defa adhezyon molekülleri olan integrinler hücre dışı matrikse bağlanarak onun tekrar sabitlenmesini ve lümen oluşumunu desteklemeye amaçlar, buna cevap olarak da uzamayı sağlamak için endotel hücre hareketi daha da artar ki bu da haptotaktik harekettir. Mekanotaktik hareket ise sıvı aksiyon stresine cevap olarak gerçekleşir. Kan damarlarının iç yüzeylerindeki yerleşimine bağlı olarak endotel hücreleri sürekli olarak sıvı aksiyon stresine maruz kalırlar. Mekanotaktik hareket damarın öne doğru uzaması, hücre dışı matriksle endotel hücrelerinin adhezyonu ve büyüme esnasındaki gerekli olan adhezyon moleküllerinin sentezi gibi basmakları etkiler. Kısacası endotel hücre göçü mekanik olarak tamamlanan moleküler bir süreçtir (Lamalice ve ark. 2007, Chen ve ark. 2010).

1.2.3.1 Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)

Endotel hücrelerine özgü olan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenez etkileyen anaktar faktördür ve ilk olarak 1983 yılında keşfedilmiştir. VEGF ailesi 6 farklı üyeden oluşur. Bunlar VEGF-A, plasental büyüme faktörü (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve *Trimeresurus flavoviridis* yılan venomu VEGF' dir (Ma ve ark. 2011).

En bilinen VEGF molekülü insan VEGF olarak da adlandırılan VEGF-A 'dır ve endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGFR-1 (Flt-1) reseptörüne bağlanarak endotel hücrelerini aktive etmekle görevlidir. VEGF endotel hücre göçünü ve çoğalmasını düzenler. Aynı zamanda proteolitik enzimler olan ve hücre dışı matriksi parçalayan matriks metalloproteinaz (MMPs) ve ürozin kinaz

tipi plazminojen aktivatorün (uPA) sentesini uyarır. VEGF'in en göze çarpan özelliği fizyolojik anjiyogenezi düzenlemesidir (Ma ve ark. 2011). Endotel hücrelerine özgü olan vasküler endotel büyüme faktörünün oldukça önemli etkileri vardır. Pek çok fizyolojik olayın yanı sıra tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik koşullarda da etkin göreve sahiptir (Lohela ve Alitalo 2003). VEGF vücutta ovaryum folikülleri, korpus luteum, akciğer alveoler hücreleri, renal glomerül visseral epitelyum hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, leyding hücreleri, aktive makrofajlar, arteriollerini çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitelyum hücreleri, hepatositler gibi pek çok farklı hücrede sentezlenir. VEGF yapımı trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB, keratinosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, tümör nekrozis faktör- α , transforming büyüme faktörü- β 1 ve interlökin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Ancak bunların içerisindeki en etkili uyaran ve VEGF reseptörlerinin yapımını indükleyen hipoksidir (Yazır ve ark. 2004). Hipoksi dokunun oksijen azlığına mağruz kalması durumudur ve tümörler 1-2mm³ boyutuna ulaştıklarında ortamdan difüzyon yoluyla yeterli oksijen sağlayamadıklarından strese girerek anjiyogenik sinyaller yollamaya başlarlar yani VEGF salınımı başlatırlar (Rajedran ve Krohn 2008).

VEGF'in anjiyogenik etkisi VEGF-2'nin izoformu olan bir cDNA klonunun MCF-7 hücreleri üzerinde transforme edilmesiyle Zhang HT ve arkadaşları tarafından (1995) açıklanmıştır.

VEGF-A diğer bir adıyla insan-VEGF geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır ve bilinendört izoformu vardır. Bunlar VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 adlandırılmışlardır. İsimlerindeki sayılar içerdikleri amino asit miktarını göstermektedir. Bununla birlikte 2 farklı izoform daha rapor edilmiştir bunlar da VEGF145, ve VEGF183 dür. VEGF özünde heparine bağlanan homodimerik bir glikoproteindir. VEGF121 ise yine asidiktir ancak heparine bağlanmaz ve difüze olur. Daha uzun bir form olan VEGF189 ve VEGF206 oldukça basit proteinlerdir ve hücre dışı matriksin heparin içeren proteoglikanlarına bağlanırlar (Ma ve ark. 2011).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki VEGF'in mitojenik, anjiyogenik ve damarsal geçirgenliği arttırmasından VEGFR-2'ye bağlanabilmesi sorumludur.

VEGF tek başına damar geçirgenliği ve anjiyogenez başlatarak tümörün büyüme ve yayılmasına katkıda bulunabilir. Bu nedenle VEGF'in kontrolü ve görevinin tam olarak anlaşılabilmesi anjiyogenez sürecini hedef alan tedaviler için çok önemlidir (Otrock ve ark. 2011).

1.3 Kanser ve Anjiyogenez İlişkisi

Anjiyogenez süreci kanserin gelişiminde çok nemli role sahiptir (Chen ve ark. 2011). Tümör oluşumunun birinci safhasında tümör hücreleri çok hücreli kürecikler (MCS) adı verilen küçük küresel kümeleşmeler meydana getirirler. MSC'ler çeşitli besin ve oksijenleri dışarıdaki damarlardan difüzyon yolu ile alırlar. Bu andan itibaren doygunluğa ulaşarak büyüyen hücre kütleleri 1-2mm³'e ulaştıklarında hücre kitlesi gıda ve oksijen gereksinimini difüzyon yoluyla karşılayamaz hale gelir ve zayıf şekilde beslenen kanser hücreleri FGF, VEGF, VEGFR, Ang-1 ve Ang-2 gibi endotel, fibroblast ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan ve yeni yeni damarı sabitlemek ile görevli olan pek çok anjiyogenik faktörü salgırlar (Piotrowska ve Forsy, 2011). Anjiyogenez büyümekte olan tümörün kendini beslemesi için gerekli olan kan akışını sağlar. Kanser hücrelerinin hayatta kalabilmelerini sağlamak ve diğer dokulara metastaz yapabilmeleri için damarsal bir ağ oluşturabilmeleri çok önemlidir. Anjiyogenez aynı zamanda akut lenfoblastik lösemi ve b-hücreli non-Hodgkin's lenfoması olan hastalarda kemik iliği ve lenf nodlarında büyüyen yeni kan damarlarının oluşmasındaki hematolojik malignanside de önemli bir süreçtir (Kerbel ve Folkman 2002). Fizyolojik anjiyogenezdeki sinyal sisteminin tam tersi olarak tümörden kaynaklanan sinyaller düşük oksijen ve besin miktarı ya da onkogenik alterasyonların sonunda oluşur ve anjiyogenez kontrol eden faktörlerde anormal gen ekspresyonlarına sebep verir (Rak ve ark. 2002). Bunun sonucunda düzensiz ve karmaşık anjiyogenik yanıt gelişir. Tümör kan damarları genişleme, tamamlanmamış veya eksik vasküler endotel astarlanmalar ve bazal membran, sızıntılar, düzensiz ve eğri büğrü bir damarsal arteriyovenöz kıvrılmalar, kör sonlar, kasılabilir duvar bileşenleri ve hücre reseptörlerin eksikliği gibi sayısız anormallikler gösterirler (Rajendran ve Krohn 2008).

Tümör hızlı büyüdükçe sahip olduğu damarların olgunlaşması azalır. Bu oldukça önemli bir noktadır. Çünkü sahip olunan damar sayısı kadar bu damarların olgunluğu da etki, yarar ve kapasite açısından önemlidir. Bu tümör mikrosirkülasyonu sırasında düzensiz hematokritlere, oksijen gerilimine ve ilaç konsantrasyonlarına sebep olur. Bunun sonucu olarak da hastaya uygulanan kanser terapisinin etkisi azalır. Solid tümörler büyüebilmeleri için kan damarlarına ihtiyaç duyarlar ve bu yüzden pek çok yeni kanser terapisi tümör damarsal ağını hedef almıştır. Anti-anjiyogenik terapilerin tümör damarlanmalarını tahrip ederek tümörün oksijen ve besinden yoksun kalmasını sağlayacağı fikri araştırmacılar tarafından kabul görmektedir (Harris ve Generalli 2008).

1. 4. Metastaz

Genel olarak kanser metastazı büyüme faktörleri, hücre adhezyon molekülleri, matriksi bozan enzimler ve endotel hücre göçünü sağlayan faktörleri içeren birbiriyle ilişkili bir seri olayı barındırır (Chen ve ark. 2010). Metastazik süreç kendi içinde de pek çok dallara ayrılabilen bir dizi basamağı içerir bunlar; primer malignant tümör, neovaskülerizasyon, invazyon, embolizm, uzaktaki organın kapiler yatağını kesmek, adherans, extravazasyon, yeni tümörün oluşması (metastaz), metastazın metastaz olması şeklinde sıralanabilir (Fidler 2002). Bu basamakların herhangi birinde meydana gelen olumsuzluk sürecin etkilenmesine ve metastazın tamamlanamamasına sebep olur (Plumb ve Coomber 2006).

Malign tümör metastazları ile ilgili olarak iki teori öne sürülmüştür. Bunlar;

1889'da Stephan Paget metastaz sürecinin şans eseri başlamadığını, diğerlerine göre daha kararlı ve üstünlüğü olan tümör hücrelerinin metastatik aktivasyona sahip olduğunu söylemiş ve bu hücreleri "tohum" olarak adlandırmıştır. Paget'e göre bu hücreler özgün organlar içerisinde büyümelerini tetikleyecek ortam bulabilme eğilimindedir ki bu organa da "toprak" adını vermiştir. Bu teoriye göre metastaz ancak tohum ve toprak uyumlu olduğunda gerçekleşebilir. Diğer bir deyişle Paget metastazın tümörün mikroçevresine eğilim göstermesine bağlı olduğunu dile getirmeye çalışmıştır (Rebattive ve ark. 2006).

Paget'in hipotezinin birincil olarak açıkladığı şey bir kanser hücresinin neden belirli bir bölgeye metastaz ettiğidir, bu metastazın oldukça basite indirgenmiş bir yorumudur çünkü metastaz süreci ilke ve aşama olarak bundan çok daha karmaşıktır (Fidler, 2002). Tümörler heterojendir; tümörün oluşmasını sağlayan hücreler ayrı bir yerde de büyüme ve hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir. Buna rağmen metastaz metastatik süreçte bulunan basamaklardan birden fazlasını yapabilme yeteneği olan hücreleri seçer. Sonuç olarak metastatik lezyonun oluşma süreci metastatik hücreler ve homeostatik mekanizma arasındaki çoklu etkileşime bağlıdır (Plumb ve Coomber 2006).

James Ewings ise Paget'in tohum ve toprak teorisine karşın kendi hipotezini ortaya koymuş ve metastazik yayılmanın vasküler sistemdeki anatomik yapının sonucu olarak ortaya çıkan mekanik faktörlerle alakalı olduğunu öne sürmüştür. Bu sebeple metastazın tamamen birincil tümörün vasküler bağlantısıyla alakalı olduğunu söylemiştir. Tümörler vasküler bağlantısı en yakın olan organın metastazik kümeleşmeden ilk olarak etkileneceğini söylemiştir (Rebattive ve ark. 2006).

Hücreler hücre döngülerine devam ederek pek çok dokuda damar dışına sızarlarken hücrelerin yayılmaya başladığı doku kemokin ve ligandların reseptörleriyle olan etkileşimleri (Moore 2001) veya selektinler ve onların organlarda bağladıkları yerler (Kim ve ark. 1999) kontrol edilebilir. Kan akışına karışabilecek kadar hayatta kalabilen hücreler mikrosirkülasyonda hapsolurlar ve oluşturdıkları metastatik tümör son derece küçük çapta gelişir (yaklaşık % 0,01). Kanser hücrelerinin metastazdan sonra meydana getirdikleri bu büyüme metastatik yetersizlik olarak adlandırılır. Metastaza uğrayan tek hücreler yüksek oranda (% 70-80) bölünemezler; bunun yerine hareketsiz kalırlar. Eğer tümör büyüme yeteneğine sahipse ve anjiyojenezi uyarıyorsa tümör dormansisi tersine döner ve hızlı bir büyüme ortaya çıkar (Chambers ve ark. 2000, Holmgren ve ark. 1995). Böylece yeni dokuya ulaşan hücreler burada tekrar çoğalarak bulundukları yeni dokuya da kanserli hale getirirler (Voulgari ve Pintzas 2009).

1.5 Kanser Tedavisi ve Doğal Ürünler

Günümüzde kanserin yaygın tiplerinden kaynaklanan ölüm oranı oldukça yüksektir. Kansereleşme sürecini tedavi edebilecek pek çok avantajın çeşitli araştırmalarla keşfedilmiş olmasına karşın doğal ürünlerin kanser tedavisinde yeni kemoprotektif ajan olarak kullanılmaya başlanmasına kadar kanser ölümlerindeki istatistiki verilerde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Doğal ya da yarı doğal bileşikler kanser gelişim sürecini ya da yayılmasını iyileştirmek ve önlemek amacıyla kullanılabilirler. M.Ö 480 yılında Hipokrat şunda yaşam şekli olarak adlandırılan bir takım durumları tanımlamış ve sağlıklı olmak insanın doğal ve işlenmiş besinleri kendi bünyesinde uygun şekilde tüketilmesiyle mümkün olur demiştir. Yapılan çalışmalar da doğal ürünlerin dünya genelinde yaygın olan pek çok kanser türüne karşı kanser önleyici ajan olarak kullanılabilceğini işaret etmektedir. Bu ürünlerin büyük bir bölümü güçlü antioksidanlardır. Diğer kısmını fenolik bileşikler ve koruyucu özelliklere sahip reaktif gruplar içerenler oluşturur (Reddy ve ark 2006).

Kanser tedavisinde bitkilerin kullanımı çok eski tarihlerden beri yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Yapılan pek çok araştırma 3000'den fazla bitki türünün bu amaçla kullanıldığını rapor etmektedir. Kanser tanımı yapılmadan önce de tarihte şişme, apse, kemiklerin kaynamasını sağlamak, nasır tedavisi, polipler veya tümörlerin iyi edilmesinde bitkisel kaynaklara başvurulmuştur. Tüm bu semptomlar genelde deride dokunularak anlaşılabilir veya gözle görülebilir semptomlardır ve kanser oluşumunun belirtileridir. % 60'ın üzerindeki anti-kanser ajan bir şekilde deniz organizmaları, mikro organizmalar ve bitkileri içeren doğal kaynaklardan türev alır. Bitkiler, deniz organizmaları ve mikro organizmalar gibi doğal kaynaklardan türev alarak üretilen moleküller doğal ürünler olarak adlandırılır ve bu doğal ürünler birçok hastalığın konvansiyonel ilaç tedavisinin geliştirilmesinde baskın rol oynamıştır ve oynayacaktır. Ulusal kanser enstitüsü tarafından destek alarak geniş kapsamlı kanser ilaç araştırması yapan programlar doğal bileşiklerden kanser önleyici ilaç yapılması ve geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Doğal ürün tabanlı ilaç geliştirilmesi yeni teknolojilerle birlikte giderek artmaktadır (Cragg ve Newman 2004, Nobili ve ark 2009).

Doğal ürünlerin sahip olduğu kimyasal özgünlük pek çok diğer kaynaktan daha yüksektir: yayınlanmış olan % 40 civarındaki doğal ürünün kimyasal yapısı (Dictionary of Natural Products, Chapman&Hall) diğer herhangi bir sentetik kimyasalda mevcut değildir (Harwey, 2000).

Doğal ürünler ilaç araştırmaları amacıyla kullanılmalarının yanında tedavi amaçlı destek gıda olarak da tüketilebilmektedirler. Destek gıdalar veya tamamlayıcı gıdalar tam olarak besin sayılmayan ancak belirli oranlarda tüketildiklerinde toksik etkiye sebep vermeyen birtakım kimyasallar içerirler. Bununla beraber bazıları antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinden dolayı yiyeceğin kalitesinin korumasına yardımcı olduklarından bu bileşikler genellikle zararsız olarak bilinir. Yapılan pek çok araştırma bu tarz kimyasalların diyetle birlikte alındıklarında vücut hemeostazisi (dengesi) ve sağlığın korunmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Epidemiyolojik çalışmalar sebze ve meyve tüketimiyle kronik kalp rahatsızlıkları ve bazı kanser çeşitleri arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Bu sebeple besin olarak tüketilebilen çeşitli bitkilerin ilaç hammaddesi olarak da kullanılabileceği fikri araştırmacıları bitki ekstrelerinin etkilerini incelemeye teşvik etmiştir. Pek çok araştırmacı bu sebeple bitki ekstreleriyle çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yaparak sağlığa karşı olumlu ve olumsuz etkilerini değerlendirmektedir. Ancak bu çalışmalarda göz ardı edilmemesi gereken bir diğer husus da ayrı ayrı iken toksik etkiye sahip olmayan ekstrelerin bir arada kullanıldıklarında içeriklerindeki kimyasalların etkileşimi sonucu farklı fayda ve zarara sebebiyet verebileceği gerçeğidir (Chesson and Collins 1997). Beslenme faktörlerinin dünya genelindeki kanser vakalarından % 20-60'ı ile alakalı olduğu bilinmektedir. Kalp rahatsızlıkları ve kronik hastalıklarla beslenme ilişkisine dair yapılan çalışmalara kıyasla kanser ve beslenmeye ilişkin daha az çalışma bulunmaktadır (Mc Cullough ve Giovanni 2004).

