T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI TÜR BİTKİ EKSTRAKTLARININ İNSAN KOLON KANSER HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Saliha ÖZEN

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Zafer BULUT

KONYA-2020

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI TÜR BİTKİ EKSTRAKTLARININ İNSAN KOLON KANSER HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma Saliha ÖZEN

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Zafer BULUT

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202044 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Sağlıklı beslenmenin temel ögelerinden biri olan bitkiler, geçmişten günümüze insanoğlunun hayatında hastalıklarla mücadele için de oldukça yaygın olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir. Özellikle ilaç tedavilerindeki yan etkilerin azaltılması için alternatif tedavi yöntemleri arayışı çalışmaları hız kesmeden sürmektedir.

Sunulan çalışma bitki ekstraktlarından olan kızılcık proantosiyanidin tip A, prosiyanidin tip B1, epigallokateşin galat (EGCG) ve kannabidiol (CBD)'ün farklı konsantrasyonlarının insan kolon kanser hücrelerinde (HT-29) hücre canlılığına ve morfolojisine olan etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamda her türlü yardımını ve desteğini gördüğüm danışmanım Prof. Dr. Zafer BULUT'a, tez yazım aşamalarında destek olan Prof. Dr. Enver YAZAR ve Prof. Dr. Oya BULUT'a, öğrenim hayatımda bana çok şey katan Prof. Dr. Behiç SERPEK, Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU, Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR, Prof. Dr. Firuze KURTOĞLU, Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK, Prof. Dr. Seyfullah HALİLOĞLU, Arş. Gör. Beyza SUVARIKLI ALAN'a ve Öğr. Gör. Avni İLİK'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmanın dizaynı ve uygulama aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof.Dr. Steven M. LIPSON'a teşekkürü borç bilirim.

Tez projemi maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
ÖZET ..... **vii**
SUMMARY ..... **viii**
1.GİRİŞ **1**
1.1.Proantosiyanidinler 2
1.2.Prosiyanidinler 6
1.3.Epigallokateşin galat 9
1.4.Kannabidiol 13
2.GEREÇ VE YÖNTEM **18**
2.1.Gereç **18**
2.1.1.Hücre Kültürü 18
2.1.2. Bitkisel Ekstraklar 18
2.1.3.Sitotoksisite Testi 19
2.1.4.Hücre Morfolojisinin Mikroskobik Olarak Gözlenmesi 19
2.1.5.İstatiksel Değerlendirme 19
2.2.Yöntem **19**
2.2.1.Hücre Kültürünün Hazırlanması 19
2.2.2.Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması 20
2.2.3.Sitotoksisite Testi 22
2.2.4.Hücre Morfolojisinin Mikroskobik Gözlenmesi 22
2.2.5.Değerlerin Analizi 23
2.2.6. İstatiksel Değerlendirme 23
3.BULGULAR **25**
3.1.Sitotoksisite Test Sonucu 25
3.1.1.Kızılcık Proantosiyanidini Tip A 25
3.1.2.Prosiyanidin Tip B1 26
3.1.3.Epigallokateşin galat 28
3.1.4.Kannabidiol 30
3.2.Mikroskobik Gözlem Sonucu 34
3.2.1.Kızılcık Proantosiyanidini Tip A 34
3.2.2.Prosiyanidin Tip B1 36
3.2.3.Epigallokateşin galat 38
3.2.4.Kannabidiol 41

4.TARTIŞMA 44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 60
6. KAYNAKLAR 62
7. ÖZGEÇMİŞ 85

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.B.D. : Amerika Bileşik Devletleri
API-ES : Atmosferik basınçta iyonlaşan elektrosprey
ATCC : American Type Culture Collection
Ca : Kalsiyum
CBD : Kannabidiol
CDDP : Cis-plantinum II diammine dichloride 35'de
ECG : Epikateşin galat
EGC : Epigallokateşin
EGCG : Epigallokateşin galat
EP : Epikateşin
ESI : Elektrosprey iyonizasyon
EMEM : Eagle's Minimal Essential Medium
FBS : Fetal Bovine Serum
HDL : High Density Lipoprotein
HIV : Human Immunodefiency Virus
HNSCC : Baş ve boyun skuamöz kanser hücresi
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HSV : Herpes Simplex Virus
HT-29 : İnsan kolorektal adenokarsinoma hücreleri
Id-1 : DNA bağlanmasının inhibitörü-1
IL : İnterlökin
IU : International Unite
LDL : Low Density Lipoprotein
MS : Mass Spectrophotometry
MS : Multiple Skleroz
O_3 : Aktif oksijen
Mg : Magnezyum
NF-Kb : Nükleer faktör-kapa B
N : Nitrojen
NMR : Nükleer manyetik rezonans
NO : Nitrik oksit
Nrf : Nükleer faktör

PBS : Phosphate Buffer Saline

PGE2 : Prostaglandin E2

ROS : Reaktif oksijen türleri

THC : Tetrahidrokannabinol

TLC : Thin Layer Chromatography

TNF-a : Tümör nekroz faktör-alfa

UV : Ultraviyole Düşük dansiteli proteinlerin oksidasyonu

w/o : Without

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farklı Tür Bitki Ekstraktlarının İnsan Kolon Kanser Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Fatma Saliha ÖZEN
Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2020

Canlıların biyolojik yapılarının desteklenmesi ve hastalıkların tedavisinde bitkisel bileşenleri içeren terapötiklerin araştırılmasına ihtiyaç vardır. Bitkisel bileşenlerden olan proantosiyanidin, prosiyanidin, epigallokateşin galat (EGCG) ve kannabidiol (CBD) tamamlayıcı tıpta alternatif tedavi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar birçok eczane ve besin desteği satan mağazalardan kapsül, tablet veya damla formunda kolaylıkla temin edilmektedirler. Fakat fazla miktarda alımının *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda hücrelere etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Sunulan çalışma, kızılcık proantosiyanidin tip A, prosiyanidin tip B1, EGCG ve CBD'nin değişen konsantrasyonlarının insan kolon kanser hücrelerinde (HT-29) 3. ve 7. gün inkübasyonunun hücre canlılığına etkisini belirlemek ve hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemek amacıyla yapılmıştır.

Bitkisel ekstraktların konsantrasyonlarının hücrelere etkileri, insan kolon kanser (HT-29) monolayer hücre kültüründe çalışılarak 3. ve 7. gün inkübasyonlarının hücre canlılığına etkisi Toxilight® Non-Destructive Cytotoxicitiy BioAssay (Lonza) ile belirlenmiştir. Bitkisel ekstraktların konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki morfolojik etkileri Olympus Phase Contrast Inverted (ULWCD 0.30) mikroskobunda gözlemlenmiştir.

Kızılcık proantosiyanidin tip A'nın 7. gün inkübasyonunun 25 µg/ml'sinde % 27.5, 50 µg/ml'sinde %16.6 ve 100 µg/ml'sinde %12.7 oranında hücrelerde kayıp meydana gelmiştir. Prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin çalışılan konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. ve 7. gün inkübasyonlarının PBS hücre kontrol grubuna göre hücre kaybı meydana getirmediği belirlenmiştir. CBD'nin 3. gündeki inkübasyonu 125 µg/ml'sinde %48.4, 250 µg/ml'sinde %50.7 ve 500 µg/ml'sinde %54.9 oranında hücre kaybı meydana getirmiştir.

Mikroskobik incelemelerde, kızılcık proantosiyanidin tip A'nın inkübasyonunun 7. gününde 10000 µg/ml konsantrasyonu, prosiyanidin tip B1'in inkübasyonunun 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonu, EGCG'nin inkübasyonunun 3. ve 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonu, CBD'nin inkübasyonunun 3. gününde 500 µg/ml konsantrasyonu ve inkübasyonunun 7. gününde ise 63 µg/ml konsantrasyonunun monolayer hücre bütünlüğünde bozulma ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak uygulanan bitkisel ekstraktların zamana ve konsantrasyon miktarının artmasına bağlı olarak hücrelerin canlılığında ve morfolojilerinde değişim meydana getirdiği, düşük konsantrasyonlarda ve 3 gün inkübasyon süresinin HT-29 hücrelerinde daha güvenli olduğu tespit edilmiştir.

İnkübasyon süresi ve bitkisel ekstraktların konsantrasyonları HT-29 hücrelerinde canlılığını ve monolayer hücre bütünlüğünü etkileyen önemli faktör olduğu görülmektedir. İnkübasyon süresi ve bitkisel ekstraktların konsantrasyon miktarının artması HT-29 hücrelerinin canlılığını ve monolayer hücre bütünlüğünün kaybı ile bağlantılı olarak görünsede, bitkisel ekstraktların hücresel toksisiteye ve monolayer hücre bütünlüğünün morfolojisindeki değişikliklerine etkilerinde kimyasal özelliklerinin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Epigallokateşin galat, Kannabidiol, Proantosiyanidin, Prosiyanidin, Sitotoksisite.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation the Cytotoxic Effect of Different Plant Extracts on Human Colon Cancer Cells

Fatma Saliha ÖZEN
Department of Biochemistry (Vet)

PhD THESIS / KONYA-2020

Widespread use of antimicrobial agents in livestock poses the threat of drug resistance. A need exists to investigate the effect(s) of non-conventional therapeutics on the health and well-being of such animal groups. Herbal products consisting of proanthocyanidine, procyanidin, epigallacatechin galate (EGCG), and cannabidiol (CBD) have been widely used and have been proven efficacious as anti-viral and antibacterial therapeutics both *in vitro* and *in vivo*. Such herbal products are commercially available as capsules, tablets, or drops. Problematically, cytotoxicity remains an issue in the administration of these flavonoids, denoting a need to further investigate the safety of such nutraceutical supplements in the diet.

Here, we performed experiments to determine the cytotoxicity effects of varying concentration of cranberry proanthocyanidin type A, procyanidin type B1, EGGC, and CBD on the viability and morphology of human colon cancer cell type (HT-29) after the 3rd and 7th days of incubation. Cellular viability was determined using the Toxilight® Non-Destructive Cytotoxicitiy BioAssay (Lonza) and morphologic changes in monolayer integrity sing an Olympus Phase Contrast Inverted microscope (model No. ULWCD 0.30).

The data from this study show that a cranberry proanthocyanidin type A incubation in HT-29 cell culture monolayers after 7 days resulted in a loss of culture viability to 27.5% in 100 µg/ml, 16.6% in 50 µg/ml, and 12.7% in 25 µg/ml. It was determined that an incubation of HT-29 cells grown in monolayer culture with procyanidin type B1 and EGCG on 3rd and 7th days on did not cause a loss of cell viability integrity, compared to the PBS control. Incubation of cannabidiol (CBD) on 3 day increased the loss of cellular viability to 48.4% in 125 µg/ml, 50.7% in 250 µg/ml, and 54.9% in 500 µg/ml.

Under light microscopy, it was observed that a 10000 µg/ml concentration of proanthocyanidin type A resulted in a loss of monolayer morphology at 4000 µg/ml. Procyanidin type B after 7 days in culture showed a loss of monolayer integrity and morphology at a cell culture treatment of 4000 µg/ml. Treatment of HT-29 cells in monolayer culture with EGCG after days 3 and 7 days at a concentration of 500 µg/ml affect a loss of couture morphology at 63 µg/ml. At the same concentration, and after 7 days in culture, CBD deteriorated monolayer cell morphology and affected a loss of cellular integrity.

In conclusion, due to the increase in the amount of time and concentration of the applied herbal extracts, the vitality of the cells decreases and their morphology changes. It has been determined that at low concentrations and 3 days incubation application is safer in HT-29 cells.

Key Words: Cannabidiol, Cytotoxicity, Epigallocatechin galate, Proantocyanidin, Procyanidin

1. GİRİŞ

Flavonoidler, bitkiler aleminde ikincil metabolit olarak isimlendirilen bileşiklerdir. Yirmibinin üzerindeki flavonoid bileşiğinden günümüze kadar 4000 civarı tanımlanabilmiştir (Middleton ve Kandaswami 1993, Hollman ve Katan 1997). Flavonoidler, fenollerin alt gruplarında yer alırlar ve C6-C3-C6 omurga yapısına sahiptirler. Birbirlerine 4-6 veya 4-8 konumlarından karbon bağları ile bağlıdırlar (Haslam 1998).

Fenoller, bitkisel kaynaklı gıdalarda bulunan en az bir hidroksil grup içeren bir aromatik halkadan oluşan bileşiklerdir (Haslam 1998). Fenolik bileşikler kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, afzeleşin ve epiafzeleşin gibi flavan-3-ols ünitelerini meydana getiren polimer ve oligomerlerden oluşurlar (Porter 1994).

Fenolik bileşikler bitkilerin çiçek, çekirdek, sap, kök ve yaprak gibi çeşitli organlarında bulunmaktadır (Ariga 2004). Beslenmede yer alan bu bileşikler DNA metilizasyonunu, histon modifikasyonu ve gen ifadelerini düzenleyerek epigenetikte değişikliğe neden olabilmektedirler (Choi ve Friso 2010). Gıdalar bu şekilde hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde önemli rol almaktadır (Vanden 2012).

Birden fazla fenol grubunun bir molekülde bulunmasıyla oluşan polifenoller, bitkilerde geniş ölçüde bulunan ve insan sağlığında önemli olan maddelerdir (Williamson ve Manarch 2005). Polifenoller, sebzelerde, meyvelerde, yeşil çay ve şarapta bulunmaktadır ve bu gıdalarla günlük diyetle 1g civarı polifenol vücuda alınmaktadır (Scalbert ve Williamson 2000). Polifenoller her bir halkanın en az bir hidroksil grup içerdiği birden fazla aromatik halkadan meydana gelmektedir (Haslam 1998). Bu bileşiklerin monomerik birimleri A ve B benzen halkalarının birleşimi ve bazen de bu birleşime heterosiklik C halkasının katılması ile oluşmaktadır (Hollman ve ark 1996).

Proantosiyanidinler, prosiyanidinler ve epigallokateşin galat gibi bitki bileşenleri bitkiler aleminde oldukça yaygın olarak bulunan polifenol türleridir (Raz ve ark 2004, Fanos ve ark 2006). Bu bileşenlerin sağlık açısından birçok yararlarının olması onların beslenmedeki önemlerini artırmaktadır (Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Bu bileşenlerin doğal ve sentetik formları hastalıklara ve kansere karşı

mücalede çalışmalarında önemli rol oynamaktadırlar (Kozikowski ve ark 2003, Jaszewska ve ark 2010).

Sunulan çalışma ile kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B, epigallokateşin galat (EGCG) ve kannabidiol (CBD)'un insan kolon kanser hücrelerine (HT-29) olan sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bilgilerin bitkisel kökenli ilaç geliştirme çalışmalarına ve bitkisel besin destek ürünlerinin geliştirilmesine önemli kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

1.1. Proantosiyanidinler

Proantosiyanidinler, tanin grubu içerisinde yer alan polifenol bileşiklerin alt grubunda yer almaktadırlar (Raz ve ark 2004, Fanos ve ark 2006). Bitkiler aleminde proantosiyanidinler meyvelerde, fındıklarda, baklagillerde, çay ve baharatlar gibi oldukça geniş bir alanda bulunurlar (Prior ve Gu 2005). Proantisiyanidinlerin günlük gıdalar ile 58 mg civarında alındığı tahmin edilmektedir (Gu ve ark 2004).

Proantosiyanidinler, kateşin ve epikateşin birimlerinden meydana gelen flavan-3-ols moleküllerinden oluşmaktadır (Prior ve Gu 2005). Ayrıca, monomerik leukoantosiyanidinlerin ve kateşinlerin, dimerler, oligomerler ve polimerlerin enzimatik yoğunlaşması sonucu karbonlar arası bağ ile oluşurlar (Haslam 1980, Czochanska ve ark 1979).

Proantosiyanidinler kimyasal yapılarına göre A, B ve C olmak üzere 3 tipe ayrılmaktadırlar. A ve B tipleri dimer yapıdadır. Proantosiyanidin tip A, C4-C8 ve C2-O-C7 konumları arasındaki bağlar ile bağlı iken, tip B ve C proantosiyanidinleri C4-C6 veya C4-C8 arasında karbon bağı içermektedir (Lea ve Arnold 1978, Howell ve ark 2005). Proantosiyanidinlerin bağlantı tipi hücrelerdeki etkinliğini ve sitotoksisitesini etkilemektedir. A tipi proantosiyanidinin B tipine göre daha toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Kruerger ve ark 2000).

Bitkilerde proantosiyanidin tip B tip A'ya göre daha yaygın olarak bulunmaktadır (Gu ve ark 2003). Proantosiyanidin tip B, elma, kakao, üzüm çekirdeği ve yaban mersininde bulunmaktadır. Proantosiyanidin tip A ise kızılcık ve japon at kestanesi kabuklarında oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır (Ogawa ve ark 2008).