Yurdumuz coğrafik konumu ve verimli toprak yapısı sayesinde pek çok bitki çeşidinin yetişmesine elverişli ortam sağlamaktadır. Çeşitli tıbbi ve aromatik bitkinin yetiştiği ülkemizde 9000 kadar bitki türü bulunmasına rağmen bunlardan yeterince yararlanılamamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aromatik bitkilerin faydaları üzerine dikkat çekilmeye başlanmıştır (Yaşar ve ark 2009).

Bitkilerin ilaç ham maddesi ve gıda desteği olarak kullanılmalarında iki handikap vardır; birincisi genellikle pek çoğunun oldukça kompleks karışımlara sahip olması, ve bu bileşenlerin sinerjik ve faydalı etkilerinin kompozisyonda meydana gelebilecek en ufak bir değişiklikte ilacın aktivitesini değiştirebileceği gerçeğidir. Diğer bir handikap ise kullanılan bitkilerin türden türe veya aynı tür içerisinde bile farklı etki gösterebileceği, bitkinin yetiştiği iklim şartları, toprak yapısı gibi faktörlerin bitkinin bileşenlerinde miktarı etkileyerek farklı etkileşimler meydana getirebileceği gerçeğidir. Bu nedenle bitkilerle yapılan çalışmalarda kullanılan materyalin toplandığı yerler de çok önemlidir (Chesson ve Collins 1997).

1.5.1 Üzüm

Üzüm (*Vitis vinifera*), Vitis cinsine ait, anavatanı Akdeniz olan, Avrupa ve Asya kökenli bir bitkidir. Yeryüzünde kültürü yapılan en eski meyve türlerinden bir tanesidir. Üzümün bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir;

Alem : Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

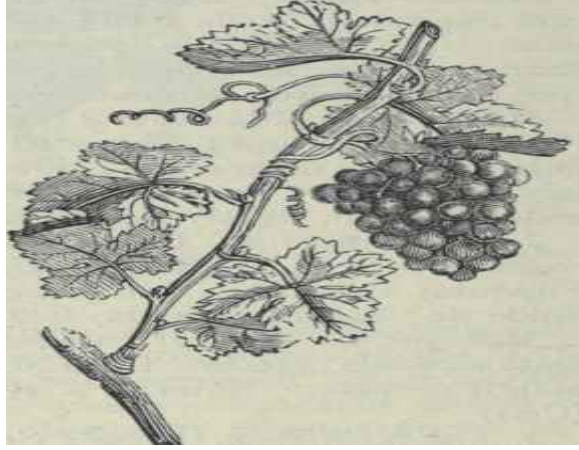
Takım: Vitales

Familya: Vitaceae

Cins: Vitis

Tür: Vitis vinifera

Özellikle Mayıs ve Haziran aylarında çiçek açan, çok yıllık ağaçsı bir bitkidir. Yumuşak bir meyvesi vardır ve yeşil, kırmızı ya da mor renklere sahip olabilir. Dalları 35m'ye kadar uzar ve pullu bir gövdeye sahiptir. Yaprakları 5-20cm genişliğinde, taban kısımları kalp biçiminde ve saplıdır. Yabani türlerinde meyva çapı 6mm'ye kadar çıkmaktadır (Anonim 2008).



Şekil 1.3. Üzüm (*Vitis Vinifera*)

Vitis vinifera vücut içerisindeki temizleyici etkisinden dolayı “meyvelerin kraliçesi” diye adlandırılır. Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdekleri proantosiyanidinlerce zengindir (Katiyar 2008). Proantosiyanidinler sebze, meyve, fındık, çekirdek, çiçek ve kabuklarda doğal olarak bol miktarda bulunur. Proantosiyanidinler ; (+) katekin, (-) epikatekin şeklinde polihidroksi flavan-3-ol’ün polimer ve oligomerlerinden elde edilen fenolik bileşiklerdir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidin özütleri (GSPE) pek çok flavonid bileşeninden oluşan bir karışımdır ve etkili antioksidant aktivite gösterdiği (Hung ve ark. 2000) ve üzüm çekirdeği türevlerinden elde edilen ürünlerin tüketiminin kardiyovasküler hastalıkların azalmasında etkili olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Das ve Maulik 2006). Siyah üzümler kabuk ve çekirdeklerinde oldukça yüksek miktarda fenolik bileşik bulundururlar. Bu bileşikler (antosiyanidin, proantosiyanidin, stiben ve fenolik asit) oksidatif stresin sebep olduğu hastalıkları önlemeye yardımcı olurlar. Aynı zamanda antioksidan, antikanser anti-inflamatuvar ve antibakteriyel özellikleri vardır. Hücresel faaliyetlerin ateroskleroz koroner kalp rahatsızlıklarına sebep vermesini bloke ederler. Bu sebepten ötürü kardiyoprotektif ajan olarak görülürler (Luis ve ark. 2011). Üzümden bulunan polifenollerin % 75’i kabuk ve çekirdektedir, fakat konsantrasyon ve nitelikleri coğrafik faktörlere göre değişir. Bundan dolayı üzüm kabuğu ve çekirdeğinden olabildiğince yüksek konsantrasyonlu polifenol bileşiği elde etmek önemlidir, böylece yiyecek ve içeceklere destek gıda olarak eklenebilirler. Bununla birlikte bazı çalışmalar yüksek konsantrasyondaki fenolik

bileşiklerinin aşırı miktarda antioksidan üretmelerinden kaynaklı olarak sitotoksik olduklarını ve sağlık için olumsuz etki yaratabileceklerini göstermektedir (Ugartondo ve ark. 2006, Fan ve Lou 2004). Ürünün polifenol içeriğini maksimum seviyeye getirmek ve organik çözücülerle ekstraksiyon sürecini minimize etmek amacıyla bazı patentlerde üzüm polifenollerini üzüm suyu ve şarap gibi ürünlerin üretiminde ham madde olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler yüksek enerji ve fruktoz alımına bağlı olarak sırasıyla kilo alma ve insülin direncine sebep olabilirler (Gollucke 2010). Bu şekildeki gıdasal kullanımlarından dolayı, bu ekstraktların biyoaktif ve güvenli olduğunu göstermek önemlidir. Üzüm ve şarapta bulunan pek çok fenolik bileşik aktif transport sistemi veya pasif difüzyonla kan dolaşımında daha iyi absorbe olabilen metabolitleri üretebilmek için sindirim sistemi florası tarafından şiddetli bir şekilde metabolize olur (Lluís ve ark. 2011).

Üzüm çekirdeği ekstresi (*Vitis vinifera* L.) antitümoral etkiye sahip olduğu bilinen ve yaygın olarak kullanılan gıda desteğidir (Wen ve ark. 2008, Kaur ve ark. 2007). Birçok araştırmacı tarafından lösemi, göğüs, prostat, deri ve bağırsak kanseri hücrelerine uygulanan üzüm çekirdeği ekstresinin hücre çoğalmasını, tümör oluşumunu, hücre göçünü, angiogenezi (yeni damar oluşumunu) engellediği ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Gao ve ark. 2009, Wen ve ark. 2008, Punathil ve Katiyar 2009, Hsu ve ark. 2009, Akhtar ve ark. 2009). Bu sebeplerle proantosiyanidin zengin üzüm çekirdeği özütleri özellikle Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Japonya, Kore ve pek çok ülkede gıda desteği olarak marketlerde yer almaktadır. Üzüm çekirdeği özütleri aynı zamanda Japonya’da yaygın bir şekilde yiyeceklerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Yamakoshi ve ark. 2002).

Reaktif oksijen türlerinin temizlemesine yardımcı olan GSPE ler (Rice-Evans 2004) iyi bir antioksidandır ve antioksidanların kanser riskini azalttığı bilinmektedir. Metabolizma ürünleri ve sigara kullanımı gibi dış faktörlerden kaynaklanan DNA, protein ve lipid hasarları vücutta çeşitli oksidanların açığa çıkmasına sebep olur. Her ne kadar DNA onarıcı enzimler tarafından bu hasarlar onarılsa da tamamen yeterli olmaz. Antioksidan maddeler, DNA’ya zarar veren bu reaktif oksijen bileşiklerini veya serbest radikalleri nötralize ederek kanser riskini

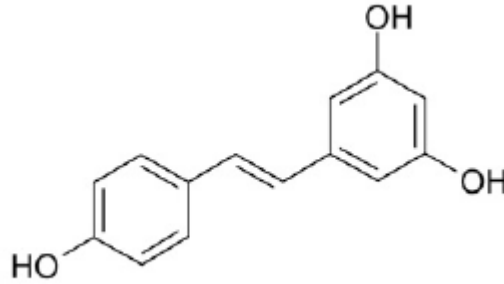
azaltır. Üzüm çekirdeğinde bol miktarda bulunan E vitamini insan vücudunda membranda lokalize olan yağda çözülebilen temel bir vitamindir. DNA hasarına sebep olan serbest radikalleri indirgeyerek bağışıklık sistemi etkilemesini önlediği için E vitamini kanser önleyici bir vitamindir. Ancak gıda şeklinde direkt olarak alınan E vitamininin ölçümü alınan gıdadaki yağ çeşidine bağlıdır ve zordur (McCullough ve Giovannucci 2004).

Sıçanlar üzerinde yapılan akut ve subkronik toksisite testleri ve genotoksisite testleri ile GSP'lerin, düşük toksisiteye sahip bileşikler olduğu ve antiproliferatif, antioksidatif ve antikarsinojenetik etkileri açıklanmıştır (Katiyar 2008). CaCo2 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar 10-100µg/ml oranında GSPE nin kolon kanserli hücreleri öldürdüğünü ancak normal kolon hücrelerine ait NCM460 hücre dizisine zarar vermediğini göstermiştir (Engelbrecht ve ark. 2007). Yapılan bir başka çalışmada üzüm çekirdeği özütlerinin ilerlemiş prostat kanserini durdurduğu apoptoza yol açtığı (Dhanalakshmi ve ark. 2003) ve pek çok çalışmayla tümör başlangıcı, meydana gelmesi ve devamlılığını kayda değer biçimde engellediği gösterilmiştir (Durak ve ark. 2005). Ancak ham çekirdek ekstresinin tüm bu etkileri için ayrıca bir değerlendirme gereklidir, bu sebeple üzüm çekirdeği ekstraktlarından elde edilen ekstraktın direkt olarak *in vitro* kültürde bakılması bu maddelerin destek gıda olarak oral yolla kullanıldıklarında insan sağlığı için etkilerinin neler olduğu konusuna ışık tutacaktır.

1.5.1.1 Resveratrol

Resveratrol (RV) pek çok bitki türünde özellikle de asmada bulunan ve iyi bilinen bir polifenoldür. Resveratrol (3,5,4'-trihidroxy-trans-stilbene) ilk olarak 1940 yılında beyaz bohça otugillerden *Veratrum grandiflorum* O. Loes köklerinden izole edilmiştir ve bu zamandan beri içinde üzümün de olduğu 70 farklı bitki çeşidinde bulunduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Resveratrolün *Vitis vinifera*'daki varlığı 1976 yılında bulgulanmış, 1992 senesinde ise şarap içeriğinde de var olduğu ilk olarak rapor edilmiştir. Bir çeşit stilbenoid olan resveratrol pek çok bitki çeşidini tarafından bakteri ve mantar gibi patojenlerin saldırısı durumunda doğal olarak üretilen bir çeşit fenol ve fitoaleksin

çeşitlidir. Fitoaleksin bitikinin herhangi bir patojenle karşı karşıya kaldığı durumda kendini savunmak amacıyla salgıladığı bir çeşit toksindir. Hücre duvarını parçalama, hücre büyümesini engelleme ve hücrenin metabolik aktivitesini bozma gibi çeşitli etkileri vardır (Glazebook ve ark. 1994, Saiko ve ark. 2008, Wang ve ark. 2010, Yue ve ark. 2011).



Şekil 1.4. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene; RV)

Asma ve şarap resveratrol kaynağı olarak oldukça önemli gıdalardır. Asmada (*Vitis vinifera*) mantar enfeksiyonu, UV ışığına maruz kalma, ozon tabakasının etkileri, yaralanma gibi biyotik veya abiyotik koşullardan kaynaklanan strese bağlı olarak resveratrol sentezlenmeye başlar. Şaraplardaki resveratrol içeriği şarap tipi, kullanılan üzümün çeşidi, şarabın yapılma şekli gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Resveratrol asma gövdesi, yaprağı, üzüm kabuğu ve çekirdeğinden elde edilir. Tüm bu organlardaki resveratrol dağılımı farklılıklar göstermektedir (Wang ve ark. 2010).

Resveratrol güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicidir. Bu özellik yapısal temeli katı durumdaki moleküler yapının geniş oranda hidrojen bağı içeren bir ağa sahip olması ile ilişkilendirilmiştir. Sahip olduğu antioksidan aktivitesinden dolayı kimyasal sebeplerle başlayan kanser oluşum sürecini engelleyebileceği düşünülmektedir. Resveratrol kalp hastalıkları, kanser, viral enfeksiyonlar, nörolojik tabanlı rahatsızlıklar gibi pek çok hastalığa karşı koruyucu etkiye sahiptir. Tüm bunlara ek olarak yaşam süresini uzatır ve fiziksel aktivite yeteneğini artırır, enerji verir (Colin ve ark. 2008).

Jang ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmalarında resveratrolün potansiyel bir kanserden koruyucu ajan olduğunu ve kanser oluşumunda önemli 3 ana süreç olan tümör oluşumu, gelişmesi ve yayılması gibi durumları

engellediğini göstermiştir. Resveratrolün kanserli hücre hatlarında büyümeyi engellemesi DNA polimeraz ve ribonükleotid redüktaz enzimlerinin azalmasıyla ilişkilidir ki her iki enzim birden hücre çoğalmasında görev almaktadır. Jang ve arkadaşlarının 1997 senesinde tamamladıkları bu çalışmanın ardından resveratrol özellikle kansere karşı yeni kemoteröpatik ajan araştırmalarında çok sıklıkla kullanılan bir bileşik haline gelmiştir (Bass ve ark. 2007).

Hücre döngüsündeki olayların zamanlamasının düzenlenmesinde bilinen pek çok protein bulunmaktadır. Organizmada bu düzenlemenin kaybı kanserin önemli sebeplerindendir. Hücre döngüsünü kontrol eden iki temel anahtar siklin ve siklin bağımlı kinazlardır. Siklin D-1, siklin bağımlı kinaz ve Cdk6'nın alt ünite bileşimidir ve G1 fazında hücre döngüsünün kontrolünden sorumludur. Her iki anahtar birden, hem siklin D1 hem de siklin bağımlı kinazın görevlerini yerine getirememesi tümör oluşumuyla yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda resveratrolün kanserli hücredeki bu kontrolsüz hücre döngüsünü durdurduğu bulgulanmıştır. Apoptoz ise hücre ölümü ile hücre yenilenmesi arasında, hasarlı ve anormal hücreleri ölüme programlayarak doğal bir denge sağlar. Bununla birlikte kanserli hücrelerde bu denge bozulur. Yapılan çalışmalar resveratrolün Bcl-2, Bcl-x gibi apoptozu durduran genleri baskıladığını göstermiştir. Yine bir başka çalışmada resveratrolün tümör baskılayıcı olan ve transkripsiyonu yöneten p53 proteininin aktivasyonunu artırarak apoptoz oluşumunu sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca yine resveratrolün epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, tümör nekroz faktör gibi pek çok büyüme faktörünün salınımını da engellediği bulgulanmıştır (Aggarwal ve Shishodia 2006).

Whitlock ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmalarında resveratrolün insan bağırsak kanseri hücreleri üzerinde tümör önleyici ve apoptozu engelleyici etkilerini göstermişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada resveratrolün bilinen bir kanser önleyici ajan olan paklitakselin hücre hatları üzerindeki öldürücü etkisini azaltıp azaltmadığına bakılmış ve bu amaçla insan göğüs kanseri hücreleri üzerinden resveratrol ve paklitaksel birlikte denenmiştir. İlginç bir şekilde bu kombinasyonun MDA-MB-435s, MDA-MB231 ve SKBR-3 hücre hatlarında paklitaksele bağlı hücre ölümünü yüksek oranda azalttığı saptanırken MCF-7 hücrelerinde bu durumun gözlenmediği

bulgulanmıştır. Bu sonuç resveratrolün farklı kanser önleyici ajanlarla birlikte kullanıldığında kanser tipine bağlı olarak zarar verici ya da faydalı etkisinin değişebileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Fukui 2010). Ko ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir başka çalışmada büyük hücreli anplastik lenfoma hücre hattı (ALCL) üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve hücre büyümesini engelleyerek hücrelerin farklılaşmasını tetiklediği ve hücreleri apoptoza teşvik ettiği bulgulanmıştır. Bir başka çalışmada fare lenfositik lösemi hücrelerinde (L1210) ve *in vivo* olarak farelerde resveratrol bileşiğinin hücre çoğalmasını engellediği, hücreleri apoptoza teşvik ettiği ve hücre döngüsünü etkilediği *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (Li ve ark. 2007). Wang ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmalarında resveratrolün anjiyogenezi engellediğini insan göbek kordonu hücreleri üzerinde göstermişlerdir. Azab ve arkadaşları ise yine 2011 yılında yaptıkları çalışmalarında resveratrolün anti-anjiyojenik etkisini mikro damar oluşumundaki yüzdelere bakarak değerlendirmiş ve düşük konsantrasyonlardaki resveratrolün VEGF salınımını ve anjiyogenezi tetiklediğini ancak yüksek dozlardaki resveratrolün bununı tam tersi bir etkiyle anjiyogenezi durdurduğunu bulgulamışlardır.