Proantosiyanidinler bitkilerde ve besin destek ürünlerinde dimer yapılarından polimer yapılarına kadar bulunurlar (Beecher 2003). Proantosiyanidinlerin monomer, dimer ve trimer yapıları birçok teknik ile ayrılabilirken, daha kompleks yapıda olan oligomerler ayrılamamaktadır (Okuda ve ark 1989). Proantosiyanidinlerin dimer yapılarından tetramer yapılarına kadar ayrımı kağıt kromatografi, ince tabaka kromatografi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve santrifüjlü bölme kromotografisi ile yapılmaktadır (Okuda ve ark 1995). Trimerin üzerindeki oligomerler polimerizasyon dereceleri birçok jel geçirgen sütunlardan geçirilerek izole edilebilmektedir. TLC ve HPLC'si polimerasyon derecelerine etki ederek monomerlerinden heptamerlerine kadar ayırmaktadır (Lea 1978, Rigaud ve ark 1993).

Proantosiyanidin oligomerlerinin yapısal bilgileri kimyasal hidroliz, kolometrik yöntemler, kütle spektrofotometresi (MS) ve nükleer mağnetik rezonans (NMR) gibi birçok analiz yöntemleri ile açığa çıkmaktadır (Porter 1988). Bu teknikler arasında proantosiyanidinlerin yapısal bilgilerini belirlemede sıklıkla MS kullanılmaktadır (Porter 1988). Buna ilavaten parça iyon tekniğiyle atmosferik basınçta iyonlaşan elektrosprey (API-ES)'de tercih edilmektedir. Düşük ağırlıklı olan bileşiklerin belirlenmesi elektron vuruş tekniği ile yapılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin miktarları ise tekli kromatografi ile belirlenebilmektedir (Gu ve ark 2003).

Bazı bitkilerin proantosiyanidinlerinin dimer ve trimer gibi düşük molekül ağırlıklı olanları yüksek polimer derecelerine göre biyolojik fonksiyonları daha aktiftir. Kırmızı şaraptan elde edilen proantosiyanidinlerin dimer ve trimer yapıda olanları damarları genişletirken, yüksek polimer dereceli olanları ise bu yönde etki göstermediği bildirilmiştir (Reed 2002, Nishida ve Satoh 2003).

Proantosiyanidinler, molekül ağırlıklarına göre çözünebilir ve çözünemez olmak üzere ikiye ayrılırlar. Molekül ağırlıkları 1000-6000 Da arasında olanlar sulu ortamda çözünebilirken, 7000 Da'nin üzerinde olanlar ise sulu ve organik ortamlarda çözünemezler. Bitkilerde çözünemeyen yüksek polimer dereceli proantosiyanidinler yaygın olarak bulunmaktadır. (Lea ve Arnold 1978, Czochanska ve ark 1979, Haslam 1980, Haslam 1998).

Proantosiyanidinler %60'lık metanol içerisinde iyi çözünmektedirler. Ekstrakt hazırlamada metanol genellikle 1/2 oranında su ile karıştırılarak hazırlanmaktadır (Kahkonen ve ark 2001).

İnsanlarda proantosiyanidin içeriği yüksek olan üzüm çekirdeği ekstraktı ve kakao alımı ile plazmada dimer gibi polimer derecesi yüksek olmayan proantosiyanidinlerin tespit edildiği bildirilmiştir (Holt ve ark 2002, Sano ve ark 2003). Proantosiyanidinlerin insanlarda ağızdan alımını takiben alınan miktarın yarısının kolon mikroflorasında 10 saatte, tamamının ise 48 saat içerisinde emildiği rapor edilmiştir (Deprez ve ark 2000).

Proantosiyanidinlerin tıbbi alanda fizyolojik ve farmakolojik etkinlikleri vardır. Serbest radikal yakalamaları, güçlü antioksidan özellikleri, kanserli hücrelerin çoğalmasını önleme, kılcal damarların güçlendirilmesi, yüksek tansiyonu düşürmeleri, ülser tedavisinde yararlanılması, antiviral, antimikrobiyal ve antifungal etkileri, alerji ve hassasiyet azaltmaları bakımından oldukça önemli etkiye sahiptirler. Cildi koruma özellikleri ile de kozmetik ürünlerinde geniş bir kullanım alanları vardır (Barnard ve ark 1993, Cheng ve ark 1993, Eberhardt ve Young 1994, Facino ve ark 1994, Gali ve ark 1994, Liviero ve ark 1994, Kanda ve ark 1998).

Proantosiyanidin ve onların hidroksillenmiş fenolik asit gibi sindirilebilen kısımlarının yüksek antioksidan aktiviteleri vardır (Rice-Evans ve Miller 1996, Bors ve Michel 2002). Bu antioksidan aktiviteleri B halkasında bulunan katekol gruplarının, quinon ve semiquinonlar gibi indirgenme ürünlerinin kararlı yapısından ileri gelmektedir (Rice-Evans ve Miller 1996). Bunlar serbest radikalleri yakalayarak, hücre ve hücrelerdeki DNA, lipidler ve proteinleri oksidatif hasardan koruyarak meydana gelebilecek birçok metabolik aksaklıkların sonucunda oluşabilecek hastalıkların önlenmesini sağlamaktadır (Halliwell ve ark 1992, Bagchi ve ark 2000).

Proantosiyanidinlerin ateroskleroz oluşumundaki endotelyal hasarı, plak oluşumunu, damarlardaki daralmayı ve geçirgenliğindeki genişlemeyi önlediği bildirilmektedir (Hannum ve ark 2002, Kris-Etherton ve ark 2004). Proantosiyanidin içerikli gıdalarla beslenen farelerde iskemi reperfüzyon hasarına karşı kalbin daha dayanıklı ve kan akış parametrelerinin daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Sato ve ark

2002, Bagchi ve ark 2003). A tipi kızılcık proantosiyanidin oligomerlerinin LDL oksidasyonunu yavaşlattığı (Porter ve ark 2001), A tipi tarçın proantosiyanidinlerinin ise LDL seviyelerini anlamlı ölçüde düşürdüğü belirtilmiştir (Khan ve ark 2003). Benzer şekilde proantosiyanidin içeren kakao ve çikolata tüketiminin LDL oksidasyonunu azaltırken, serum HLDL seviyelerini artırdığı bildirilmektedir (Wan ve ark 2001). Üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstraktlarının hiperkolestolemik hastalarda okside olmuş LDL seviyelerini azalttığı (Bagchi ve ark 2003), yüksek kolesterollü bir beslenme diyeti uygulanan ratlarda da serum kolesterol seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Proantosiyanidin içeren kızılcık suyu tozunun genetiksel hiperkolesterolemik domuzlarda LDL kolesterol seviyelerini düşürdüğü ve HLDL seviyelerini artırdığı rapor edilmiştir (Reed 2002).

Proantosiyanidinler inflamasyona karşı etkinliğe sahiptirler. Kakao proantosiyanidinleri immun sistemi kuvvetlendirmektedir. Proantosiyanidinlerin interlökin 1-beta (IL-1ß) ve IL-4 üretimini ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) salınımını uyardığı, IL-5 ve IL-4 sentezini baskılayarak immun sisteme etki ettiği bildirilmiştir (Mao ve ark 2000a, Mao ve ark 2000b, Mao ve ark 2002).

Proantosiyanidinler proteinlere bağlanarak denatüre etmektedir. Proantosiyanidinlerin prolin ve diğer polimerlerle etkileşiminin oldukça güçlü olması bronzlaşma etkisini meydana getirmektedir. Hayvanlarda bu etkileri vücut yüzeylerinin deriye dönüştüğü bronzlaşma adı verilen protein denatürasyonudur (Salunkhe ve ark 1989).

Proantosiyanidinler, proteinleri büzme ve çökertme özelliğine de sahiptirler. Proantosiyanidin ve proantosiyanidin içeren gıdaların tüketimi ile tükrük ve sindirim enzimlerindeki prolince zengin aminoasitlere bağlanarak sindirim işlevlerini engellemektedir. Proantosiyanidinler bu şekilde etki ederek beslenmede alınan gıdaların sindirimini ve emilimini azaltmaktadırlar. Bunun dışında ruminantlarda ise şişkinliği azaltıcı etkileri vardır (Salunkhe ve ark 1989, Reed 1995, Waghorn ve McNabb 2003).

Proantosiyanidinler kan da pıhtı oluşumunu inhibe etmektedir (Putter ve ark 1999). Proantosiyanidin kaynağı olan siyah üzüm kabuğunun, çekirdek ekstraktının ve suyunun kanda pıhtı oluşumunu azaltığı rapor edilmiştir (Reed 2002,

Shanmuganayagam ve ark 2002). Proantosiyanidinlerce zengin kakao tüketiminin de benzer şekilde kanda pıhtı oluşumunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Murphy ve ark 2003). Proantosiyanidinlerin kanda pıhtı oluşumunu azaltması nedeniyle antikoagulantlarla birlikte alınmamaları tavsiye edilmektedir (Putter ve ark 1999).

Proantosiyanidinlerin enfeksiyonlara karşı koruyucu ve savunucu antiviral, antibakteriyel ve antifugal etkisi bulunmaktadır. Proantosiyanidin tip A'nın midede ülsere neden olan *Helicobacter pylori,* idrar yollarında yanmaya neden olan *Escheria coli* ve ağız içerisinde enfeksiyon oluşturan bakterilerin ilgili dokulardaki epitel hücrelere tutunmasını engelleyerek enfeksiyon oluşturmalarını önlediği rapor edilmiştir (Burger ve ark 2002, Howell 2002). Proantosiyanidinler herpes simpleks (HSV), insan bağışıklık yetmezlik virüsün (HIV) ve *rotavirüs*'e karşı da antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Barnard ve ark 1993, Özen 2012).

Bitki dokularında bulunan proantosiyanidin birimleri bitkileri korumayı ve savunmayı sağlamaktadır. Proantosiyanidinlerin alt birimleri olan epikateşinin varlığı bitkileri fungusitlere karşı korurken, kateşinin varlığı ise bitkileri zararlı bitkilere karşı korumaktadır. Bazı bitki dokularında bulunan bu kateşinlerin kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolunu ve aktif oksijen (O_3) üretimini başlatarak zararlı komşu bitki kök hücrelerinin ölümüne neden olduğu belirtilmiştir. Proantosiyanidinler bitkilerde demir ve diğer mineralleri bağlayarak bitkilerin bakteri, mantar ve insektlere karşı korunmasını sağlamaktadır (Scalbert 1991, Bais ve ark 2003).

Bunun dışında proantosiyanidinler bitkileri, mikroorganizmaları, mantar ve böcekleri ultraviyole ışınlardan korumaktadırlar. Proantosiyanidinlerin yukarıda sayılan faydaları onları doğal ilaç kaynakları olarak ön plana çıkarmaktadır (Scalbert 1991).

1.2. Prosiyanidinler

Prosiyanidinler, yoğun taninler olarakta adlandırılan birçok bitki türünde bulunan fenolik bileşiklerdir (Porter 1988, Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Prosiyanidinler epikateşin, kateşin ve O-gallatlar gibi bunların esterleşmiş türevlerinden meydana gelen oligomer ve polimer yapıda olan flavan-3-ols molekülleridir (Ricardo da Silva ve ark 1991, Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Bu

birimler flavan içi karbon bağları ile birbirlerine C4-C8 veya C4-C6 arasında bağlıdırlar (Haslam 1989).

Prosiyanidinler antosiyanidinlerin asidik ortamda ısının yükselmesi sonucu renklenmesidir. Bu nedenle prosiyanidinler bazı kaynaklarda proantosiyanidinler olarakta adlandırılmaktadır (Haslam 1989, Scalbert ve Williamson 2000).

Prosiyanidinler bitkisel kaynaklı yiyeceklerde yaygın olarak bulunmaktadır. Arpa, badem, çay, çilek, darı, elma, kakao, kırmızı şarap, üzüm, tarçın ve yer fıstığı gibi günlük beslenmede önemli yer tutan meyve, sebze ve yemiş gibi gıdaların kabuklarında, çaylarında ve çekirdeklerinde bulunmaktadırlar (Thompson ve ark 1972, Morimoto ve ark 1986, Chiavari ve ark 1987, Brieskorn ve Betz 1988, Haslam 1989, McMurrough ve Baert 1994, Packer ve ark 1999). Aynı ağırlıktaki çikolata, elma, kızılcık suyu ve şaraptaki prosiyanidin miktarları karşılaştırıldığında, elmanın en yüksek miktarda prosiyanidin içerdiği, bunu sırası ile çikolata, şarap ve kızılcık suyunun takip ettiği bildirilmektedir (Hammerstone ve Lazarus 2000).

Prosiyanidin miktarı aynı bitkilerin farklı çeşitleri arasında farklılık gösterebilmektedir (Sanoner ve ark 1999). Prosiyanidin miktarı bitkinin genetik varyasyonuna, yetiştiği coğrafi konuma ve hasat sonrası uygulamalara göre değişmektedir (Kim ve Keeney 1984, Clapperton ve ark 1992). Prosiyanidinler meyvelerin dış kısmında daha yoğun olarak bulunmakta ve meyve olgunlaştıkça miktarı azalmaktadır (Macheix ve ark 1990, Guyot ve ark 1998).

Doğada polimer derecesi yüksek olan prosiyanidinler bulunmaktadır. Laboratuvar çalışmalarında prosiyanidinlerin polimerizasyon derecesinin pentamere kadar olanlarının tanımlanabildiği bildirilmiştir. Prosiyanidin A tipleri dimerik bir yapıdadırlar. Flavanoidler arası C-C ve C-O arasında olmak üzere 2 bağ ile birbirlerine bağlıdırlar (Haslam 1989, Santos-Buelga ve Scalbert 2000) ve bu bağlar C4-C8 ve C2-C7 konumları arasında çift bağ ile bağlıdır (Kondo ve ark 2000). Prosiyanidin A tiplerinden aktif olanlar A1 ve A2 tipleridir. Prosiyanidinlerin A tipleri at kestanesi, kızılcık ve yer fıstığı gibi çeşitli meyvelerde bulunmaktadır (Haslam 1989, Lou ve ark 1999). B tipleri dimer yapıda olup flavanoid arası C-C tek bağ içerir. Bu bağ C4-C8 veya C4-C6 konumları arasında bulunmaktadır. (Santos-Buelga ve ark 1995). Prosiyanidinlerin tip B1'den B4'e kadar olan dimer yapıları

arasında oldukça az bir farklılık vardır (Carando ve ark 1999). Çikolata içerisinde prosiyanidinlerin tip B2 ve B5'in dimer yapıları yüksek miktarda bulunmaktadır. C tipi prosiyanidinler trimer yapıdadırlar (Anderson ve ark 1978, Santos-Buelga ve Scalbert 2000). Bazı prosiyanidinler ise gallik asitle esterlenmiş halde bulunurlar (Ricardo da Silva ve ark 1991, Prieur ve ark 1994, Labarbe ve ark 1999).

Prosiyanidinler çeşitli tekniklerle tanımlanabilmektedirler (Monagas ve ark 2003). Besinler içerisinden prosiyanidinlerin ayrımı ve analizi HPLC metodu ile yapılmaktadır (Hammerstone ve Lazarus 2000). Prosiyanidinlerin tanımlanmasında kütle spektrofotometresi (MS) tekniği kullanılmaktadır (Flamini 2003, Reed ve ark 2005). Arka arkaya gerçekleştirilen bu MS ile yapıları belirlenmekte ve yapılarındaki farklı moleküller tespit edilebilmektedir. Prosiyanidin polimerlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde ise elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği kullanılmaktadır. Bu hassas teknikler ile meyveler, tahıllar ve baharatlarda bulunan prosiyanidinler tam olarak belirlenebilmektedir (Gu ve ark 2003).

Prosiyanidinlerin antioksidan aktivitelerini flavanoidlerdeki halkalar ve polimerizasyon dereceleri gibi yapısal özellikler etkilemektedirler. Polimerizasyon dereceleri arttıkça antioksidan etkileri de artabilmektedir. Epikateşin ve epikateşin polimerleri, kateşin ve kateşin polimerlerine göre daha yüksek antioksidan etki göstermektedir (Hagerman ve ark 1998, Saint-Cricq de Gaulejac ve ark 1999). Prosiyanidinlerin antioksidan özellikleri reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen (N) yakalayıcıları olmalarından ileri gelmektedir (Ariga ve Hamano 1990, Arteel ve Sies 1999). Prosiyanidinlerin tipleri flavanol sınıfları içerisinde en yüksek antioksidan etkinliğe sahiptirler (Rice-Evans ve Miller 1996). Prosiyanidinlerin B tipi A tipine göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir (Ricardo da Silva ve ark 1991). Dimer yapıda olan prosiyanidin tip B2 monomer yapıda olan EGCG'ye göre serbest radikalleri yakalamada daha etkilidir (Quettier-Deleu ve ark 2000).