1.5.2 Zeytin

Zeytin (*Olea europaea*) Oleaceae familyasına mensup küçük bir ağaç türüdür ve anavatanı batı Akdenizdir. Meyvesi aynı zamanda zeytin olarak adlandırılır ve zeytin yağının da ham maddesidir. Zeytin boylu bir çalı ve yer yer 8-15 m'ye kadar uzayabilen yaprakları her daim yeşil olan uzun ömürlü bir ağaçtır. Zeytinin bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Anonim 2008);

Alem: Plantae
Bölüm: Magnoliophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Takım: Lamiales
Familya: Olaceae
Cins: Olea
Tür: Olea europaea



Şekil 1.5. Zeytin (*Olea Europaea*)

Zeytin (*Olea europaea*) ağaçları Akdeniz’de binlerce yıldan beri yetiştirilmektedir. Zeytin meyvesi yağının sağlık üzerine etkileri ve bu etkilerin Akdeniz diyeti ile ilişkisine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Zeytin yağı Akdeniz diyetinin bilinen en önemli sağlığı destekleyen tüketim ürünlerinden bir tanesidir. Kardiyovasküler ve metabolik hastalıklarda, inflamatuvar ve otoimmün rahatsızlıklarda, göğüs ve bağırsak kanserinden korunmada etkilidir (Shefler 2008).

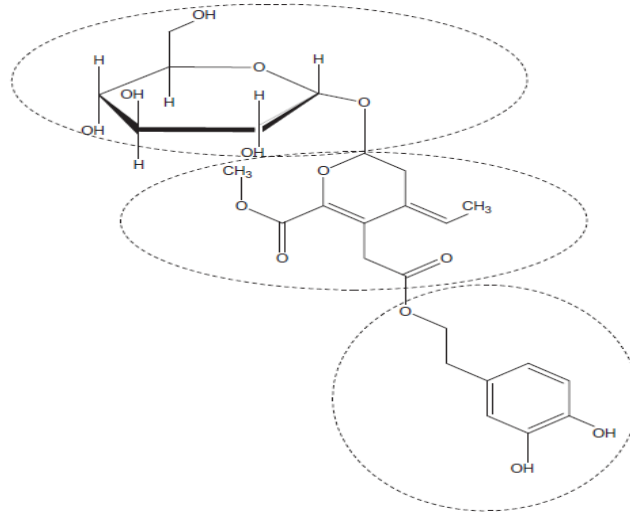
Sadece zeytin yağı değil aynı zamanda yapraklarından da medikal amaçlı faydalanılmaktadır. Zeytin yaprakları eski zamanlardan beri yüksek kan basıncı, aterosklerozis ve diyabet gibi hastalıkları tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Hiper tansiyon ve kolesterol düşürücü etkileri oldukça iyi bilinmektedir (Susalit ve ark. 2010). Zeytin yaprağı ekstraktları ticari bitkisel ilaç üretiminde ve marketlerde

yaşlanmayı geciktirici ürün olarak, bağışıklık sistemini güçlendirmek amacıyla ve antibiyotik olarak yer almaktadır (Long ve ark. 2010).

Zeytin yaprağı (*Olea europaea* L), sağlığa yararlı biyoaktif fitokimyasallarca zengin ve oldukça kolay ulaşılabilen doğal bir materyaldir. *Olea europaea* L. (Oleacea) yaprakları Tunus gibi Akdeniz ülkelerinde orta kulak iltihabı, diş eti iltihabı ve öksürük gibi bakteriyal enfeksiyonları ve pek çok iltihap çeşidini iyileştirmek amacıyla geleneksel tıpta yaygın biçimde kullanılmaktadır (Haloui ve ark. 2010). Yapılan çalışmalar işlenmemiş zeytin yaprağı ekstralarının insan göğüs kanseri hücreleri (MCF-7) ve insan idrar kesesi kanserli hücreleri (T-24) üzerinde hücre çoğalmasını engellediğini göstermektedir. Zeytin yaprağı ekstraları içeriğindeki en baskın bileşik oleuropeindir, aynı zamanda fenol ve flavanoidler de bulunmaktadır. Tüm bu bileşikler yüksek antioksidant yeteneği olan ve entodel hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını ve kanseri engelleyen fitokimyasallardır (Vlassios ve ark. 2009). Zeytin yaprağı ekstresinin askorbik asit değerli antioksidan kapasitesi 68.93 mg/g olarak hesaplanmıştır. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerle yapılan çalışmalarda zeytin yaprağı ekstralarının oldukça düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve mide, bağırsak ve akciğer kanseri gibi kanserli hücre tipleri üzerinde %70-81 oranında büyümeyi engellediği bildirilmiştir (Ko ve ark. 2010). Zeytin yaprağında (*Olea europaea* L) bulunan oleuropein maddesinin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti inflamatuvar, antitümoral ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu (Ko ve ark. 2009, Micol ve ark. 2005, Sudjana ve ark. 2009, Hamdi ve Castellon 2005), kanserli hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasını engellediği (Abaza ve ark. 2007, Han ve ark. 2009, Rigacci ve ark. 2009) araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı pek çok ülkede gıda desteği olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Rigacci ve ark. 2009).

1.5.2.1 Oleuropein

Oleuropein zeytin ağacı ve yapraklarında bulunan kimyasal bir bileşiktir. İlk olarak 1908 senesinde Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilmiştir. Meyvenin büyümesi sırasında meydana gelen kimyasal ve enzim aktivitelerini sonucunda bitkide oleuropein sentezi artar ve ilerleyen süreçte oleuropeinin indirgenmesiyle birlikte yapısındaki hidroksitrizoller açığa çıkarak bitkideki hidroksitrizol miktarı artar. Oleuropein 3 farklı alt birim içeren bir moleküler yapıya sahiptir. 4-(2-hydroxyethyl) benzene-1,2-diol olarak adlandırılan ve hidroksitrizol olarak bilinen bir polifenol, elonik asit ve glukoz molekülünden oluşur. Hidroksitrizol antioksidan yeteneği iyi bilinen bir fitokimyasaldır. Gallik asitten sonra en etkili antioksidan olarak görülür (Chondrogianni ve ark. 2010, Omar 2010).



Şekil 1.6. Oleuropeinin moleküler yapısı

Bir polifenol çeşidi olan oleuropein sağlık için pek çok yarara sahiptir. Özellikle Akdeniz diyetinin önemli bir parçası olan oleuropein bileşiği antimikrobiyal, antitümöral, antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Reaktif oksijen türlerini temizleme yeteneğinden dolayı dikkat çeker ve böbrek kanseri, göğüs kanseri (Hamdi ve Calleston 2005, Menendez ve ark. 2007, Goulas ve ark. 2009, Han ve ark. 2009, Sirianni ve ark. 2010), malin melanoma (Hamdi ve Calleston, 2005), mesane kanseri (Han ve ark. 2009) ve lösemi hücreleri (Fabiani ve ark.,

2006, 2008) gibi pek çok tümör hücresi üzerinde yapılan çalışmalarda hücre çoğalmasını engellediği gözlenmiştir. Oleuropein ve türevlerinin antioksidan aktivitesi sahip oldukları fonksiyonel gruplarına göre değişir (Babich ve Visioli 2002).

Yapılan araştırmalar oleuropeinin çeşitli faydalarını gözler önüne sermiştir. Bulotta ve ark. 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada MCF-7 ve T-47D hücreleri üzerinde hücre büyümesi, canlılığı ve anti-tümöral aktivite üzerine etkilerini göstermiştir. Oleuropeinin Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda belirleyici olan A β peptid oluşumuna kovalent olmayan bir bağ ile bağlanarak nörokoruyucu etkiye sahip olduğu ve yine kalp hastalıklarını önlemede etki olduğu bulgulanmıştır (Omar 2010). MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsünde bulunan G0/G1 fazlarına etki ederek hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (Boullagui 2011). Damar düz kas hücreleri ile yapılan bir başka çalışma oleuropeinin hücre çoğalmasını engellediğini göstermiştir. ERK1/2 tarafından düzenlenen hücre döngüsünü bloke ederek hücre çoğalmasını engelleyen oleuropein kalp rahatsızlıklarına karşı kişiyi koruma yeteneğindedir (Abe ve ark. 2011).

1.6. Metallerin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Metal ve metal komplekslerinin ilaç olarak kullanımı ve uygulamaları klinik ve ticari açıdan artan öneme sahiptir (Farrel 2004). Bütün metaller reaktif oksijen türleri üretir ve bu özellik hepsinin hem karsinojenik hem de kanseri tedavi edebilme yeteneğini işaret eder. Süperoksit dismutaz inhibisyonunun kanser hücreleri üzerinde seçici ölümcül etkiye sahip olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sebeple reaktif oksijen türleri bir yandan kanser oluşumuna sebep olurken diğer yandan tümörlerin tedavisi için bir çözümdür. İlaç olarak kullanımı tartışmasız bilinen metal bileşikleri antimon (anti-protozoal), bizmut (anti-ülser), altın (anti-artritic), demir (anti-malaryal), gümüş (anti-mikrobiyal) ve platin (anti-kanser) şeklinde sıralanabilir. Anti tümöral aktivitelerini değerlendirmek amacıyla pek çok metal kompleksi ve türevleri araştırılmaktadır (Desoize 2002).

Pek çok tümör türünün ölümcül etkisi yüksek aktif etkiye sahip metal içeren ilaçlarla azaltılabilir. Bu durum özellikler platin içeren ilaçlarla yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Malignansiye karşı bilinen en etkin farmasötik platin ve platin kompleksleridir. Roberts 1960’larda Pt komplekslerinin hücre bölünmesi üzerindeki etkisini kanıtlamış ve Rosenberg ile arkadaşları 1965 yılında bu durumun kanser tedavisindeki önemi gösteren çalışmalarını yayınlamışlardır. Bu tarihten itibaren platin içeren bileşikler antikanser özelliklerinden dolayı aktif çalışılan bir alan haline gelmiştir. Sisplatin, karboplatin gibi platin türevleri testis, ovaryum, baş ve boyun, mesane ve akciğer kanseri gibi kanser türlerinin kemoterapi tedavisinde kullanılmaktadır. Sisplatin kanser tedavisinde kullanılan, bilinen ilk platin tabanlı ilaçtır ve aynı sınıfa sahip anti-tümöral ajanlara model olmuştur (Michalke 2010).

Günümüzde altın kompleksleri platin ile olan benzerliklerinden dolayı sisplatin tedavisine alternatif olarak görülmektedir. Yapısal olarak altın (III) kompleksleri sisplatin gibi platin (II) türevleri ile aynı geometriye sahiptir. Bununla birlikte altın (III) komplekslerinin sisplatin ile benzer moleküler hedefe sahip olabilecekleri düşünülmektedir (Milacic ve Dou 2009).

Altın ve altın türevleri pek çok hastalığı tedavi etmek amacıyla asırlardır kullanılmaktadır. Altının ilaç olarak kullanımı ilkçağlara kadar dayanır. Arap ve Çin hekimleri altın solüsyonlarını pek çok hastalığı iyi etmek amacıyla kullanmışlardır. İlerleyen yıllarda Koch’un $Au(CN)_2^-$ ’nin bakterositatik etkisini keşfetmesiyle birlikte altın tiyolları rematoid artrit tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. Daha sonra altın türevleri anti-tümör ve anti- HIV etkilerine karşın araştırılmışlardır (Tiekink 2002). Ganolin ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında pek çok tümör hücresinde ilaç direncini sağlamak amacıyla salgılanan TrxR proteinini altın kompleksleriyle inhibe etmişlerdir. Altın (III) komplekslerinin kanserli dokudaki tümör proteozomlarını hedef aldığı ve protozom inhibisyonunu sağlayarak apoptozu uyardığı göğüs kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada gösterilmiştir (Milacic ve Dou 2009). Altın (III) kompleksleriyle yapılan başka bir çalışmada altın kompleksleri nazofarınjel karsinoma hücreleri (SUNE-1, CNE-1, CNE-2, C666-1), promiyelositik lösemi (HL-60), hepatosellüler karsinoma (HepG2), servikal epitelial karsinoma

(HeLa), oral epidermoid karsinoma (KB-3-1 ve KB-V1) hücreleri üzerinde denenerek sitotoksik ve antikanser etkileri gösterilmiştir (Sun ve Che 2009). Altın (I) komplekslerinden elde edilen sentezler MCF-7 (insan göğüs kanseri), MDA-MB-231 (insan göğüs kanseri), MM96-L (Melanoma), C180-13S (Sisplatine dirençli ovaryum kanseri) ve sağlıklı hücre hattı olarak da NFF (Neonatal gufle fibroblast) hücreleri üzerinde denenmiş ve kanserli hücre hatlarında normal hücre hatlarına göre daha sitotoksik olduğu bulgulanmıştır (Helay ve ark. 2010).

Yeni metal komplekslerinden antikanser ilaçların üretilmesi ümit verici ancak zor bir süreçtir. Çünkü metal iyonları vücut içerisinde beklenmeyen etkiler yaratabilir. Kemoterapinin genel amacı kanserli hücreleri öldürmektir ancak metaller aynı zamanda sağlıklı hücrelerin hücre bölünmesini de etkiler ve serbest radikal üretmelerinden kaynaklı olarak sağlıklı hücrelerde karsinojenik etki gösterebilirler. Tüm dünyada bilim adamları doğal olarak elde edilen flavanoid benzeri bileşiklerin faydalarına dikkat çekmektedir. Bununla birlikte metal iyon kompleksleriyle bir araya geldiklerinde daha etkili olabilecekleri fikri bilim adamlarına yeni bir araştırma sahası sunmaktadır. Flavanoidler etkin metal şelatörleridir ve serbest radikal oluşumunu başlatma sürecinde anahtar rol oynarlar. Metal şelasyonu flavanoidlerin antioksidan aktivasyonunun farklı bir mekanizması olarak düşünülebilir. Flavanoidler metal iyonlarını kolayca şelate ederek daha kompleks bileşikler oluştururlar. Yapılan araştırmalar flavanoid eklenmiş metal komplekslerinin tamamen inorganik moleküllerden oluşan metal komplekslerine göre sağlıklı hücre hatlarında daha az toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Grazul ve Budzisz 2009).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan kimyasal malzemeler

Nutrient Mikture F-12 (HAMS, Sigma), RPMI-1640 medyum (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Biological Industries), Tripsin-EDTA solution (Biological Industries), %0,5 lik Triton X-100 (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), %3,7 Formaldehit (Merck), Dimethyl Sulfoxide (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Carlo Erba), Formaldehit (Merck), CaCl (Merck), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), EDTA (Merck), MTT (Biological Industries), DAPI (Sigma), Sıvı Azot, Endotel Cell Basal medium-2(EMB-2) (Cambrex Bio Sciences), matrijel (BD Biosciences), Etanol (Sigma), heparin (Sigma), Endotelial Cell Growth Supplement (Sigma), Metanol (Sigma).

2.1.2 Kullanılan sarf malzemeler

25 cm²'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP), cam mezürler, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerinde), enjektörler 250, 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeleri, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler. Steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril 1lt'lik ve tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı.

2.1.3 Kullanılan aletler

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (eppendorf), dağıtıcı pipet (eppendorf).

2.1.4 Kullanılan hücreler

2.1.4.1 A549 hücre kültürü

A549 (insan akciğer adenokarsinom epitel) hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum, , Penicilin-Streptomycin ve %7,5 NaHCO₃ içeren RPMI-1640 besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95'lik hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37 °C'deki içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

2.1.4.2 HUVEC hücre kültürü

HUVEC (İnsan göbek kordonu endotel hücreleri) hücreleri %20 Fetal Bovine Serum, penisilin-streptomisin, sodyum bikarbonat, heparin, ECGS içeren Nutrient Mixture Ham's F-12 K medyumla 37°C'de % 5 CO₂ içeren içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

2.1.4.3 Test maddelerinin ekstraksiyonu

Öğütülmüş zeytin yaprağı ve üzüm çekirdeği materyallerinin herbiri, ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Ticari olarak satın alınan test maddeleri metanol ekstraksiyonu ile hazırlandı. 25'er gr öğütülmüş üzüm çekirdeği ve zeytin yaprağı tartılarak 250mL %70'lik metanol ile birlikte ayrı ayrı oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde bir ay boyunca bekletilmiş bu sürecin sonunda evaporatör yardımıyla metanol uzaklaştırılmıştır. Elde edilen özüt bir süre kurumaya bırakılmış ve daha sonra kullanılmıştır. Ekstraksiyonlar oda sıcaklığında ışık almayacak ve nem kapmayacak kuru bir ortamda saklanmıştır.

Elde edilen ürün uygun çözücü ile dilüe edilerek birlikte çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Birlikte çöktürme yönteminde, birden fazla bileşenin ayrılması ihtimaline karşı çökelme pH'sı denetlenerek seçimlilik sağlanmıştır. Çalışmalarımızda taşıyıcı amaçla, sodyum tetrakloroaurat dihidrat kullanılmıştır. Taşıyıcının adsorplayıcı özelliğinden faydalanılarak eser metal iyonlarının hem ortam bileşenlerinden ayrılması hem de deriştirilmesi sağlanmıştır. Çöktürme işleminden sonra süzme işlemi ile çökelek çözeltiden ayrılmış, elde edilen

kompleks bileşikler kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi uygulanmasında, kolonlarda dolgu maddesi olarak sefadex ve CH₃OH:CHCl₃ yürütücü sistemi kullanılmıştır. Reaksiyonlar İTK yöntemi ile izlenmiştir. Ara ürünlerin ve sonuç ürünlerinin yapı aydınlatma çalışmalarında bileşiklerin IR, ¹H NMR, Kütle Spektroskopisi ve elementel analiz sonuçları kullanılmıştır.