Üzüm kabuğunda prosiyanidinler, flavonoller, antosiyanidinler, lökosiyanidin, prodelfinidin, lökodelfinidin ve fenolik asitler bulunmaktadır (Peynaud ve Ribereau-Gayon 1971, Souquet ve ark 1996). Üzüm çekirdeği ise fenolik asitler, prosiyanidinleri meydana getiren kateşin ve epikateşin, prosiyanidin dimerleri, trimerleri ve polimerleri gibi fenolik bileşikleri içermektedir (Jayaprakasha

ve ark 2001). Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidinlerin yüksek antioksidan aktiviteleri vardır. Bu prosiyanidinler kılcal damar geçirgenliğini düzenlemekte, kılcal damarların kanserojen ve toksik maddelere karşı direncini artırmaktadır. Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidinler inflamatuvar baskılayıcı ve antioksidan etkileri ile kansere karşı koruma ve mücadelede de önemli bir yer tutmaktadırlar (Maffei ve ark 1998, Kondo ve ark 2000).

Üzüm çekirdeği prosiyanidinlerinin farelerde beyin ve karaciğer yağlanmasında A, C ve E vitaminlerine göre daha yüksek koruyucu antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Bagchi ve ark 1998). Prosiyanidinlerin ağız yoluyla alınmasının kan plazmasında antioksidan düzeyini artırdığı bildirilmiştir (Koga ve ark 1999).

Tarçın ekstraktında bulunan prosiyanidin tip A'nın glukoz metabolizmasında insülini artırdığı belirtilmektedir (Anderson ve ark 2004). Prosiyanidin tip A'nın insülin reseptöründeki fosfotirozin kinazı inhibe ettiği, insülin reseptör kinazı aktivite ettiği ve insülini taklit ederek etki gösterdiği bildirilmektedir (Imparl-Radosevich ve ark 1998).

Prosiyanidinlerin lipid peroksidasyonu üzerine etkili olduğu bildirilmektedir (Facino ve ark 1996). Prosiyanidin tip B1'in peroksit radikallerine karşı prosiyanidinin alt birimleri olan epikateşin ve kateşin ünitelerine göre 30 kat daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Hagerman ve ark 1998). Kakao ve üzüm çekirdeğinde bulunan prosiyanidinlerin ise LDL oksidasyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir (Pearson ve ark 2001).

Gallik asitle esterlenmiş prosiyanidinlerin esterlenmemiş yapılarına göre alerjiyi ve inflamasyonu daha iyi önlediği bildirilmektedir (Escribano-Bailon ve ark 1992).

Prosiyanidinler ve proantosiyanidinlerin *calivirüs*'ler, HIV, HSV, *norovirüs* ve *rotavirüs*lere karşı antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (De Bruyne ve ark 1999, Su ve ark 2010a, Su ve ark 2010b, Özen 2012).

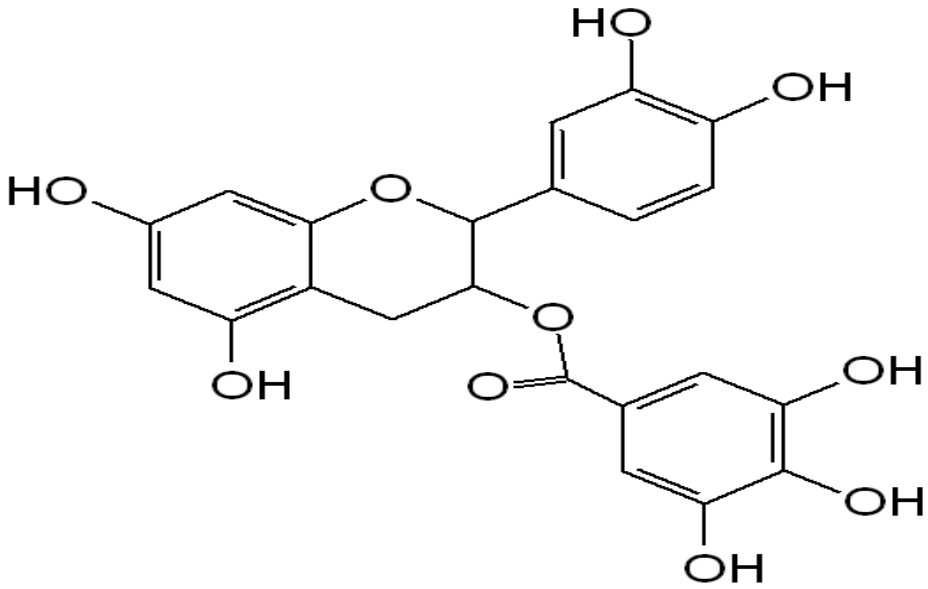
1.3. Epigallokateşin galat

İçecekler arasında çayın dünya üzerinde önemli bir yeri vardır. Çay bitkisi Theaceae familyasından olup bilinen yaygın türleri *Camellia sinensis* ve *Camellia*

assamica'dır. Geçmişte çay bitkisinin üretim yeri Çin'in güneyi olarak kabul edilirken, günümüzde ise birçok ülkede üretilmektedir. Çay bitkisi gördüğü işleme göre yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay olmak üzere üç çeşite ayrılmaktadır. Bu çay çeşitlerinin arasında en az işlemi yeşil çay görmekte olup, bunu sırası ile beyaz ve siyah çay takip etmektedir. Siyah çay dünya üzerinde oldukça geniş bir alanda tüketilirken, yeşil çay ise özellikle Asya ülkelerinde oldukça fazla tüketilmektedir (Balentine ve ark 1997, Reto ve ark 2007, Weinreb ve ark 2009).

Yeşil çayın siyah çaya göre kansere karşı koruyucu etkinliği daha fazladır. Bu etkisi yeşil çayın hazırlanış tekniğinin içindeki aktif bileşikleri bozmamasından ileri gelmektedir. Yeşil çay *Camellia sinensis* bitkisinin taze bir şekilde toplanan yaprakları içerisindeki enzimleri inaktif hale getirmek için hızlı bir şekilde kurutulması ile üretilir. Bu üretim şekli ile yeşil çayın içerisinde epikateşin ve epigallokateşin galat aktif olarak kalmaktadır. Siyah çay ise solmuş, rulo haline gelmiş ve ezilen yaprakların fermentasyona uğratılması sonucu üretilmektedir. Bu reaksiyon sonucu epikateşinler theaflavinlerine dönüştüğünden aktiviteleri azalmaktadır (Muhktar ve Ahmad 1999).

Çay bitkisinin yaprakları bir çeşit polifenol grubu olan kateşinlerce zengindir. Kateşinler çay bitkisi dışında kakao, karabuğday, kırmızı şarap ve şeftali gibi çeşitli gıdalarda da bulunmaktadır (Aucamp ve ark 1997, Peterson ve Dwyer 1998, Watanabe 1998, Weisburger 2001, Van Der Sluis ve ark 2002, Reto ve ark 2007). Çay bitkisinde bulunan kateşinler çay bitkisinin yapraklarında gün içerisindeki sıcaklığa göre sentezlenmektedirler ve birçok çeşidi vardır. Yeşil çayda bulunan kateşinler; epigallokateşin galat (EGCG), epigallokateşin (EGC), epikateşin (EP) ve epikateşin galat (ECG)'tır. Bunlar arasında EGCG çay kateşinleri arasında %80 oranında en fazla miktarda bulunan, etkinliği en güçlü ve en çok çalışılan bir bileşiktir (Yang ve ark 2002, Lambert ve Yang 2003, Reto ve ark 2007). Bir fincan yeşil çay yaklaşık 200 mg EGCG içermektedir (Mukhtar ve Ahmad 1999). Yeşil çay içiminden sonra ise tükrükteki EGCG seviyesi 48 µM civarındadır (Yang ve ark 1999).



Şekil 1.1. Epigallokateşin galat (EGCG)'ın moleküler yapısı (Weisburg ve ark 2004).