Resveratrol Au(III) kompleksi:

Verim: %45; E.N.: > 300 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2943 (alifatik C-H asimetrik gerilim bandı), 1460 (C=C gerilim bandı), 812, 745 (C-H düzlem dışı eğilme bandları), 710 (M-O gerilim bandı), 644 (M-Cl gerilim bandı).

¹H-NMR (400 MHz) (DMSO-d₆) δ (ppm): 5.00-5.20 (2H, dd), 7.0-7.8 (7H, m), 7.8-8.0 (3H, bs).

MS(EI) (m/z): 228.25 (M⁺).

Oleuropein Au(III) kompleksi:

Verim: %45; E.N.: > 300 °C

IR (KBr) $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 2955 (alifatik C-H asimetrik gerilim bandı), 1470 (C=C gerilim bandı), 836, 779 (C-H düzlem dışı eğilme bandları), 694 (M-O gerilim bandı), 657 (M-Cl gerilim bandı).

¹H-NMR (400 MHz) (DMSO-d₆) δ (ppm): 1.8 (3H, d), 2.7-2.8 (4H, m), 3.1-3.7 (8, 10H, m), 4.4-4.5 (3H, m), 5.625 (33, 1H, q), 6.5-6.6 (4H, m), 7.825 (1H,bs)

MS(EI) (m/z): 540.514 (M⁺).

2.1.4.4 Test maddelerinin dozlarının hazırlanması

Firmadan hazır olarak alınan üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstratları DMSO da çözülerek 500µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml, 2500 µg/ml ve 3000 µg/ml 'lik dozlar hazırlanmıştır. DMSO miktarının final konsantrasyonu %0,3'ü aşmamıştır. Test maddeleri, DMSO içinde çözüldüğü için; negatif kontrol

olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. Öncelikli olarak 10ml'lik ana sok hazırlanmış ve dozlar bu stoktan her deney için dilüe edilmiştir. Ana stok (+4) °C de saklanmıştır.

Zeytin yaprağından elde edilen (*Olea Europaea L.*) ekstreleri etanolde çözülerek 500µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml ve 2000 µg/ml 'lik dozlar hazırlanmıştır. Etanol oranı final konsantrasyonun %2'ini aşmamıştır. Test maddeleri etanol içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak da çözücü madde olan etanol kullanılmıştır. Öncelikli olarak 10ml'lik ana sok hazırlanmış ve dozlar bu stoktan her deney için dilüe edilmiştir. Ana stok (+4)°C de saklanmıştır.

Altın eklenmiş formdaki üzüm çekirdeği ve zeytin yaprağı ekstreleri DMSO'da çözülmüştür. DMSO miktarı final konsantrasyonunda %0,3'ü aşmamıştır. Her iki madde içinde ayrı ayrı 100µM, 200µM ve 300µM'lık dozlar her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

2.1.4.5 Kullanılan araç, gerecin hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 120 °C, 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, bazı cam ve metal malzemeler de alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C'de 2 saat, süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 mm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Hücre kültürü

A549 ve HUVEC hücreleri uygun besiyerinde ve 25 cm²'lik flasklarda yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

2.2.1.1 Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (HUVEC için 8000, A549 için 5000) hücre olacak şekilde A549 hücreleri için %10 FBS, HUVEC hücreleri için %20 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C’de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 ve 48 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

2.2.1.2 MTT ölçümü

Test maddeleri ile 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml⁻¹ MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 8 paralel olarak 3 bağımsız deneyde tekrar edilmiştir (Mosmann, 1983).

2.2.1.3 Matrijel tüp ağı oluşturma deneyi

Matrijel tüp oluşturma deneyi Quchi ve arkadaşlarının (2004) tanımladığı şekilde yapılmıştır. Bu deney için HUVEC hücreleri 6 saat boyunca %2 oranında

FBS içeren EBM-2 medyum içerisinde serum açlığına maruz bırakılmış, daha sonra hücreler kaldırılıp 4×10^4 yoğunluğunda matrijelin üzerine ekilerek test maddelerinin belirlenen konsantrasyonları uygulanmıştır. 12 saatin sonunda hücreler inverted mikroskop yardımıyla (Olympus IX70) 10X'lik büyütmede incelenerek DP70 kamera ile fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.2 İstatiksel değerlendirme

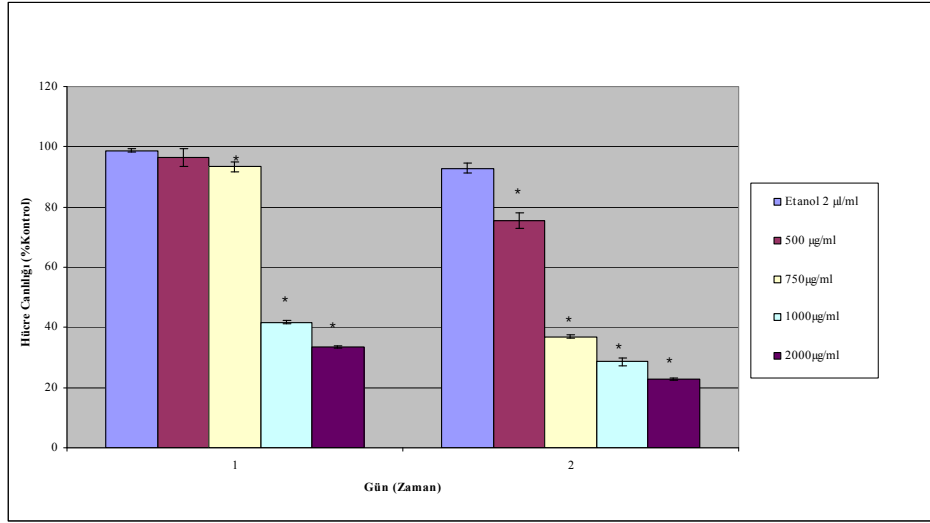
MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Zeytin Yaprağı Ekstresinin Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi

3.1.1 Zeytin yaprağı ekstresinin A549 hücreleri üzerindeki etkisi

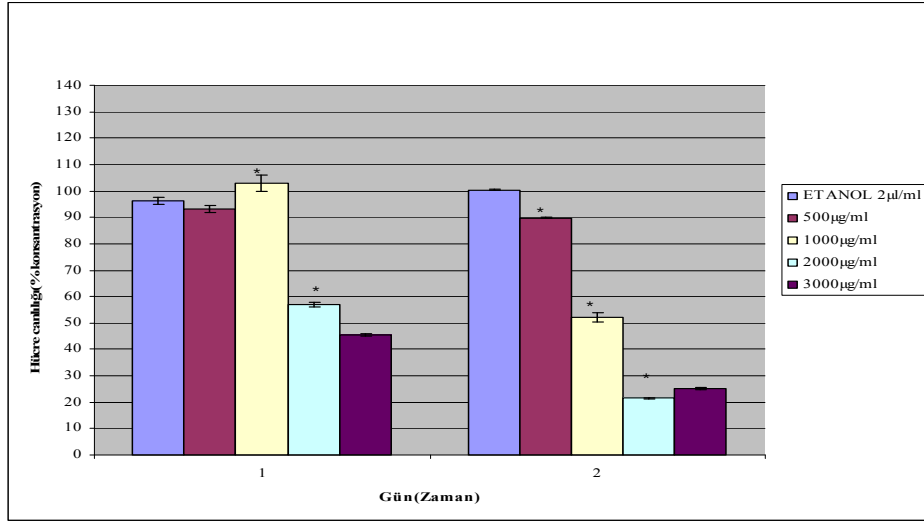
Zeytin (*Olea Europaea*) yaprağı ekstraktının uygulandığı A549 hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonucunda 24 saat ve 48 saat lik uygulamaların ardından zeytin yaprağı ekstraktının hücreler üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1). En düşük doz olan 500µg/ml’lik konsantrasyonda 24 saat uygulamanın ardından hücre sayısında % 4 oranında bir azalma gözlenirken 48 saatin ardından aynı konsantrasyonun uygulandığı hücrelerin % 25 oranında sayıca azaldığı gözlenmiştir. İkinci konsantrasyon olan 750 µg/ml’lik konsantrasyonda ise 24 saatin ardından hücre canlılığındaki azalma % 7 oranında azalma meydana gelir iken 48 saatin ardından % 64 oranında bir azalma gözlenmiş bunu takip eden 1000 µg/ml ve 2000 µg/ml’lik konsantrasyonlarda da hücre canlılığındaki azalma artarak devam etmiştir. 1000 µg/ml’lik konsantrasyon 24 saatin sonunda % 59, 48 saatin sonunda % 78 oranında bir azalma olmuştur. 2000 µg/ml’lik konsantrasyonda ise 24 saatin sonunda % 67, 48 saatin sonunda % 78 oranında bir azalma mevcuttur.



Şekil 3.1 A549 hücreleri üzerinde Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.1.2 Zeytin yaprağı ekstresinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi

Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının uygulandığı HUVEC hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonucunda 24 saat ve 48 saat lik uygulamaların ardından zeytin yaprağı ekstraktının hücreler üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2). En düşük doz olan 500µg/ml’lik dozda 24 saat uygulamanın ardından hücre sayısında % 7 civarında azalmaya sebep olurken 48 saatlik uygulamanın ardından bu azalma % 11’a ulaşmıştır. 1000µg/ml’lik doz 24 saatin sonunda hücre sayısını % 2 civarında arttırırken 48 saatin sonunda hücre sayısında % 48 civarında bir azalma meydana getirmiştir. 2000 µg/ml’lik doz 24 saatin sonunda % 44 civarında hücre sayısını azaltırken 48 saatin sonunda % 79 civarında hücreleri öldürmüştür. Son doz olan 3000 µg/ml’lik doz ise 24 saatin sonunda hücre sayısını % 55 civarında 48 saatin sonunda ise % 75 civarında azaltmıştır.

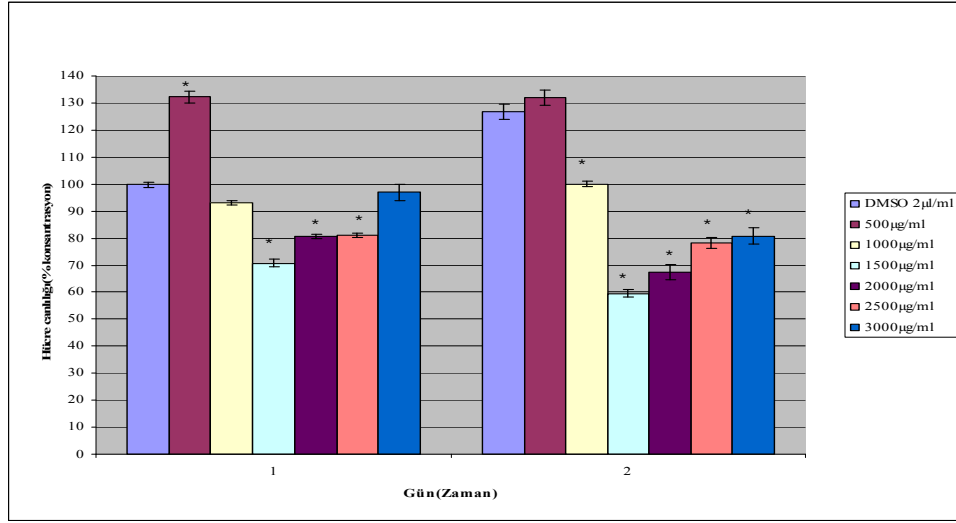


Şekil 3.2 HUVEC hücreleri üzerinde Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının zamana ve doza bağlı sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.2 Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Kansersiz ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi

3.2.1 Üzüm çekirdeği ekstresinin A549 hücreleri üzerindeki etkisi

Üzüm (*Vitis vinifera sp*) çekirdeği ekstraktının uygulandığı A549 hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonucunda 24 ve 48 saatlik uygulamaların ardından üzüm çekirdeği ekstresinin A549 hücrelerine belirgin bir sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.3). En düşük konsantrasyon olan 500 µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığında % 30 oranında artma görülmüş bu oran 48 saatlik uygulamanın ardından da yine kontrol grubuna göre % 10 oranında hücre sayısı artmıştır.. 1000 µg/ml’lik konsantrasyon 24 saatin ardından % 7 oranında bir azalma gözlenirken 48 saatin ardından hücre canlılığında kontrole göre bir artış meydana gelmemiştir.



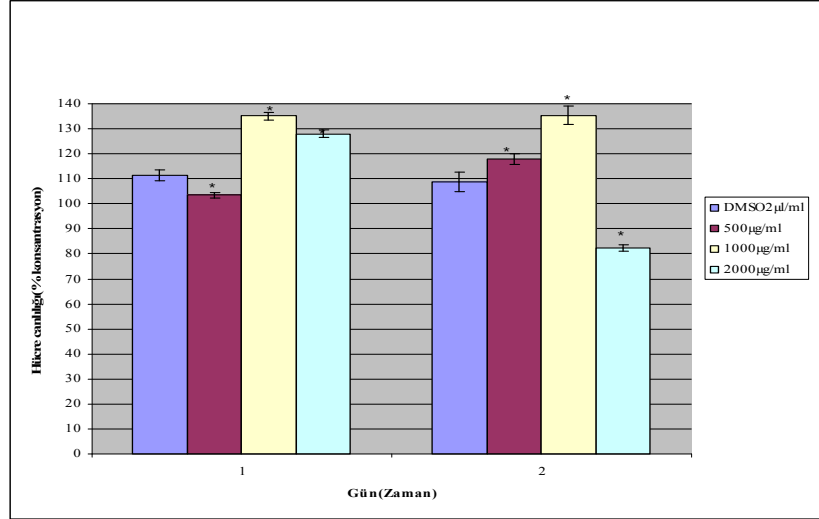
Şekil 3.3 Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdek ekstresinin A549 hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

1500 µg/ml’lik konsantrasyon 24 saatlik uygulamada % 30 oranında hücre canlılığını azaltmış 48 saatin sonunda bu oran ancak %41’e ulaşabilmiştir. 2000 µg/ml ve 2500 µg/ml’lik konsantrasyonların etkileri 24 saatin sonunda birbirlerinin aynırken (% 20), 48 saatlik uygulamadan sonra 2000 µg/ml’lik konsantrasyon % 33 oranına ulaşan hücre canlılığındaki azalma 2500 µg/ml’lik konsantrasyonda % 22 oranındadır. 3000 µg/ml’lik konsantrasyonda ise 24 saat sonra hücre sayısında kontrole göre % 4 oranında bir azalma varken 48 saatin sonunda kontrole göre azalma % 20 oranına ulaşabilmiştir.

3.2.2 Üzüm çekirdeği ekstresinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi

Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstraktının uygulandığı HUVEC hücreleri üzerinde yapılan MTT testi sonucunda 24 ve 48 saatlik uygulamaların ardından üzüm çekirdeği ekstresinin HUVEC hücrelerine belirgin bir sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.4). En düşük doz olan 500µg/ml’lik konsantrasyonda 24 saat uygulamanın ardından hücre sayısında % 3 civarında bir artmaya sebep olurken 48 saatlik uygulamanın ardından hücre canlılığı % 10 civarında artmıştır. Bunu takip eden 1000µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saat uygulaması hücre canlılığını % 35 civarında arttırmış bu oran 48 saat uygulamasında değişmemiş sabit kalmıştır. Son konsantrasyon olan

2000µg/ml’lik konsantrasyonun 24 saat uygulamasının sonucunda hücre canlılığı % 28 civarında artmış, aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının sonucunda hücre canlılığı % 18 civarında azalmıştır.



Şekil 3.4 Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdek ekstresinin HUVEC hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı sitotoksik etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir

3.3 Zeytin Yaprağı ve Üzüm Çekirdeği Ekstrelerinin Kombine Kullanımlarının Kanserli ve Sağlıklı Hücre Hatlarındaki Etkileri

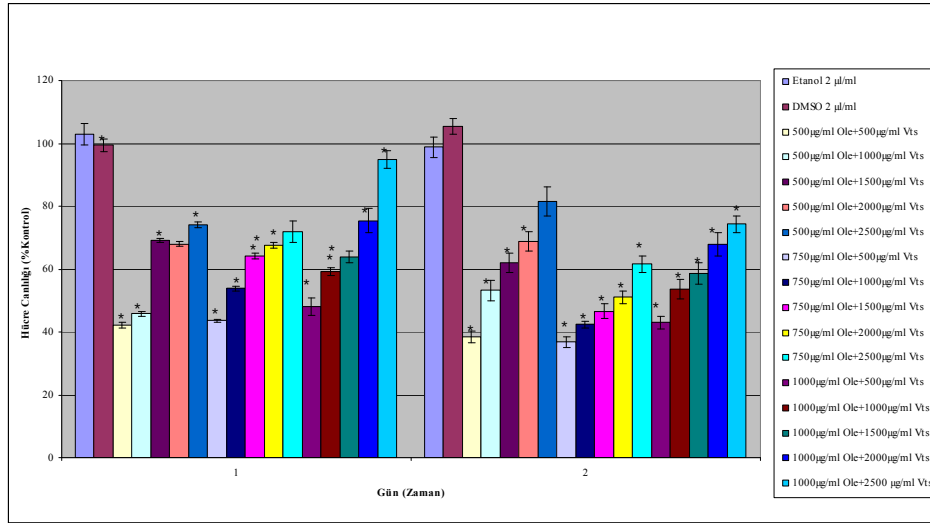
3.3.1 Zeytin yaprağı ve üzüm çekirdeği ekstrelerinin kombine olarak kullanıldıklarında A549 hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi

Zeytin ve üzümünden elde edilen metanol ekstraksiyonlarının birlikte uygulandığında A549 hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla her iki maddeden belirli dozlar seçilerek kombinasyon uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan kombinasyonlarda üzümün artan dozlarında hücre canlılığının da arttığı ancak üzümün düşük olduğu dozlarda hücre canlılığında azalma olduğunu bu azalmanın zeytin yaprağı ekstresinin sitotoksik etkisinden kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 3.5).

Her iki ekstraksiyondan da 500 µg/ml’lik konsantrasyonlar bir arada uygulandığında 24 saatin sonunda % 58 civarında hücre canlılığı azalır iken 48 saatin sonunda kontrol grubuna göre % 62 civarında bir azalma meydana gelmiştir. 500 µg/ml’lik konsantrasyon zeytin yaprağı ekstraktı için sabit tutularak

üzümün dozu arttırıldığında hücre canlılığında 1000 µg/ml'lik üzüm çekirdeğiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 55, 48 saatin sonunda % 47 , 1500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 31, 48 saatin sonunda % 38, 2000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 32, 48 saatin sonunda % 32 civarında, 2500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 26, 48 saatin sonunda % 19 civarında bir azalma meydana gelmiştir.

750 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile üzüm çekirdeği ekstresinin aynı konsantrasyonları kombine edildiğinde 500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 57 civarında, 48 saatlik uygulamanın sonunda % 64 civarında hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. 1000 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 26 civarında 48 saatlik uygulamadan sonra %58 civarında azalma gözlenmiştir. 1500 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 47, 48 saatlik uygulamanın ardından hücre canlılığında % 58 civarında azalma gözlenmiştir. 2000 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 36 civarında , 48 saatlik uygulamanın ardından % 54 civarında azalma gözlenmiştir. 2500 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında %33 civarında, 48 saatlik uygulamanın ardından % 49 civarında azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.5 Zeytin (*Olea Europa*) yaprağı ve Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstraktlarının bir arada uygulandıklarında A549 hücreleri üzerindeki etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

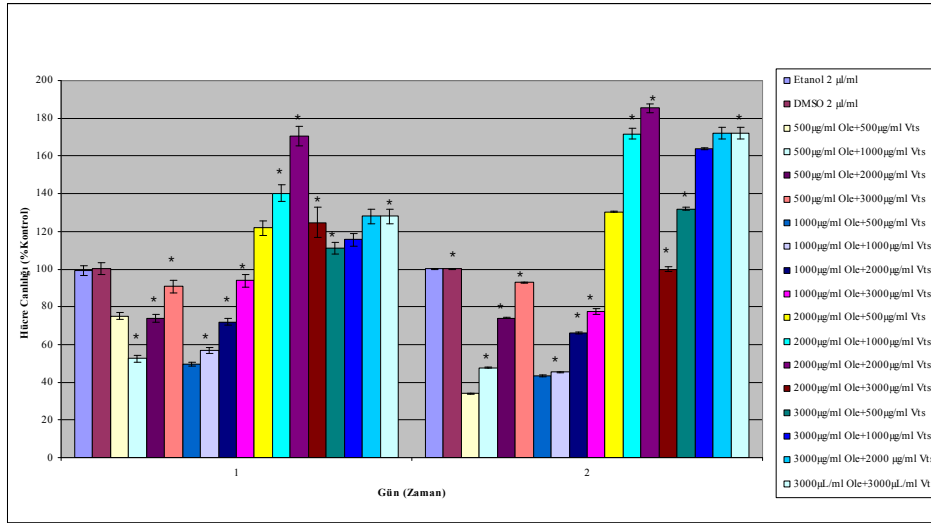
1000 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile üzüm çekirdeği ekstresinin aynı dozları kombine edildiğinde 500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan kombinasyonda 24 saatin sonunda % 29 civarında, 48 saatlik uygulamanın ardından % 39 civarında hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. 750 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın ardından hücre canlılığında % 52 oranında azalma gözlenirken aynı dozun 48 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı kontrol grubuna göre % 57 oranında azalmıştır. 1000 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 41, 48 saatlik uygulamanın ardından %47 civarında azalma gözlenmiştir. 1500 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 37 civarında, 48 saatlik uygulamanın ardından %42 civarında azalma gözlenmiştir. 2000 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 25 civarında, 48 saatlik uygulamadan sonra % 33 civarında azalma gözlenmiştir. 2500 µg/ml' lik üzüm çekirdeği ekstresiyle yapılan 24 saatlik uygulamanın sonrasında hücre canlılığında % 6, 48 saatlik uygulamadan sonra % 26 civarında azalma gözlenmiştir. Deneyler 3 kere tekrar edilmiştir ve sonuçlar birbirini destekler niteliktedir. Deney sonuçları en etkin

dozun 500 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile 500 µg/ml üzüm çekirdeği ekstresinin kombine edildiği konsantrasyon olduğunu göstermiştir. 750 µg/ml zeytin yaprağı ekstresi ile 500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresinin bir arada uygulandığı konsantrasyon da hücre sayısına oldukça etkilidir.

3.3.2 Zeytin yaprağı ve üzüm çekirdeği ekstrelerinin kombine olarak kullanıldıklarında HUVEC hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi

Zeytin ve üzümünden elde edilen metanol ekstraksiyonlarının A549 hücreleri üzerinde bir aradaki etkilerini değerlendirmek amacıyla her iki maddeden belirli konsantrasyonlar seçilerek kombinasyon uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan kombinasyonlarda üzümün artan konsantrasyonlarında hücre canlılığının da arttığı ancak üzümün düşük olduğu konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma olduğunu bu azalmanın zeytin yaprağı ekstresinin sitotoksik etkisinden kaynaklandığını göstermiştir (Şekil 3.6).

Her iki ekstraksiyondan da 500 µg/ml 'lik dozlar bir arada uygulandığında hücre canlılığında 24 saatin sonunda kontrol grubuna göre % 25 civarında azaldığı 48 saatlik uygulamanın ardından hücre canlılığının kontrole göre % 67 oranında azaldığı gözlenmiştir. 500 µg/ml 'lik konsantrasyon sabit tutularak zümün artan konsantrasyonları sırasıyla denenmiştir. 1000 µg/ml 'lik konsantrasyonla yapılan kombinasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı kontrol grubuna göre % 48 civarında azalırken 48 saatlik uygulamanın ardından hücre canlılığında % 53 civarında azalma gözlenmiştir. 2000 µg/ml 'lik dozla yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığında % 27 civarında azalma gözlenirken 48 saatin sonunda hücre canlılığındaki azalma yine % 27 civarında sabit kalmıştır. 3000 µg/ml 'lik konsantrasyonla yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulaması hücre canlılığı üzerinde % 10 civarında azalmaya sebep olurken 48 saatlik uygulamanın hücre canlılığına etkisi % 8 civarındadır.



Şekil 3.6 Zeytin (*Olea Europa*) yaprağı ve Üzüm (*Vitis vinifera* sp.) çekirdeği ekstrelerinin bir arada uygulandıklarında HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

1000 µg/ml 'lik zeytin yaprağı ekstresi ile 500µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi kombine edilmiş ve 24 saatlik uygulamanın ardında hücre canlılığında % 51 civarında azalma, 48 saatlik uygulamanın ardında ise % 57 civarında azalma gözlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraksiyonunun konsantrasyonu 1000 µg/ml' de sabit tutulurak üzüm çekirdeği ekstresinin konsantrasyonu artırılmıştır. 1000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 44 civarında azaltırken aynı kombinasyonun 48 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 55 civarında düşürmüştür. 2000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan kombinasyon hücrelere 24 saat uygulandığında hücre canlılığı % 28 civarında azalırken aynı kombinasyonun 48 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 34 civarında azaltmıştır. 3000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 7 civarında azaltırken aynı kombinasyonun 48 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 23 civarında azaltmıştır.

2000 µg/ml 'lik zeytin yaprağı ekstresi ile yapılan kombinasyonlar ve bunu takip eden daha yüksek konsantrasyonlardaki kombinasyonlarda ise hücre canlılığında azalma değil artış meydana gelmeye başlamıştır. En düşük konsantrasyon olan 500µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulamanın ardında hücre canlılığında % 21 oranında

artış gözlenirken aynı konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasında hücre canlılığı % 30 oranında artmıştır. 1000 µg/ml 'lik üzüm çekirdeği konsantrasyonu ile yapılan kombinasyonda hücre canlılığı 24 saatin sonunda % 40 oranında artarken aynı konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı % 71 oranında artmıştır. 2000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan uygulamada hücre canlılığı 24 saatin sonunda % 70, 48 saatlik uygulama sonrasında % 85 oranında artmıştır. 3000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan uygulamanın ardından hücre canlılığı 24 saatin sonunda % 24 artmış, 48 saatlik uygulamanın ardından % 1 oranında azalmıştır.

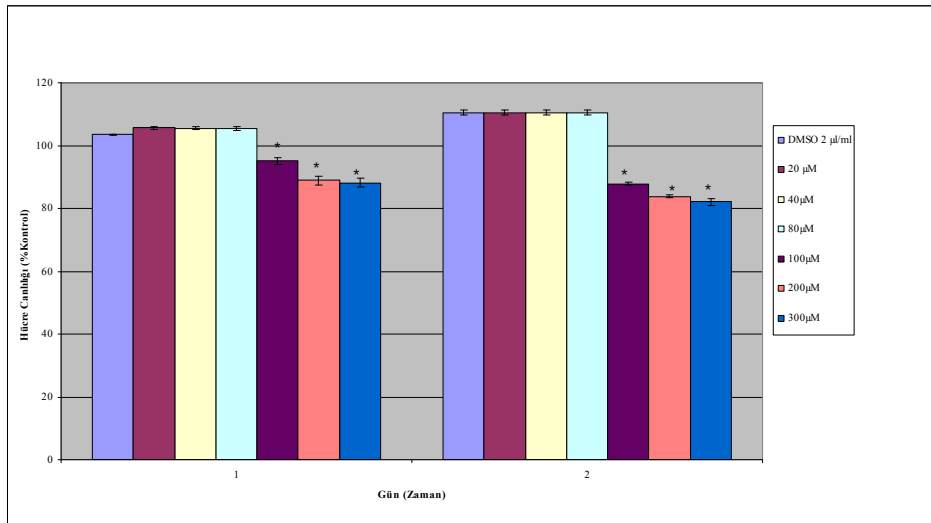
3000 µg/ml'lik zeytin yaprağı ekstresi ile yapılan kombinasyonların sonuçları ise şöyledir; 500 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ile yapılan kombinasyonun 24 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı % 11 oranında artmış, 48 saatlik uygulamanın ardından % 31 oranında artış gözlenmiştir. 1000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ile yapılan uygulamanın ardından hücre canlılığı 24 saatin sonunda % 15, 48 saatin sonunda % 64 oranında artmıştır. Son olarak 2000 µg/ml ve 3000 µg/ml'lik üzüm çekirdeği ekstresi ile yapılan kombinasyonlar birbirinin aynı sonuçları vermiş her iki kombinasyonun da 24 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı % 27, 48 saatlik uygulamasının ardından ise % 72 oranında artmıştır.

3.4 Sodyum tetrakloroaurat (NaAuCl₄) Kullanılarak, Au(III) Kompleksi Halinde Zeytin Yaprığı Ekstresinden Çöktürülen Oleuropein ve Üzüm Çekirdeği Ekstresinden Çöktürülen Resveratrol Bileşiklerinin Kanseri ve Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Etkileri

3.4.1 Zeytin yaprağı ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki etkileri

Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlara Au kompleksleri eklenmiş ve A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri zaman ve konsantrasyona bağlı olarak değerlendirilmiştir. MTT testi sonucunda yeni oluşturulan bileşiğin belirgin bir sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.7). En düşük konsantrasyon olan 20µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasında hücre canlılığı % 5

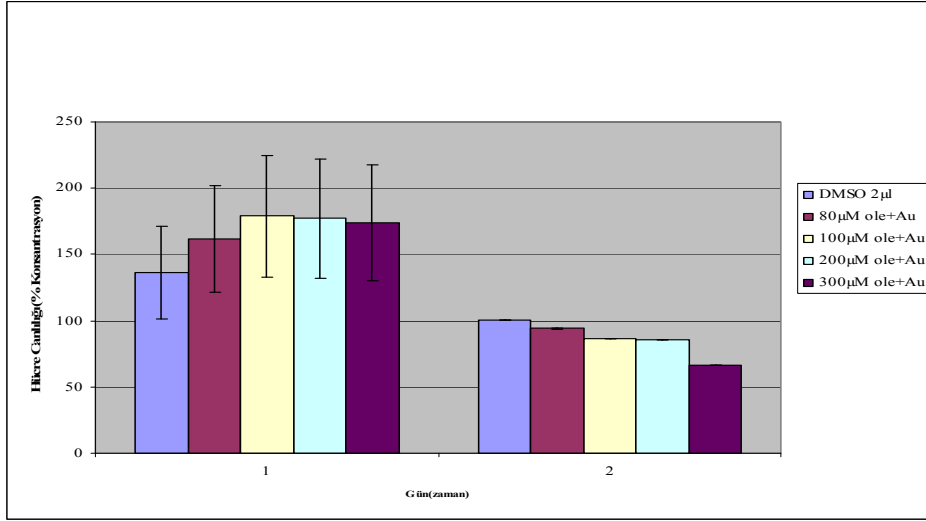
oranında artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı kontrol grubuna göre değişmemiştir. 40 μM ve 80 μM 'lık konsantrasyonlarda da 24 saat ve 48 saat uygulamalarında benzer bir etki göstermişlerdir. 100 μM 'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 5 oranında azalırken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasında hücre canlılığı % 13 civarında azalma göstermiştir. 200 μM 'lık konsantrasyonun 24 saat uygulaması ise hücre canlılığını %12, 48 saat uygulaması % 17 azaltmıştır. Son doz olan 300 μM 'lık konsantrasyonda 24 saatin sonunda hücrelerin % 12'si canlılığını yitirirken 48 saat sonra bu oran % 18'e ulaşmıştır.



Şekil 3.7 Zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ekstrelerinden Au (III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin A549 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4.2 Zeytin yaprağı ekstrelerinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri

Zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlara Au kompleksleri eklenmiş ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değerlendirilmiştir. MTT testi sonucunda yeni oluşturulan bileşiğin belirgin bir sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.8).



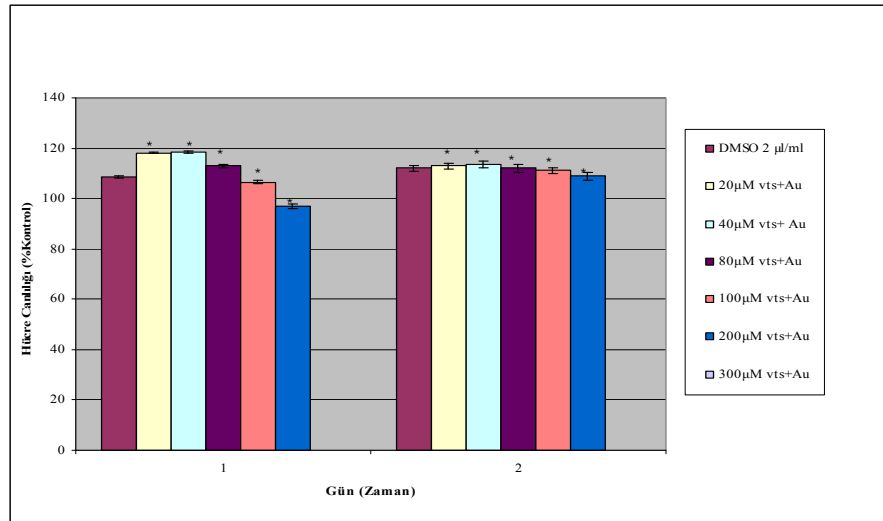
Şekil 3.8 Zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ekstresinden Au (III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

En düşük konsantrasyon olan 80µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının sonucunda hücre canlılığı % 30 artarken aynı konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı % 6 azalmıştır. 100 µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 42 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 14 azalmıştır. 200 µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 41 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 15 azalmıştır. Son olarak 300 µM'lık'lik konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 38 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 34 azalmıştır.

3.4.3 Üzüm çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki etkileri

Üzüm çekirdeğinde elde edilen ekstraksiyonlara Au kompleksi eklenerek elde edilen yeni bileşik A549 hücreleri üzerine denemiş ve yapılan MTT testleri sonucunda belirgin bir sitotoksik etki saptanmamıştır (Şekil 3.9). En düşük konsantrasyon olan 20µM'lık dozun 24 saat uygulamasında hücre canlılığı % 8

oranında artarken aynı dozun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı kontrol grubuna göre % 10 artış göstermiştir. 40 μM 'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 12, 48 saat uygulamasının ardından ise % 18 oranında artmıştır. 80 μM 'lık konsantrasyonda ise 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 18 ve 48 saat uygulamasında ise % 13 oranında artış gözlemiştir. 100 μM 'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 12 oranında artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasında hücre canlılığı kontrol grubuna göre aynı oranı korumuştur. 200 μM 'lık dozun 24 saat uygulaması ise hücre canlılığını %6, 48 saat uygulaması % 6 artmıştır.. Son konsantrasyon olan 300 μM 'lık konsantrasyonda 24 saatin sonunda hücrelerin % 4'ü canlılığını yitirirken 48 saat hücre canlılığı % 8 oranında artmıştır.