Çay kateşinleri antioksidan aktivitesi yönünden oldukça güçlüdürler. ECG ve EGCG çayda bulunan diğer kateşinlere göre daha etkili antioksidan aktiviteye sahiptirler (Guo ve ark 1996).

Yeşil çayın tüketiminin içerdiği ECG ve EGCG'den dolayı kalp damar hastalıkları, inflamasyon, sinir sistemi ve çeşitli kanser hastalıklarına iyi geldiği bildirilmektedir (Khan ve ark 2006, Clement 2009). Yeşil çayın insülin hassasiyetini artırması, kan basıncını düşürerek kalp damar hastalıklarına iyi gelmesi, hücrelerin büyümeleri ve çoğalmalarındaki biyokimyasal yollarda rol alması gibi birçok faydası bulunmaktadır (Potenza ve ark 2007, Wolfram 2007, Hsiesh ve Wu 2008, Wu ve ark 2009).

Yeşil çay ve yeşil çay kateşinlerinin kalp damar hastalıklarının önlenmesinde antioksidan özelliği ile önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir. LDL aterosikloroza neden olarak kalp damar hastalıklarını meydana getirmektedir (Ross 1999). Yeşil çay tüketen toplumlarda ise kanser ve kalp hastalıkları daha az görülmektedir (Lambert ve Yang 2003). Yeşil çay kateşinlerinin radikal yakalama ve hidrojen verme özellikleri sayesinde LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek kolesterol seviyelerini ve kan basıncını düşürdüğü bildirilmektedir (Kim ve ark 2011, Bogdanski ve ark 2012, Suzuki-Sugihara ve ark 2016). Hayvan deneyleri ve insanlar

üzerindeki çalışmalarda da yeşil çay tüketiminin plazmadaki kolesterol seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir (Muramatsu ve ark 1986, Imai ve Nakachi 1995).

Yeşil çayın içerdiği kateşinlerin akciğer, göğüs, kolon, özofagus ve prostat kanserlerine karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Arts 2008, Yuan 2011). Yeşil çaydaki kateşinler tümör baskılayıcı genleri aktivite ederek organizmayı kansere karşı korumaktadır (Papadimitrakopoulou ve ark 2001, Erker ve ark 2005).

Yeşil çay tüketimi Çin, Japonya ve Kore gibi Asya ülkelerinde oldukça fazladır. Bu ülkelerde kolon kanseri diğer ülkelere göre daha az görülmektedir (Mukhtar ve Ahmad 1999). Yang ve ark. (2007)'nın yaptıkları araştırmada 6 yıl boyunca yeşil çay tüketen orta yaş üstü Çinli bayanlarda kolon kanserine raslanmadığı bildirilmiştir.

Klinik çalışmalarda yeşil çayın prostat kanserinin ilerlemesine karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Johnson ve ark 2010). Japonya'da günde 5 bardaktan fazla yeşil çay tüketen orta yaş üstü erkeklerde prostat kanseri riskinin düştüğü tespit edilmiştir (Kurahashi ve ark 2008).

Epigallokateşin galat yeşil çayda bulunan en güçlü antioksidandır (Lambert ve Elias 2010). EGCG'nin antioksidan etkisi kanser hücrelerinin büyümesini ve kanser genlerini baskılayarak kansere karşı koruduğu bildirilmektedir (Valcic ve ark 1996, Mukhtar ve Ahmad 1999, Weisburger 1999). Hayvanlar ve insanlar üzerindeki çalışmalarda EGCG'nin kansere karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Higdon ve Frei 2003, Ioannides ve Yoxall 2003). EGCG'nin kansere karşı koruyucu etkisi ilk olarak Yoshizawa ve ark. (1987)'nın fare ciltleri üzerinde yaptıkları çalışmada teleosidin kaynaklı tümör promosyonunu inhibe etmesi ile anlaşılmıştır. Sonraki çalışmalarda farelerdeki ağız, akciğer, cilt, kolon, özofagus ve prostat kanserlerinde de EGCG'nin koruyucu ve tedavi edici etkisi rapor edilmiştir (Schramm 2013). EGCG'nin prostat kanseri hücrelerinde androjen, göğüs kanseri hücrelerinde ise östrojen reseptörünün biyolojik işleyişlerini düzenlediği bildirilmektedir (Belguise ve ark 2007, Ren ve ark 2000, Lee ve ark 2012).

Epigallokateşin galat'ın tükrük salgı hücrelerini kemoterapi ilacının ve radyasyon tedavisinin oluşturduğu hasarlara karşı koruduğu rapor edilmiştir. EGCG'nin OSC-2 ağız skuamöz karsinoma hücrelerini gama ışınının ve

kematerapötik ilacın (CDDP cis-plantinum II diammine dichloride) DNA sentezini baskılamasına karşı koruduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark 2004).

Yeşil çay tüketimi ve EGCG ağız sağlığı için de oldukça önemli yer tutmaktadır. EGCG bakterilerin ağız içinde tutunmalarını ve asit oluşumunu önlemekte ve ağız içi peroksidaz aktivitesini artırmaktadır. Bu şekilde bir koruma sağlayarak diş çürümelerini ve diş kayıplarını önlediği bildirilmektedir (Kato ve ark 2009, Kushiyama ve ark 2009).

1.4. Kannabidiol

Bilimsel ismi kannabis olan marihuana birçok kültürde (*Cannabis sativa L.*) yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Fankhauster 2002). Marihuananın tıbbi kullanımı milattan önceye dayanmaktadır (Mikuriya 1969). Kannabis geçmişten beri ilaç olarak antiemetik, yüksek göz tansiyonu ve ağrıları azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Avrupa'da 19. yüzyılın sonuna kadar ağrıların, spazmların, astım, uykusuzluk, depresyon ve iştahsızlığın tedavi edilmesinde kullanılmıştır (Gaoni ve Mechoulam 1971).

Kannabis ekstraktı analjezik, antiemetik, antiinflamatuar, antispastik ve psikolojik birçok rahatsızlıkta terapötik olarak kullanılmaktadır. Kannabisler karın ağrılarında, kusma, motilite bozukluklarında, enfeksiyon ve inflamasyon gibi sindirim sisteminde görülen rahatsızlıkların tedavisinde kullanılabilmektedir (Izzo ve Sharkey 2010). Kannabis eksraktının multiple skleroz (MS) hastalarındaki spazm sıklığını önemli ölçüde azalttığı ve uyku kalitesini artırdığı (Novotna ve ark 2011), hayvanlarda kolit semptomlarını hafiflettiği (Massa ve ark 2004, Izzo ve Sharkey 2010) ve irritabıl bağırsak semptomlu hastalarda karın ağrılarını durdurduğu ve semptomları azalttığı bildirilmektedir (Lal ve ark 2011).

Kannabis tüketimi psikolojik rahatsızlıkları olan bireylerde şizofreniyi tetikleyebilmektedir (Moore ve ark 2007). Tüketiminin ani kesilmesinden sonra baş dönmesi, iştah kaybı, uykusuzluk ve terleme ortaya çıkmakta, hafızada ve bilinçsel faaliyetlerde ise kısa süreli kayıplar yaşandığı bildirilmektedir (Vandrey ve ark 2008).

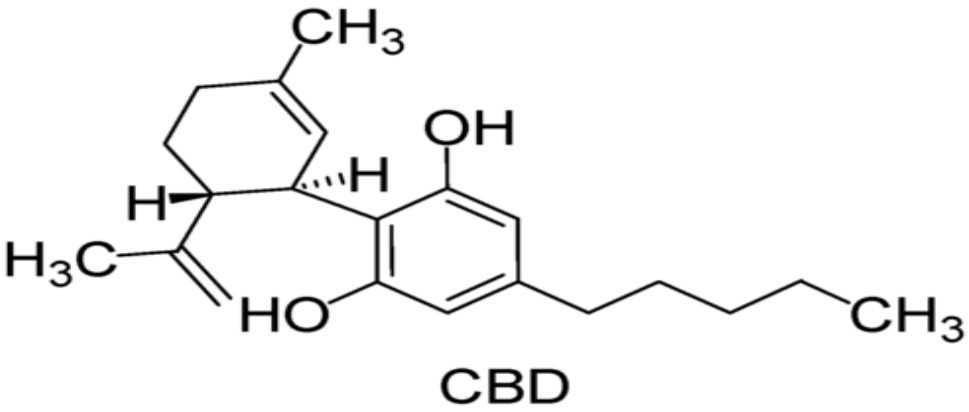
Marihuana kannabinoidler olarak isimlendirilen 80 civarı bileşikten meydana gelmektedir (Mechoulam ve ark 1970, Turner ve ark 1980). Kannabinoidlerin doğal

formları kannabidiol (CBD), tetrahidrokannabinol (THC), kannabinol ve kannabikromin'dir (Turner ve Elsohly 1981, Russo 2011). CBD marihuananın yarısına yakınını meydana getiren başlıca bileşenidir (Mechoulam ve Shvo 1963).