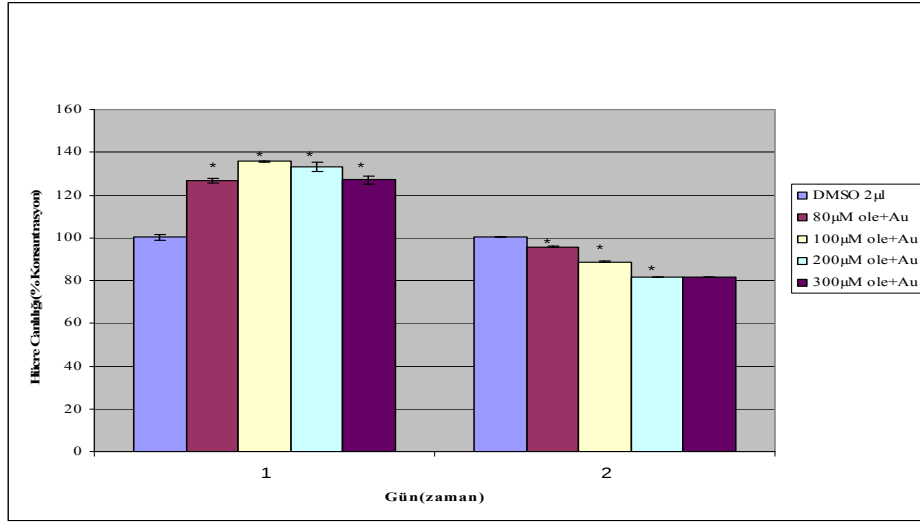


Şekil 3.9 Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin A549 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4.4 Üzüm çekirdeği ekstresinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki etkileri

Üzüm çekirdeğinde elde edilen ekstraksiyonlara Au kompleksi eklenerek elde edilen yeni bileşik HUVEC hücreleri üzerine denemiş ve yapılan MTT testleri sonucunda belirgin bir sitotoksik etki saptanmamıştır (Şekil 3.10). En

düşük konsantrasyon olan 80µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının sonucunda hücre canlılığı % 26 artarken aynı konsantrasyonun 48 saatlik uygulamasının ardından hücre canlılığı % 5 azalmıştır. 100 µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 35 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 12 azalmıştır. 200 µM'lık konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 33 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 19 azalmıştır. Son olarak 300 µM'lık'lik konsantrasyonun 24 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 27 artarken aynı konsantrasyonun 48 saat uygulamasının ardından hücre canlılığı % 19 azalmıştır.

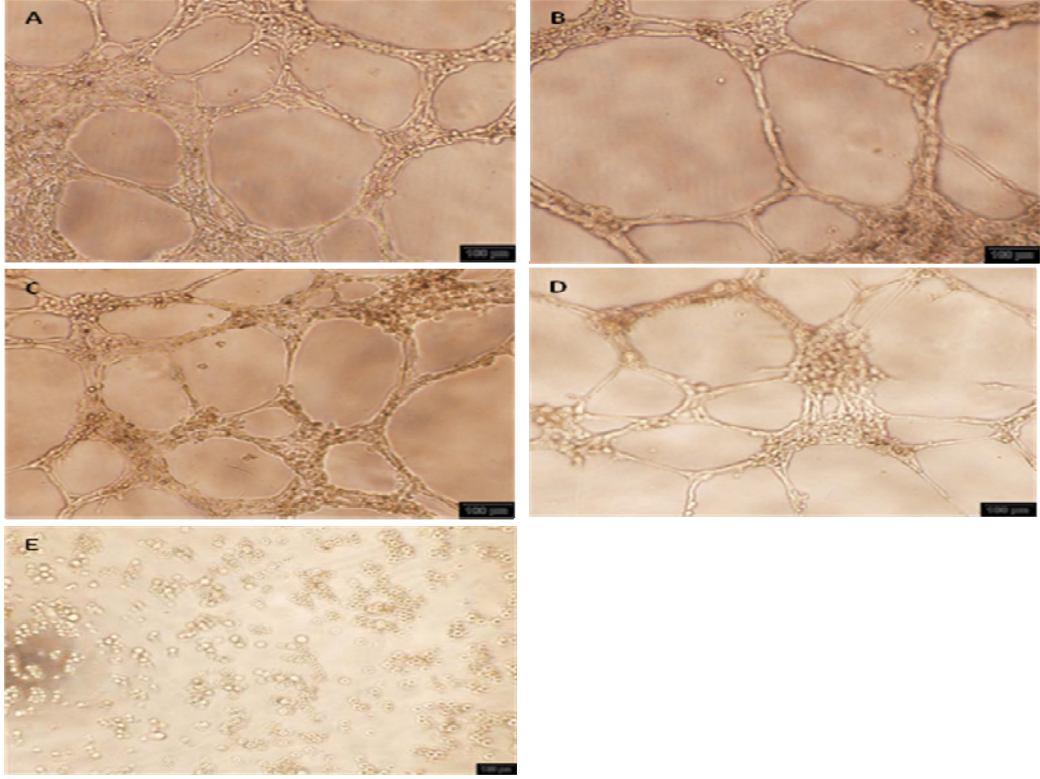


Şekil 3.10 Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstrelerinden Au(III) kompleks halinde çöktürülen resveratrol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.5 Test Maddelerinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri

Test maddelerinin anti-anjiyogenik etkilerini belirlemek amacıyla HUVEC hücreleri üzerinde *in vitro* matrijel tüp formasyon deneyi uygulanmıştır.

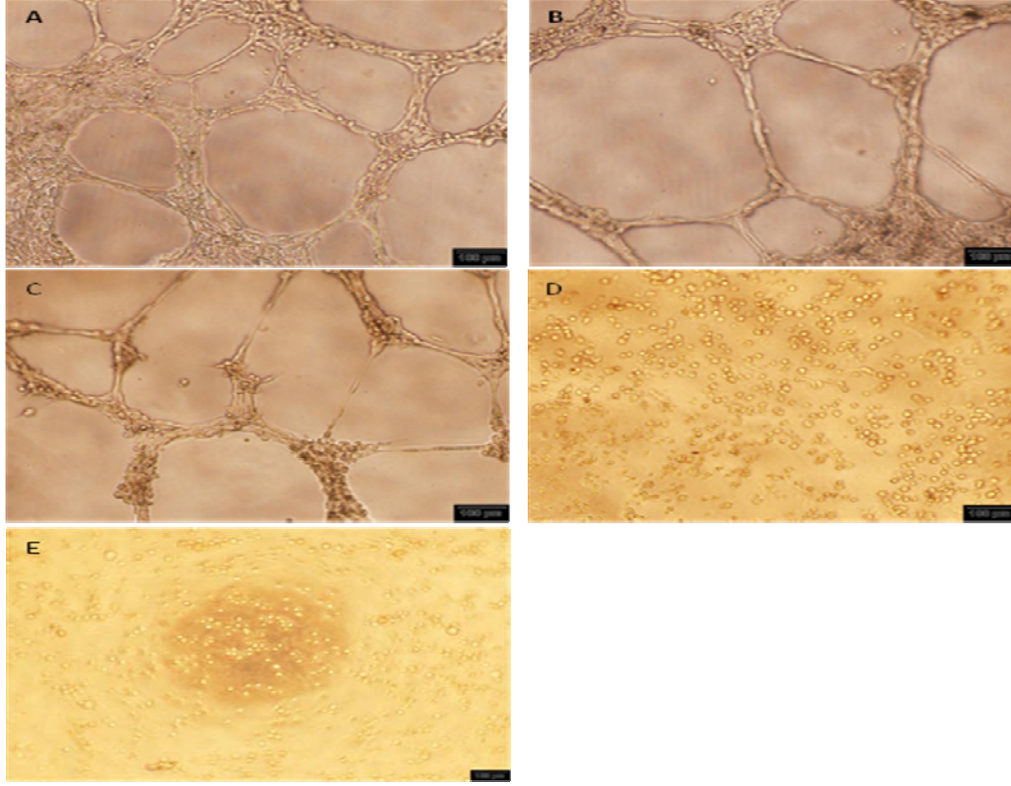
3.5.1 Zeytin yaprağı ekstresinin anjiyogenez üzerindeki etkisi



Şekil 3.11 HUVEC hücreleri üzerinde Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının anjiyogenik etkisi. A) Kontrol, B) Etanol, C) 500 µg/ml, D) 750 µg/ml, E) 1000 µg/ml (10X)

MTT deneylerinden elde edilen verilere göre seçilen konsantrasyonlar matrijel üzerine hücrelerle birlikte uygulanmıştır. 12 saatin sonunda en düşük konsantrasyon olan 500 µg/ml 'lik konsantrasyon ve onu takip eden 750 µg/ml'lik konsantrasyonda tüp oluşumunun bozulmadığı, 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda ise tüp oluşumunun tamamen bozulduğu görülmüştür.

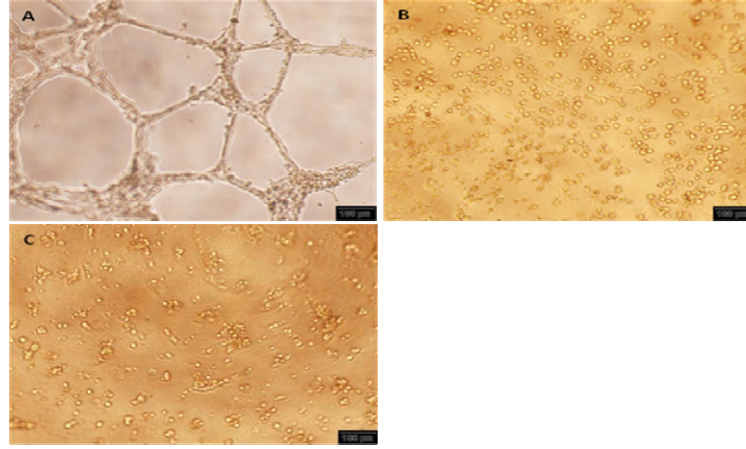
3.5.2 Üzüm çekirdeği ekstresinin anjiyojenez üzerindeki etkisi



Şekil 3.12 HUVEC hücreleri üzerinde Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstresinin anjiyojenik etkisi. A)Kontrol, B)DMSO, C) 500 µg/ml, D)1000 µg/ml, E) 3000 µg/ml (10X)

MTT deneylerinden elde edilen verilere göre seçilen konsantrasyon matrijel üzerine hücrelerle birlikte uygulanmıştır. 12 saatin sonunda 500 µg/ml 'lik konsantrasyon tüp ağı oluşumunu engellemezken 1000 µg/ml 'lik konsantrasyon ile 3000 µg/ml'lik konsantrasyonda hiçbir tüp oluşumu gözlenmemiştir.

3.5.3 Zeytin yaprağı ekstresi ve üzüm çekirdeği ekstresinin kombine uygulamasının anjiyogenez üzerindeki etkisi

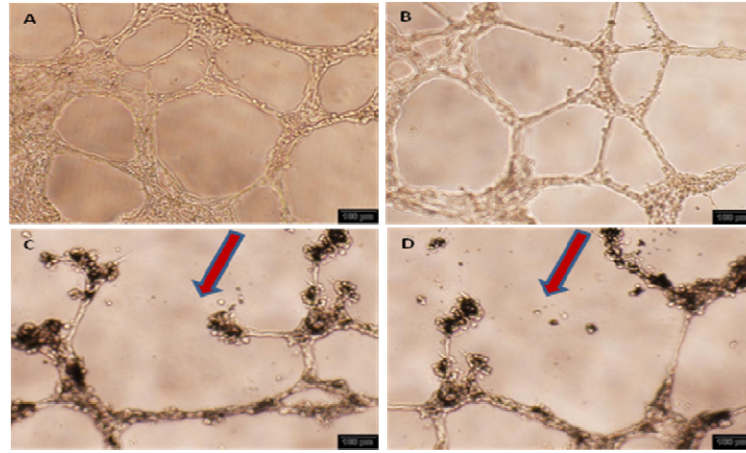


Şekil 3.13 HUVEC hücreleri üzerinde Üzüm (*Vitis Vinifera*) çekirdeği ekstresi ile Zeytin (*Olea Europa*) yaprağı ekstraktının bir arada uygulanmalarının anjiyogenez üzerine etkisi. A) Kontrol, B) 500 µg/ml Zeytin yaprağı + 1000 µg/ml Üzüm çekirdeği, C) 1000 µg/ml Zeytin yaprağı + 500 µg/ml Üzüm çekirdeği (10X)

MTT deneylerinden elde edilen verilere göre seçilen dozlar matrijel üzerine hücrelerle birlikte uygulanmıştır. 12 saatin sonunda 500 µg/ml Zeytin yaprağı + 1000 µg/ml Üzüm çekirdeği kombinasyonu ve 1000 µg/ml Zeytin yaprağı + 500 µg/ml Üzüm çekirdeği kombinasyonlarında tüp ağı oluşumu gözlenmemiştir.

3.5.4 Sodyum tetrakloroaurat (NaAuCl₄) kullanılarak, Au(III) kompleksi halinde zeytin yaprağı ekstresinden çöktürülen oleuropein ve üzüm çekirdeği ekstresinden çöktürülen resveratrol bileşiklerinin anjiyogenez üzerine etkileri

MTT deneylerinden elde edilen verilere göre seçilen konsantrasyonlar matrijel üzerine hücrelerle birlikte uygulanmıştır. 12 saatin sonunda 300µM Zeytin (*Olea Europa*) yaprağı ekstresi+Au ve 300µM Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstresi+Au dozlarında tüp ağı oluşumunun bozulduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.14 Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ve Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği ekstrelerinden Au(III) kompleksi halinde çöktürülen oleuropein ve resveratrol bileşiklerinin anjiyogenez üzerine etkisi. A) Kontrol, B) DMSO, C) 300µM Oleuropein bileşiği, D) 300µM Resveratrol bileşiği (10X)

4.TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Doğal maddeler son yıllarda çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik ilaç üretiminde kullanılmak amacıyla önemli bir kaynak olarak görülmektedir. Yurdumuz coğrafik konumu ve verimli toprak yapısı sayesinde pek çok bitki çeşidinin yetişmesine elverişli ortam sağlamaktadır. Günümüzde kanserin tıbbi olarak tedavi edilmesinde doğal kaynaklar ve türevlerinden elde edilen veya katkı sağlanan ürünlerin keşfi ve geliştirilmesi klinik anlamda da tercih edilen bir yöntemdir (Nobili ve ark. 2009).

Zeytin yaprağı (*Olea europaea* L), sağlığa yararlı biyoaktif fitokimyasallarca zengin ve oldukça kolay ulaşılabilen doğal bir materyaldir. Zeytin yaprağı ekstrakt içeriğindeki en baskın bileşik oleuropeindir, aynı zamanda fenol ve flavanoidler de bulunmaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan yüksek antioksidant özelliğine sahip fitokimyasalların, bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve antitümoral etkiye sahip olduğu çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır. Zeytin yaprağında bulunan oleuropein maddesinin antioksidan, antianjiyojenik, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar, antitümoral ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu, kanserli hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasını engellediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hamdi ve Castellon 2005, Micol ve ark. 2005, Ko ve ark. 2009, Sudjana ve ark. 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda üzümünden elde edilen ekstraktların insan sağlığı üzerinde oldukça faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma üzüm ekstrelerinin göğüs kanseri ve akciğer kanseri gibi kanser çeşitlerinde sitotoksik etki gösterdiği ve farelerle yapılan çalışmalarda prostat tümörünü inhibe ettiğini göstermiştir. Üzüm çekirdekleri proantosiyanidinlerce zengindir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidin özütleri (GSPE) pek çok flavonid bileşeninden oluşan bir karışımdır ve etkili antioksidant aktivite gösterdiği bilinmektedir (Hung ve ark. 2000). Üzüm çekirdeğinde bulunan proantosiyanidinler damar tıkanıklığını önleme, kalp damar rahatsızlıkları ve dislipidemi tedavisinde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Das ve Maulik 2006). Üzüm ve üzüm çekirdeğinden elde edilen ürünler aynı zamanda geleneksel tıpta eklem romatizması, bağışıklık sistemi hastalıkları ve iltihap tedavilerinde

kullanılmaktadır. Yine yapılan çalışmalar göstermiştir ki oksidatif stres ve kanser oluşumu karşısında iyi bir kemopreventif ajandır. GSPE'lerin düşük toksisiteye sahip bileşikler olduğu ve antiproliferatif, antioksidatif, antikarsinogenetik ve antianjiyogenik etkileri olduğu açıklanmıştır (Wen ve ark. 2008, Gao ve ark. 2009, Punatil ve Katiyar 2009, Akhtar ve ark. 2009, Hsu ve ark. 2009).

Hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve hücrel metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesi *in vitro* sitotoksite testlerine dayanır (Gad 2000). Sitotoksite testleri *in vitro* çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Kültüre edilen hücreler kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmaları materyallerin toksisitesinin belirlenmesinde önemli rol oynar (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). *In vitro* hücre kültürüne dayalı sitotoksite belirleme testleri, toksisiteyi belirlemekte kullanılan hayvan sayısını azaltır ve modern toksikoloji test stratejilerinin ana dayanağı haline gelmiştir. Yüksek veri sağlayan hücre bağımlı testler biyolojik görüntüleme yaklaşımlarının başlangıç basamağıdır (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Kültüre edilen hücrelerde sitotoksite ve/veya hücre canlılığının belirlenmesinde birkaç sınıf *in vitro* toksite testi kullanılmaktadır. Bunlar membran içeriğini değerlendirerek hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan kolorimetrik veya floresans özellikteki NR, MTT vb. testlerdir (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Tek tabakalı kültürlerde sitotoksite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde en sık kullanılan testlerden biri MTT sitotoksite testidir (Fotakis ve Timbrell 2005, Kroll ve ark. 2010).