Kannabinoidlerin fibromiyaji, kanser ve MS ağrılarının azaltılmasında etkili olduğu rapor edilmiştir (Noyes ve ark 1975, Pinsger ve ark 2006, Ostenfeld ve ark 2011). İştah ve kilo kaybına neden olan alzheimer, HIV ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde kannabinoid kullanımının kilo kaybını önlediği bildirilmektedir (Struwe ve ark 1993, Volicer ve ark 1997, Jatoi ve ark 2002). Ayrıca kannabinoidlerin kanser ilaçlarının neden olduğu mide bulantısı ve kusmaya karşı standart antiemetiklere göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (Artim ve DiBella 1983).

Kannabis ve kannabinoid birbirlerine benzer yan etkiler göstermektedir (Grotenhermen 2005). Kannabinoidlerde görülen yan etkiler yorgunluk, baş dönmesi, taşikardi, tansiyon düşüklüğü, ağız kuruluğu, iştah artışı ve siroz olarak sayılabilir. Terapötik olarak kullanılmayan yüksek dozlarının tüketiminin geri döndürülemeyen bilinçsel bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (Bolla ve ark 2002, Grant ve ark 2003). Kannobinoidlerin kullanımını takiben ilk zamanlarda görülen yorgunluk, baş dönmesi, kardiyovasküler ve psikolojik etkilere karşı zamanla tolerans gelişebilmektedir (Hirvonen ve ark 2012).

Kannabidiol birçok rahatsızlığın tedavisinde yararlanılan *Cannabis sativa* bitkisinden elde edilen bir kannabinoid olup (Izzo ve Camilleri 2009), 1940'lı yıllarda marihuanadan izole edilmiş ve 1963 yıllında kimyasal yapısı tanımlanmıştır (Adams ve ark 1940, Mechoulam ve Shvo 1963, Mechoulam ve ark 1970). CBD'nin marihuanada bulunma miktarı fenotipine, yetişme ortamına ve analiz metoduna göre değişmektedir (Potter ve ark 2008, Mehmedic ve ark 2010). CBD, kannabis bitkisinin (haşhaş) tohumlarından saflaştırma ile elde edilmekte ve genel olarak gaz kromotografisi kullanılmaktadır (Gaoni ve Mechoulam 1971).



Şekil 1.2. Kannabidiol (CBD)'ün moleküler yapısı (Borges ve ark 2013)

Kannabidiol'ün beyinde CB1 ve periferal de CB2 olmak üzere iki tane reseptörü vardır (Devane ve ark 1988, Munro ve ark 1993). CBD bu reseptörlerine karşı düşük affiniteye sahiptir (Pertwee 2008). CB1 reseptörü merkezi ve çevresel sinir sisteminde, CB2 reseptörü ise immün sistemde makrofaj, lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerde bulunmaktadır (Pacher ve ark 2006, Pertwee 2006).

Kannabidiol'ün sinir hücrelerini koruduğu ve inflamasyona iyi geldiği (Mehmedic ve ark 2010), merkezi sinir sisteminde de antioksidan, inflamatuvar ve antiapoptik etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Iuvone ve ark 2009). CBD'nin sinir sisteminde sakinleştirici etkiye de sahip olduğu belirtilmiştir. Özellikle alzheimer, anksiyete, epilepsi, psikoz gibi sinir sistemi ve inflamasyon hastalıklarının tedavilerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Cunha ve ark 1980, Hampson ve ark 1998, Zuardi ve ark 2006). CBD'nin sindirim sisteminde bağırsak çalışmalarını düzenleyerek irritabıl bağırsak sendromunda kullanılabildiği de bildirilmektedir (Izzo ve Coutts 2005, Lahat ve ark 2012). Hayvanlar üzerindeki çalışmalarda CBD'nin sindirim sistemindeki motor aktiviteleri düzenlediği rapor edilmiştir (Lin ve ark 2011). Kolit oluşturulan farelerde bağırsak inflamasyonunu durdurmada oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Schicho ve Storr 2012).

Kannabidiol kullanımının bilişsel faaliyetlere, kalp atış hızına, kan basıncına ve vücut sıcaklığına olumsuz bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Bergamaschi ve ark 2011). Ayrıca bilinçsel performansa ve hafızaya da yan etkisinin olmadığı, epilepsi ve psikoz gibi sinir sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde diğer ilaçlara göre

daha hafif yan etkisinin bulunduğu bildirilmektedir (Heyser ve ark 1993, Iffland ve Grotenhermen 2017).

Kannabidiol'ün diğer kannabinoidlerle birlikte kullanımı etkili sonuçlar vermektedir. Ratlarda kolit durumlarında CBD ve THC'nin kombine kullanımının daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Jamontt ve ark 2012). İnsanlarda MS hastalığının ağrılı durumlarının tedavisinde CBD'nin THC ile birlikte kullanılabileceği bildirilmektedir (Russo ve ark 2007). Fakat CBD ve THC'nin beraber kullanımında CBD karaciğerdeki ilaç metabolizmasında inhibitör etki yaparak beyinde THC konsantrasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Jones ve Pertwee 1972, Bornhein ve ark 1981, Zuardi ve ark 2011).

Kannabidiol anti-mikrobiyal özelliğe de sahiptir. Metisiline dirençli olan *Staphylococcus aureus* ile mücadelede etkili olduğu bildirilmiştir (Appendino ve ark 2008).

Kannabidiol kozmetik ürünlerinde, ciltteki sebum üretimini azaltması ve C ve E vitaminlerine göre daha güçlü bir antioksidan olması nedeni ile tercih edilmektedir (Hampson ve ark 1998, Olah ve ark 2014).

Kannabidiol'ün potansiyel bir Covid-19 tedavi etkeni olabileceği bildirilmektedir. Salles ve ark (2020) CBD'nin akciğer dokularına uygulanmasıyla akciğerlerde iltihabı azaltan doğal bir peptid olan Apelin'in 20 kat arttığını, akut solunum sıkıntısı sendromunda oksijen seviyelerinde iyileşme, iltihaplanma ve fiziksel akciğer hasarını azaltmada oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkiler içerisindeki bileşenler hastalıkların tedavi edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar bitkiler içerisinde bulunan proantosiyanidin, prosiyanidin, EGCG ve CBD gibi bileşenlerin metabolik hastalıklara, kalp ve damar hastalıklarına ve kansere karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Cadenas ve Packer 1996, Scalbert ve Williamson 2000, Yang ve ark 2002, Houdo ve ark 2006). Bunlar birçok eczane ve besin desteği satan mağazalardan kapsül, tablet veya damla formunda kolaylıkla temin edilmektedirler. Fakat fazla miktarda alımının *in vitro ve in vivo* ortamlarda hücrelere etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Sunulan araştırmada kızılcık proantosiyanidin tip A, prosiyanidin tip B1, EGCG ve CBD'nin yüksek konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerine uygulanmasının inkübasyon süresi arttıkça sitotoksik etki oluşturacağı ve morfolojilerinde değişim meydana getireceği hipotezi düşünülmektedir.

Mevcut çalışma, kızılcık proantosiyanidin tip A, prosiyanidin tip B1, EGCG ve CBD'nin değişen konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerine uygulamasının 3 ve 7 gün süre inkübe edilmesinin hücre canlılığına etkisini ve hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikleri gözlemlemek amacıyla yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve St. Francis College Department of Biology and Health Promotions (New York/USA) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1. Gereç

2.1.1. Hücre Kültürü

Araştırmada çalışılan insan kolon kanser hücresi (Homo sapiens colon colorectal adenocarcinoma HT-29, ATCC- 38TM) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) (Bethesda, MD) temin edilmiştir.

Hücrelerin çoğaltılmasında kullanılmak üzere hazırlanan vasat karışımı için Fetal Bovine Serum (FBS- Origin USA, filtreted heat activated), L-glutamin, amphotericin B, streptomycin, penisilin ve Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmalarından temin edilmiştir. Hücrelerin kaldırılmasında kullanılan PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ve tripsin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmalarından temin edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması ise 37°C'de %5 CO_2'li etüvde içerisinde gerçekleştirilmiştir.