Bu tez çalışmasında Zeytin (*Olea Europa*) yaprağı ve üzüm (*Vitis vinifera* sp.) çekirdeği eksrelerinin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. MTT deneyi, 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid, oksidatif enzimlerden birinin aktivitesini ölçerek hücre enerji metabolizmasını belirlemede kullanılmaktadır. Bu boya, mitokondride suksinik dehidrogenazla çözünmeyen mor renkli bir formazan ürününe indirgenir (Fotakis ve Timbrell 2005, Kroll ve ark. 2009, Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Tetrazolyum tuzunun mavi bir formazan ürünü olan bromide dönüşümüne dayalı olan bu deneyler hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçmekte yaygın olarak kullanılmaktadır.

MTT deneyinin sonuçlarına göre; araştırmamızda kullandığımız test maddelerinin zamana ve doza bağlı olarak hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi farklılık göstermektedir. Elde edilen verilere göre zeytin yaprağı ekstresi ile hazırlanan dozlar hem A549 hem de HUVEC hücreleri üzerinde belirli dozlarda sitotoksik etkiye sahiptir. A549 hücreleri üzerinde uygulanan dozların 24 saatlik muameleleri sonucunda 750µg/ml’lik doz düşük miktarda sitotoksik etkiye sahipken aynı dozun 48 saatlik uygulaması hücre canlılığını % 50’den daha fazla azaltmıştır. 1000 µg/ml’lik dozda ise 24 saatten itibaren hücre canlılığı belirgin biçimde azalmaya başlamıştır. Literatürde MCF-7 (İnsan göğüs kanseri) hücreleri ile yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarının doza bağlı sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Bouallagi ve ark. 2011). Üzüm çekirdeği ekstraktları ise her iki grup için belirgin bir sitotoksik etkiye sahip değildir. Aksine belirli dozlarda hücre sayısını çoğaltan bir etki mevcuttur. Literatürde farklı bölgelerde yetiştirilmiş üzümlere ait çekirdek ekstraktları MCF-7 (İnsan göğüs kanseri), MKN45 (Gastrit adenokarsinoma), HCT116 (Kolon rektal karsinoma), NCI-H460 (akciğer kanseri) hücreleri üzerinde uygulanmış ve değişik hücre gruplarında farklı sitotoksik etkiler gözlemlendiği rapor edilmiştir, bazı ekstraktlar sitotoksik etkiye sahipken bazılarının belirgin bir sitotoksik etkisi olmadığı bildirilmiştir. Bu durumun toplanan üzümlerin yetiştirildiği bölgedeki iklim koşulları, toprak verimliliği ve coğrafik konumla ilişkili olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Sung ve Lee 2010, Sybilska ve Asztemborska 2002).

Zeytin ve üzüm ekstraksiyonunun bir arada uygulandığına dair literatürde yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz bulgularımız iki ekstraksiyonun kombine uygulamalarının A549 ve HUVEC hücreleri üzerinde üzüm konsantrasyonunun çokluğuna bağlı olarak değişim gösterdiğini vurgulamaktadır. Üzüm konsantrasyonunun yüksek olduğu dozlarda sitotoksik etki azalırken düşük olduğu dozlarda sitotoksik etki zeytin yaprağı ekstraksiyonunun etkisine bağlı olarak artmaktadır.

Ekstraksiyonların ayrı ayrı ve bir aradaki formları *in vitro* olarak HUVEC hücreleri üzerine uygulanarak matrisel tüp formasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Tüp ağı oluşturma yeteneğine bakılarak ekstraktların anjiyojenik ve anti-anjiyojenik etkileri değerlendirilmiştir. Tümörün beslenmesi ve yayılmasında gerekli olan kan

damarlarının oluşması sürecini kapsayan anjiyogenezisin inhibe edilmesi kanseri tedavi edebilme sürecinde en önemli basamak olarak değerlendirilebilir (Teicher, 2011). Zeytin yaprağından elde edilen ekstraksiyondan hazırlanan dozların 1000µg/ml'lik dozda tüp ağını tam olarak bozmaya başladığı gözlenmiştir. Herhangi bir sitotoksik etkisi görülmeyen üzümün ise üç farklı dozu seçilmiş ve 1000µg/ml ve 3000µg/ml'lik dozların 12 saatlik uygulamanın ardından tüp ağı oluşumunu tamamen engellediği gözlenmiştir. Kombinasyonlar için de en toksik dozlar uygulanmış ve bu dozların tüp ağı oluşumunu da tamamen durdurduğu gözlenmiştir. Literatürde antioksidan aktivitesi yüksek flavanol bileşiği içeren bitkilerden elde edilen ekstraktların sitotoksik olmayan dozları matrijel tüp ağı oluşum deneyinde değerlendirilmiş ve toksik olmayan dozlarda anjiyogenezin inhibe edildiği gözlenmiştir (Kim ve ark., 2006). Kanser hedef alan ilaç ve tedavi yöntemlerindeki en büyük problem tümör metastazını önlemeye çalışırken mevcut sağlıklı hücreleri de öldürmektir. Bu sebeple sitotoksik olmayan dozların anjiyogenezini engellemiş olması çok önemlidir (Granados ve ark. 2010).

Yeni terapötik ajanların keşfinde kullanılan en yaygın yöntemlerden bir tanesi de bilinen ajanlardan elde edilen yeni türevlerin farklı kombinasyonlarını uygulayarak hem daha etkin hem de daha az yan etkiye sahip yeni kanser ajanlarının keşfidir. Bu amaçla pek çok farklı çalışma ve yaklaşım uygulanmıştır. Kramer ve ark. 1994 yılında yaptıkları çalışmalarında klorombosil, peptid ilaçları ve HMG-CoA redüktaz inhibitörlerini 3 durumundaki kolik asit ve türevleri ile eşleştirmişlerdir. Parshke ve arkadaşları ise 2000 yılında yaptıkları çalışmalarında sisplatin analoglarını taşıyıcı moleküller aracılığıyla hedef ilaç üretmek amacıyla bağlamışlardır. Diğer bir strateji de direkt olarak tümörü hedef alan ilaçlar keşfedebilmektir. Criado ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmalarında altın ve platin kompleksleri ile safra kesesi asitlerini bağlayarak biyolojik asitten taşıyıcı olarak yararlanmaya çalışmışlardır.

Yüksek miktarda polifenol içeren bitki ekstraktları endotel fonksiyonu fazlaştırmak suretiyle antioksidan etkiyi arttırırlar (Lluís ve ark. 2011). Aynı zamanda bitkilerde bulunan bu polifenollerin antioksidan kapasitesi redox potansiyelleri ve metal şelasyonuna karşı da etkilidir. Metallerin vücut içerisinde

oluşturdukları serbest radikallere bağlanarak vücutla olumsuz etkileşime girmelerini önlerler (Perumalla ve Heittiarachchy 2011).

Sebze ve meyveler vitamin, lif ve mineral kaynağı olmalarının yanı sıra polifenol, terpen, alkaloid ve fenolikler gibi çeşitli bileşikler içermektedir. Yapılan araştırmalar meyve ve sebzelerde bulunan bu mikronütrientlerin kanseri önleyebileceğini göstermiştir. Resveratrol kansere etkisi iyi bilinen bir fitokimyasaldır (Aggarwal ve Shishodia 2006). Farelerle yapılan farklı çalışmalarda oral yolla günlük olarak tüketilen 2,5 ile 10 mg oranındaki resveratrolün tümör büyümesini, metastazı ve tümör anjiyojenезini engellediği bulgulanmıştır (Reddy ve ark. 2003). Bitkilerden elde edilen bu polifenolün anti-anjiyojenik etkilerine dikkat çekilmiştir (Cao ve ark. 2002). Yine çeşitli bitkilerde özellikle zeytin yaprağında bulunun bir başka polifenol olan oleuropeinin ise antiproliferatif ve antioksidan etkileri MCF-7 ve T-47-D göğüs kanserli hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Bulatto ve ark. 2011).

Altın ve türevleri pek çok rahatsızlığı tedavi etmek amacıyla asırlardır kullanılmaktadır. Tedavi edici etkisinin yanında altın ve türevlerinin pek çok toksik etkisi de bulunmaktadır. Tarihte bu toksik etkiden kurtulmak amacıyla içilebilir altın iksirleri yapılmıştır. Bu iksirler değişik bitkilerle karıştırılıp içilerek altının toksik etkileri bertaraf edilmeye çalışılmıştır. Tam olarak kimyasal özellikleri bilinmemekle birlikte çeşitli bitkiler hala altının toksik etkisinden kurtulmak amacıyla kullanılmaktadır (Milacic ve Dou, 2009). Bu tez kapsamında sitotoksik ve anjiyojenik etkilerine bakılan iki bitki ekstresinin potansiyel bir kanser ilacı olan Au tuzları ile çöktürülerek elde edilen yeni bileşikler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MTT sonuçlarımız hem zeytin yaprağı hem de üzüm çekirdeği ile ayrı ayrı çöktürülen Au tuzlarının 24 ve 48 saat uygulamalarında A549 ve HUVEC hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını gösterilmiştir. Ancak *in vitro* tüp ağı oluşturma deneylerinde MTT testlerinde uygulanan ve sitotoksik etkiye sahip olmayan dozların tüp ağı oluşumunu engellediği gözlenmiştir. Tüp ağı oluşturma deneylerinde pozitif kontrol olarak yine laboratuvarımızda yapılan bir başka araştırmanın sonuçları referans alınmıştır (Demirci ve ark. 2010). Kanser önleyici ilaçların en önemli problemi düşük seçiciliğe sahip olduklarından sağlıklı hücreleri de toksik olarak etkilemeleridir

(Rashid ve ark. 2011). Bu bağlamda altın tuzları ile çöktürülerek elde edilen oleuropein ve resveratrol bileşiklerinin yeni formlarının hücrelere sitotoksik etki göstermeksizin anjiyogenezini engellemiş olması iyi bir kanser önleyici olabileceği açısından umut vericidir. Literatürde benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde antioksidanlarla yapılmış çok sayıda makale bulunmasına karşın antioksidan etkisi bilinen bitkilerin total ekstraksiyonunun uygulandığında sitotoksik ve anjiyogenez etkilerinin değerlendirdiği çalışma sayısı çok azdır. Ayrıca farklı antioksidan etkisi bulunan bu ekstraktların kombine uygulamalarına da rastlanmamıştır. Aynı zamanda bu ekstraksiyonların potansiyel bir kanser ilacı olan Au komplekslerine bağlanması özgün bir değerlendirmedir.

Elde edilen veriler kanser tedavisi için ilaç üretimi ve yine gıda desteği amacıyla kullanılacak materyallerin üretimi için ışık olacak niteliktedir. Ayrıca sonuçlarımız göstermiştir ki mevcut pazarda bitki ve gıda desteği amacıyla kullanılan materyalin kapsamlı incelemesine ihtiyaç vardır. Aynı şekilde antioksidan içeriği yüksek bitki ile bağlanan potansiyel ilaç yaklaşımımız geliştirilmeli ve daha kapsamlı değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abaza, L., Talorete, T.P., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk M. ve Isoda, H. (2007), "Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1306–1312.
- Abe, R., Beckett, J., Abe, R., Nixon, A., Rochier, A., Yamashita, N. ve Sumpio, B. (2011), "Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation," *Eur J Vasc Edovasc Surg*, **41**, 820-814.
- Aggarwal, B.B. ve Shishodia, S. (2006), "Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer," *biochemical pharmacology*, **711**, 397–1421.
- Anonim (2008), Plant taxonomy, <http://www.bokkilden.no/SamboWeb/>
- Anonim (2011), The angiogenesis foundation, <http://www.angio.org/understanding/procces.php>
- Akhtar, S., Meeran, S.M., Katiyar, N. ve Katiyar. S.K. (2009), "Grape seed proanthocyanidins inhibit the growth of human non-small cell lung cancer xenografts by targeting insulin-like growth factor binding protein-3, tumor cell proliferation, and angiogenic factors," *Clinical cancer research*, **15**, 821-31.
- Babich, H., Visioli, F. (2003), "In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from," *Il Farmaco*, **58**, 403-407.
- Bamias, A. ve Dimopoulos, M.A., (2003), "Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy," *European Journal of Internal Medicine*, **14**, 459-469.
- Bezivin, C., Delcros, J.G., Fortin, H., Amoros M. ve Boustie, J. (2003), "Toxicity and antitumor activity of a crude extract from *Lepista inversa* (Scop.:Fr.) Pat. (Agaricomycetideae): a preliminary study," *International Journal of Medicinal Mushroom*, **5**, 25-30.
- Bizzarri, M., Giuliani, A., Cucina, A., D'Anselmic, F., Sotod, A.M. ve Sonnenscheind, C. (2011), "Fractal analysis in a systems biology approach to cancer," *Seminars in Cancer Biology*, **21**, 175-182.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H. ve Sayadi, S. (2011), "Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells," *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 179-184.
- Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D'Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M., Procopio, A., Iannone, M., Rotiroti, D. ve Russo, D. (2011), "Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives," *Food Chemistry*, **127**, 1614-1609.
- Cao, Y., Cao, R., Bråkenhielm, E. (2002), "Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 380-390.
- Chambers, A.E, MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Morris, V.L. ve Groom, A.C. (2000), "Clinical targets for anti-metastasis therapy," *Adv. Cancer Res.* **79**, 91-121.

- Chen, J.J., Chen, J.J.J, Chiang, C.S., Hong, J.H. ve Yeh, C.K. (2011), "Assessment of tumor vasculature for diagnostic and therapeutic applications in a mouse model in vivo using 25-MHz power Doppler imaging," *Ultrasonics*, **51**, 925–931.
- Chen, Y., Wei, X., Guo, C., Jin, H., Han, Z., Han, Y., Qiao, T., Wu, K. Ve Fan, D. (2011), "Runx3 suppresses gastric cancer metastasis through inactivation of MMP9 by upregulation of TIMP-1," *International Journal of Cancer*, **129**, 1586–1598.
- Chesson, A. ve Collins, A. (1997), "Assessment of the role of diet in cancer prevention," *Cancer Letters*, **114**, 237-245.
- Chondrogianni, N., Chinou, I. ve Gonos, E.S. (2010), "Anti-aging Properties of the Olive Constituent Oleuropein in Human Cells," *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, **149**, 1342-1335.
- Colin, D., Lancon, A., Delmas, D., Lizard, G., Abrossinow, J., Kahn, E., Jannin, B. ve Latruffe, N. (2008), "Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses," *Biochimie*, **90**, 1684-1674.
- Cragg, G.M. ve Newman, D.J. (2005), "Plants as a source of Anti- cancer agents," *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 72-79.
- Criado, J.J., Manzano, J.L. ve Rodríguez-Fernández, E. (2003), "New organotropic compounds Synthesis, characterization and reactivity of Pt(II) and Au(III) complexes with bile acids: DNA interactions and 'in vitro' anticancer activity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **96**, 311–320.
- Das, D.K. ve Maulik, N., (2006), "Resveratrol in cardioprotection: A therapeutic promise of alternative medicine," *Mol. Interv.*, **6**, 36-47.
- Demirci, B., Demirci, F., Koparal, A.T. (2010), *Uçucu Yağ Taşıyan Bazı Bitkilerin Anjiyojenik ve Antianjiyojenik Aktiitelerinin in vivo ve in vitro Yöntemlerle Araştırılması*, TÜBİTAK araştırma projesi, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu.
- Desoize, B. (2004), "Metals and mteal compounds in cancer treatment," *International Journal of Cancer research and treatment*, **24**, 1529-1544 .
- Durak, İ., Çetin, R., Devrim, E. ve Ergüder, B.İ. (2005), "Effects of black grape extract on activities of DNA turn-over enzymes in cancerous and non-canceorus human colon tissues," *Life Sciences*, **26**, 2995-3000.
- Engelbrecht A.-M., Mattheyse, M., Ellis, B., Loos, B., Thomas, M., Smith, R. ve Myburgh, K. (2007), "Proanthocynadin from grape seeds inactivates the PI3- kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line," *Cancer Lett* , **258**, 144-153.
- Farrel, N. (2004), "Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents," *Comprehensive Coordination Chemistry II*, **9**, 809-840.
- Fidler, I.J. (2002), "Critical determinants of metastasis," *Cancer Biol.* **12**, 89-96.
- Fukui, M., Yamabe, N. ve Zhu, B.T. (2010), "Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo," *European Journal of Cancer*, **46**, 1891-1882.

- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006), "Cytotoxicity assays: comparison of LDH, Neural Red, MTT and Protein Assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicology Letters*, **160**, 171-177.
- Gad, S.C. (2000), 'In Vitro Toxicology,' Taylor and Francis, Newyork.
- Gao, N., Budhraj, A., Cheng, S., Yao, H., Zhang, Z., Shi, X., (2009), "Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells by Grape Seed Extract Occurs via Activation of c-Jun NH2-Terminal Kinase," *Clinical cancer research*, **15**, 9-140.
- Gao, J., Sun, L., Huo, L., LI, D. ve Zhou, J. (2010), "CYLD regulates angiogenesis by mediating vascular endothelial cell migration," *Blood*, **115**, 4130-4137.
- Garcia- Perez, J.V., Garía-Alvadora, M.A., Carcel, J.A. ve Mulet, A. (2010), "Extraction kinetics modeling of antioxidants from grape stalk (*Vitis vinifera* var. Bobal): Influence of drying conditions," *Jornal of Food Engineering*, **101**, 49-48.
- Geva, E. ve Jaffe, R.B., (2004), *The Ovary*, University of California, San Francisco, California, 305-317.
- Glazebrook, J. ve Ausubel, F.M. (1994), "Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens," *Plant Biology*, **91**, 8959-8955.
- Gonzalez, C.A. ve Riboli, E. (2010), "Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study," *European Journal Of Cancer* **46**, 2555 –2562.
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A. N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E. ve Gerothanassis, I.P. (2009), "Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells," *Moleculer Nutrition & Food Research*, **53**, 600-608.
- Granados-Principal, S., Quiles, J.L., Ramirez, Tortosa, C.L., Sanchez-Roviora, P. ve Ramirez-Tortosa, MC. (2010), "New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients," *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1425-1438.
- Grazul, M. ve Budzisz, E. (2009), "Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones," *Coordination Chemistry Reviews*, **253**, 2588–2598.
- Gollucke, A.P. (2010), "Recent applications of grape polyphenols in foods, beverages and supplements," *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*, **2**, 9-105.
- Guo, Z., Sadler, P.J. (2000), "Medicinal inorganic chemistry," *Adv Inorg Chem*, **49**, 183-306.
- Hamdi H.K. ve Castellon, R. (2005), "Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor," *Biochem Biophys Res Commun*, **334**, 769–778.
- Han, J., Talorete, T.P.N., Yamada P. ve H. Isoda, H. (2009), "Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells," *Cytotechnology*, **59**, 45-53.
- Harris, A.L. ve A. Generalli, D.G. (2008), "Inhibitors of tumor angiogenesis," *Cancer Drug Design and Discovery*, (Ed: Neidle, S.), Academic Press, University of London, UK, 351-381.

- Harvey, A. (2000), "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products," *DDT*, **5**, 294-300.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M.N. ve Kerry, J.P. (2011), "Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid," *Food Chemistry*, **126**, 948-955.
- Healy, P.C., Loughrey, B.T., Williams, M.L. ve Parsons, P.G. (2010), "Synthesis, structure and cytotoxicity studies of four-coordinate bis (*cis*-bis(diphenylphosphino)ethene) gold(I) complexes, [Au(dppe)₂]X," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **104**, 625-631.
- Holmgren, L., O'Reily, M.S. ve Folkman, J. (1995), "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression," *Nat. Med.*, **1**, 149-153.
- Holst C.M. ve Oredsson, S.M. (2005), "Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines," *Toxicology in vitro*, **19**, 379-387.
- Hornberg, J.J, Bruggeman, F.J, Westerhoff, H.V ve Lankelma, J. (2006), "Cancer: a systems biology disease," *Biosystems*, **83**, 81-90.
- Hsu, C.P., Lin, Y. H., Chou, C.C., Zhou, S.P., Hsu, Y.C., Liu, C.L., Ku, F.M. ve Chung, Y.C. (2009), "Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells," *Anticancer research*, **29**, 9-283.
- Katiyar, K. S. (2008), "Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system," *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 71-76.
- Kaur, M., Mandair, R., Agarwal, R. ve Agarwal, C. (2008), "Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells," *Nutr Cancer.*, **60**, 2-11.
- Kerbel, R. ve Folkman, J. (2002), "Clinical translation of angiogenesis Inhibitors," *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 727-739.
- Khan, N., Afaq, F. ve Mukhtar, H. (2010), "Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies," *Cancer Letters*, **293**, 133-143.
- Kim, H.R., Lin, H.M., Biliran, H. ve Raz, A. (1999), "Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells," *Cancer Res.* **59**, 4148-4154.
- Kim, J.D., Liu, L., Guo, W. ve Meydani, M. (2006), "Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**, 165-176.
- Ko, K.W., Kang, H.J. ve Lee, B.Y., (2009), "Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts," *Food Science and Biotechnology*, **18**, 818-821.
- Ko, Y.-C., Chang, C.-L., Chien, H.-F., Wu, C.-H. ve Lin, L.-I., (2011), "Resveratrol enhances the expression of death receptor Fas/CD95 and induces differentiation and apoptosis in anaplastic large-cell lymphoma cells," *Cancer Letters*, **309**, 53-46.

- Kolachi, N.F., Kazi, T.G., Afridi, H.I., Khan, S., Wadhwa, S.K., Shah, A.Q., Shah, F. ve Baig, J.A. (2010), "Determination of selenium content in aqueous extract of medicinal plants used as herbal supplement for cancer patients" *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 3327-3332.
- Konukoğlu, D. ve Turhan, M., (2005), "Anjiyojenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyojenezi," *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **36**, 42-48.
- Korkmaz, S. (2002), *Paklitaksel, kesretin, ve berberinin A549, Hela, Ht-29, Nih3t3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kosaraju, S.L., Labbett, D.L., Emin, M., Konczak, I.K. ve Lundin, L. (2008), "Delivering polyphenols for healthy ageing," *Nutrition & Dietetics*, **65**, 48-52.
- Kreja, L. ve Seidel, H.-J., (2002), "On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549." *Chemosphere*, **49**, 105-110.
- Kramer, W., Wess, A., Enhsen, K., Bock, K., Falk, E., Hoffmann, A., Neckerman, G., Gantz, D., Schulz, S., Nickau, L., Petzinger, E., Turley, S., Dietschy, J.M. (1994), "Bile acid derived HMG-CoA reductase inhibitors," *Biochim. Biophys. Acta*, **1227**, 137.
- Kroll, K.M., Ferrantinia, A. ve Domany, E. (2010), "Introduction to biology and chromosomal instabilities in cancer," *Physica A*, **389**, 4374-4388.
- 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.
- Lamallice, L., Boeuf, F.L. ve Huot, J. (2007), "Endothelial Cell Migration During Angiogenesis," *Circulation Research*, **100**, 782-794.
- Lee, O.H. ve Lee, B.Y. (2010), "Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract," *Biosource Technology*, **101**, 3751-3754.
- Lee, Y.J., Kim, J., Kim S.K., Had, S., Moke, T.S., Mitsudomif, T. ve Cho, B.C. (2011), "Lung cancer in never smokers: Change of a mindset in the molecular era," *Lung Cancer*, **72**, 9-15.
- Li, Y. ve Cozzi, P.J. (2010), "Angiogenesis as a Strategic Target for Prostate Cancer Therapy," *Medicinal Research Reviews*, **30**, 23--66,
- Li, T., Fan, G.-X., Wang, W., Li, T. ve Yuan, Y.-K. (2007), "Resveratrol induces apoptosis, influences IL-6 and exerts immunomodulatory effect on mouse lymphocytic leukemia both in vitro and in vivo," *International Immunopharmacology*, **7**, 1231-1221.
- Lohela, M.K. ve Alitalo, K. (2003), "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Vasculogenesis," *Angiogenesis, and Lymphangiogenesis*, **263**, 231-243.

- Long, H.S., Tilney, P.M. ve Van Wyk, B.-E. (2010), "The ethnobotany and pharmacognosy of *Olea europaea* subsp. *africana* (Oleaceae)," *South African Journal of Botany*, **76** 324–331.
- Losso, J.N. (2003), "Targetting excessive angiogenesis with functional foods and nutraceuticals," *Trends in Food Science&Technology*, **14**, 455-468.
- Luís, L., Rosa Nogués, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giralt, M., Valls, J. ve Solà, R. (2011), "Toxicology evaluation of a procyanidin-rich extract from grape skins and seeds," *Chemical Toxicology*, **49**, 4-1450.
- Ma, Y., Qu, Y. ve Fei, Z. (2011), "Vascular Endothelial Growth Factor in Cerebral Ischemia," *Journal of Neuroscience Research*, **89**, 969–978.
- Mc Cullough, M.L. ve Giovannucci, E.L. (2004), "Diet and Cancer prevantation," *Oncogene*, **23**, 6349-6364.
- McDonald, D.M. ve Baluk, P., (2002), "Significance of blood vessel leakiness in cancer," *Cancer Res*, **62**, 5381–5385.
- Michalke, B. (2010), "Platinum speciation used for elucidating activation or inhibition of Pt-containing anti-cancer drugs," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24**, 69–77.
- Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L. ve Estepa, A. (2005), "The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV)," *Antiviral Research*, **66**, 129–136.
- Milacic, V. ve Dou, P.Q. (2009), "The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: Implications for breast cancer therapy," *Bioinorganic and Biomedical Chemistry of Gold*, **253**, 1649-1660.
- Miljković, D., Dekanski, D., Miljković, Ž. ve Momčilović, M. (2009), "Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis," *Clinical Nutrition*, **28**, 346-350.
- Mona, E.A., Hailemichael, H., Yasser, M. ve El-Awady, E.S. (2011), "Anti-angiogenic effect of resveratrol or curcumin in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice," *European Journal of Pharmacology*, **652**, 14-7.
- Moore, M.A. (2001), "The role of chemoattraction in cancer metastases," *Bioessays*, **23**, 674-676.
- Monteiro-Riviere, N.A., "Inman, A.O., Zhang, Z.W. (2009), Limitations and relative utility of screening assays to to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line," *Toxicology and Applied Pharmacology*, **234**, 222-235.
- Mosman, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63.
- Mouta, C., Liaw, L. ve Maciag, T. (2003), "Angiogenesis: Cellular and Molecular Aspects of Postnatal Vessel Formation," *Handbook of Cell Signaling*, (3-5).
- Munn, L.L. (2003), "Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies," *Drug Discov. Today*, **8**, 396–403.
- Nesaretman, K. (2008), "Multitarget therapy of cancer by tocotrenols," *Cancer Letters*, **269**, 388-395.

- Nobili, S., Lippib, D., Ewa, W., Donninic, M., Bausi, L., Minia, E. ve Capaccioli, S. (2009), "Natural compounds for cancer treatment and prevention," *Pharmacological Research*, **59**, 365–378.
- Omar, S. H. (2010), "Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive," *Saudi Pharmaceutical Journal* **18**, 121-111.
- Otock, Z.K., Hatoum, H.A., Musallam, K.M., Awada, A.H. ve Shamseddine, A.I. (2011), "Is VEGF a predictive biomarker to anti-angiogenic therapy?," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **79**, 103–111.
- Park, J.W., Choi, Y.J., Jang, M.A., Lee, Y.S., Jun, D.Y., Suh, S.I., Baek, W.K., Suh, M.H., Jin, I.N. ve Kwon, T.K. (2001), "Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells," *Canser Letters*, **163**, 49-43.
- Paschke, R., Kalbitz, J., Paetz, C. (2000), "Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization," *Inorg. Chim. Acta*, **304**, 241.
- Perumalla, A.V.S., Heittiarachchy, N.S. (2011), "Green tea and grape seed extract-Potential application in food safety and quality," *Food Research International*, **44**, 827-839.
- Piccaciano, M. F., Cohen, B. E. ve Thomas, P.R. (2006) "Dietary Supplements in cancer and therapy," *Nutritional Oncolog*, **507**, 516-517.
- Piotrowska, M.J. ve Forys, U. (2011), "Analysis of the Hopf bifurcation for the family of angiogenesis models," *J. Math. Anal. Appl.*, **382**, 180–203.
- Plumb, C.L. ve Coomber, B.L. (2006), "Angiogenesis, Metastasis, and Epigenetics in Cancer," *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*, **4**, 253-246.
- Prasasya, R.D., Tian, D. ve Kreeger, P.K. (2011), "Analysis of cancer signaling networks by systems biology to develop therapies," *Seminars inCancerBiology*, **21**, 201-206.
- Punathil, T. ve Katiyar, S.K. (2009), "Inhibition of non-small cell lung cancer cell migration by grape seed proanthocyanidins is mediated through the inhibition of nitric oxide, guanylate cyclase, and ERK1/2," *Molecular Carcinogenesis*, **48**, 232-242.
- Rigacci, S., Guidotti, V., Bucciantini, M., Parri, M., Nediani, C., Cerbai, E., Stefani, M. ve Berti, A. (2009), "Oleuropein aglycorn prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **21**, 726-35.
- Rajendran, J.G. ve Krohn, K.A. (2008), "Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Hypoxia and Angiogenesis: Imaging Biology and Guiding Therapy," *Cancer Imaging: Instrumentation and Applications*, **35**, 212-217.
- Rak, J., Yu, J.L., Kerbel, R.S. ve Coomber, B.L. (2002), "What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors?" *Cancer Res.* **62**, 1931-1934.
- Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M.A., McKeow, S.R., Banat, I.M., Worthington, J. (2011), "A study of anti-cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo," *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1477-1483.

- Reddy, L. Odhav, B. ve Bhoola, K.D. (2003), "Natural products for cancer prevention: a global perspective," *Pharmacology & Therapeutics*, **99** 1–13.
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W. ve Szekeres, T. (2008), "Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?," *Mutation Research*, **658**, 94-68.
- Sarkar, F.H., Li, Y. (2009), "Harnessing the fruits of nature for the development of multi-targeted cancer therapeutics," *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 597-607.
- Sybliska, D., Astemborska, M. (2002), "Chiral recognition of terpenoids in some pharmaceuticals derived from natural sources," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **54**, 187-195.
- Serraa, A.T., Matiasa, A.A., Nunesa, A.V.M., Leitãob, M.C., Britoc, D., Bronzed, R., Silvad, S., Piresd, A., Crespo, M.T., San Romãob, M.V. ve Duarte, C.M. (2008), "In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**, 311-319.
- Shao, Z.H., Wojcik, R., Dossumbekova, A., Hsu, C., Mehendale, S.R., Li, C.Q., Sharp, W.W., Chang, W.T., Hamann, K.J., Yuan, C.S. ve Hoek, T.L.V. (2009), "Grape seed proanthocyanidins protect cardiomyocytes from Ischemia and reperfusion injury via Akt-NOS signalling," *Journal of Cellular Biochemistry*, **107**, 697-705.
- Shu, X., Li, H., Sun, Z., Wu, M., Ma, J., Wang, J., Wang, Q., Sun, Y., Fu, Y., Chen, X., Kong, Q. ve Jia L. (2010), "Identification of metabolic pattern and bioactive form of resveratrol in human medulloblastoma cells," *Biochemical Pharmacology*, **79** 1516–1525.
- Sleeman, B.D., (2003), "Tumour angiogenesis and cell motion," *Second MIT Conference on Computational Fluid and Solid Mechanics*, (Ed: K.J. Bathe), Elsevier, University of Leeds, Leeds, 1814-1817.
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., J. Islam, Ng. N., Riley T. V. ve Hammer, K. A. (2009), "Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract," *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33**, 461-463.
- Sun, W.Y.R., Che, C.M. (2009), "The anti-cancer properties of gold(III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands," *Bioinorganic and Biomedical Chemistry of Gold*, **253**, 1682-1691.
- Sung, J. ve Lee, J. (2010), "Antioxidant and antiproliferative activities of grape seeds from different cultivars," *Food Science Biotechnology*, **19**, 321-326.
- Tassi, E. ve Wellstein, A. (2007), "Angiogenesis, Basic Mechanisms and Role in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma," *Head and Neck Cancer*, (Ed: Tassi, E.), Lombardi Cancer Center, Georgetown University, Washington, DC, 81-100.
- Taşdemiroğlu, E. (2003), "Tümör-Metastaz ilişkisi; 154 pediatrik solid malign tümör olgusunun analizi," *Türk Nöroşirurji dergisi*, **13**, 008-011.
- Teicher, A.B. (2011), "Antiangiogenic agents and targets: A perspective," *Biochemical Pharmacology*, **81**, 6-12.

- Tiekink, E.R.T. (2002), "Gold derivatives for the treatment of cancer," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **42**, 225-248.
- Voulgari, A. ve Pintzas, A. (2009), "Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1796**, 75-90
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.R., Wen, P.F., Zhang, P., Wang, H.L. ve Huang, W.D. (2010), "Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation," *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 152-142.
- Wayne L. Leifert, Mahinda Y. ve Abey, W. (2008), "Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity," *Nutrition Research*, **28**, 842-850.
- Wen, W., Lu, J.M. ve Zhang, K.Q. (2008), "Grape seed extract (GSE) inhibits angiogenesis via suppressing Vascular Endothelial Growth Factor Receptor signaling pathway," *Cancer Prev. Res.*, **71**, 554-561.
- Whitlock, N.C., Bahn, J.H., Lee, S.-H., Eling, T.E. ve Baek, S.J. (2011), "Resveratrol-Induced Apoptosis Is Mediated by Early Growth Response-1, Krüppel-Like Factor 4, and Activating Transcription Factor 3," *Cancer prev research*, **4**, 116-27.
- Velmurugan, B., Singh, R.P., Agarwal, R. ve Agarwal, C. (2010), "Dietary-feeding of grape seed extract prevents azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in fischer 344 rats," *Mol Carcinog.*, **49**, 641-52.
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S. ve Kikuchi, M. (2002), "Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds," *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 599-607.
- Yaşar, S., Sağlıker, A.H., Darıcı, C. (2009), "Doğu Akdeniz bölgesinde (Adana) yetişen dört odunsu bitkinin bazı toprak ve yaprak özellikleri ile sabit yağ oranları," *Türk Bilim Araştırma Vakfı*, **2**, 157-161.
- Yazır, Y., Gonca, S., Filiz, S. ve Dalçık, H. (2004), "Endotel hücreleri için önemli bir protein ailesi; Vasküler endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Ailenin üyeleri, yapısı ve sentezi," *C.Ü. Tıp fakültesi dergisi*, **26**, 181-184.
- Yuea, X., Zhanga, W. ve Deng, M. (2011), "Hyper-production of ¹³C-labeled trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption," *Biochemical Engineering Journal*, **53**, 292-296.