2.1.2. Bitkisel Ekstraklar

Çalışmada, kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1, EGCG ve CBD aşağıda belirtilen firmalardan temin edilerek HT-29 hücrelerinde sitotoksisiteleri çalışılmıştır. Kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG PBS ile çözülebilir olarak temin edilmiştir. Bu ekstraktların hazırlanmasında ve değişen konsantrasyonlarının seyreltilmesinde PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) kullanılmıştır. CBD ise metanol içerisinde çözünmüş olarak temin edilmiştir. Değişen konsantrasyonlarının seyreltilmesinde PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) kullanılmıştır.

Kızılcık proantosiyanidini tip A

CystiCran-40 kızılcık proantosiyanidini tip A Naturex-dbs llc (Sagamore, MA, USA) firmasından temin edilmiştir.

Prosiyanidin tip B1

Üzümden elde edilen prosiyanidin tip B1 dooQ Bioscience (Irvine, CA, USA) firmasından temin edilmiştir.

Epigallokateşin galat

Yeşil çaydan elde edilen EGCG Cayman Chemical Co. (Ann Arbor MI, USA) firmasından temin edilmiştir.

Kannabidiol

Marihuana'dan elde edilen CBD Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Sitotoksisite Testi

Bitkisel ekstraktların değişen konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. ve 7. günlerdeki sitotoksisitelerinin ölçülmesinde Toxilight® Non-Destructive Cytotoxicity Bioassay kiti (Cat. No. LT37-619; Lonza, Rockville, MD) kullanılmıştır. Değerler Modulus luminometer (Model #9200-003, Turner Biosystems/Promega Corp., Sunnyvale, CA) cihazında analiz edilmiştir.

2.1.4. Hücre Morfolojisinin Mikroskobik Olarak Gözlenmesi

Hücre kültürünün kontrol edilmesinde ve sitotoksisite çalışmasında bitkisel ekstraktların değişen konsantrasyonlarının 96 gözlü pleytlerdeki 3. ve 7. günlerdeki inkübasyonlarının hücreler üzerindeki morfolojik etkileri Olympus Phase Contrast Invert (ULWCD 0.30) mikroskobunda gözlemlenmiştir.

2.1.5. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada her bir deney 3 kez yapılarak ortalamaları hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin istatiksel olarak değerlendirilmesinde *Student's t* testi kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Sunulan araştırma St. Francis College (NY, USA) Department of Biology &Health Promotion laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

İnsan kolon kanser hücrelerinin (HT-29) üretilmesi için temin edilen firmanın belirttiği prosedüre uygun olarak hücre üretme vasatı hazırlanmıştır. Vasat 100

ml'sinde %20 oranında FBS, %1 oranlarında L-glutamin ve amphotericin B, 100 µl/ml streptomycin ve 100 IU penisilin bulunan EMEM içerisinde hazırlanmıştır. İlgili firmadan temin edilen HT-29 hücreleri steril şartlar altında firma tarafından bildirilen prosedüre uygun olarak içerisinde 7 ml hücre üretme vasatı bulunan T25 flasklara aktarılmıştır. Daha sonra flasklar %5 CO_2'li etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılarak monolayer olarak çoğaltılması sağlanmıştır.

Hücreler bu şekilde T25 flasklarda çoğaltıldıktan sonra bitkisel ekstraktların sitotoksisitelerinin çalışılması için 96 gözlü mikropleytlere aktarılmıştır. Bunun için yüzeyi monolayer kaplamış şekilde çoğalan hücre T25 flasklardan biri seçilerek hücreleri kaldırmak için 1 ml PBS ile hücre yüzeyi yıkanarak aspire edilmiştir. Daha sonra içerisine 1 ml tripsin ilave edilerek hücre bu şekilde 37°C'de %5 CO_2 etüvde 10-15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda kaldırılan hücreler, 1 pleyt içerisinde hücre sayısı 10^5 olacak şekilde aktarımı gerçekleştirilmiştir. Pleytin her bir gözüne hücre ve hücre üretme vasatı karışımı 200 µl bırakılarak hücreler 37°C'de %5 CO_2 etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda pleytlerde monolayer olarak çoğalan tüm gözlerdeki hücreler invert mikroskobu ile incelenmiştir. Daha sonra bitkisel ekstraktların sitotoksisitesi çalışılmak üzere bu ekstraktların hazırlanmasına geçilmiştir. Çalışma 4 aşamaya ayılarak her bir aşamada 1 bitki ekstraktının sitotoksitesi çalışılmıştır.

2.2.2. Bitkisel Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmanın 4 aşamasında her bir bitki ekstraktı ayrı olarak hazırlanmıştır. Kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin ekstrakları PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile çözülebildiğinden PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) içerisinde hazırlanmış, değişen konsantrasyonlarıda PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilmiştir. CBD metanol içerisinde çözünmüş olarak ilgili firmadan temin edilmiştir. Değişen konsantrasyonları ise PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Kızılcık Proantosiyanidini Tip A'nın Hazırlanması

Kızılcık proantosiyanidini tip A ekstraktı hassas terazide 0.1 g tartılarak üzerine 1 ml PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ilave edilerek steril şartlarda vortex ile muamele edilmiştir. Daha sonra PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilerek küçük steril ependorf tüpler içerisinde 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Prosiyanidin Tip B1 Hazırlanması

On miligram prosiyanidin tip B1 üzerine 1 ml PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) bırakılarak steril şartlarda vortex ile muamele edilmiştir. Daha sonra PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilerek küçük steril ependorf tüpler içerisine 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Epigallokateşin galat'ın Hazırlanması

Elli miligram EGCG üzerine 1 ml PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) bırakılarak steril şartlarda vortex ile muamele edilmiştir. Daha sonra PBS ile seyreltilerek küçük steril ependorf tüpler içerisine 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Kannabidiol'ün Hazırlanması

Bir mililitre metanol içerisinde çözünmüş olarak bulunan 1000 µg CBD PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilerek 1, 2, 8, 16, 31, 63, 125, 250 ve 500 µg/ml şeklinde konsantrasyonları hazırlanmıştır. CBD'nin hazırlanan bu konsantrasyonları PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile seyreltilirken içerisinde %0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 12.5, 25 ve 50 oranlarında metanol içerdiğinden CBD'nin metanolden bağımsız etkisini belirleyebilmek için aynı oranlarda metanol kontrol grubu olarak çalışılmıştır. Metanol kontrol grubu CBD ile aynı oranda metanol içerecek şekilde PBS (w/o Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile %0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 12.5, 25 ve 50 oranlarında seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.3. Sitotoksisite Testi

Hücre toksisite testleri araştırıcılar tarafından hücre canlılığını ve uygulanan maddelerin sitotoksik etkisini tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Sunulan çalışmada bu test sisteminin uygulanan bitkisel ekstraktların hücrelerin bütünlüğünü bozması ve plasma membranında hasar oluşması sonucu hücre üreme ortamına sızan adenilat kinaz'ın biyolüminesan ölçümü prensibine dayanmaktadır. Mevcut araştırmada, ticari olarak temin edilen Lonza kiti ile değişen konsantrasyonlardaki bitkisel ekstraktların hücre canlılığına ve sitotoksisitesine etkisini ölçmek için çalışılmıştır. Sitotoksisite araştırmalarında araştırılan maddelerin hücre canlılığına ve toksisitesine etkisi değişen zaman aralıklarında çalışılmaktadır. Sunulan araştırmada çalışılan bitkisel ekstraktların hücrelerde inkübasyonu 3. ve 7. günde değerlendirilmiştir.

Doksan altı gözlü pleytlerde monolayer olarak çoğaltılan hücrelerin vasatı 100 ml'sinde %2 oranında FBS ve %1 oranlarında L-glutamin ve amphotericin B, 100 µl/ml streptomycin ve 100 IU penisilin içeren EMEM hücre vasatı ile değiştirilerek üzerlerine bitkisel ekstraktların hazırlanan konsantrasyonlarından 25'er µl konulmuştur. Çalışma kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları ve PBS içeren PBS hücre kontrol gruplarından oluşmaktadır. CBD için ise 1, 2, 8, 16, 31, 63, 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonları hazırlanırken, CBD ile aynı oranda %0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 12.5, 25 ve 50 metanol içeren metanol kontrol grupları ve hücre kontrol grupları oluşturulmuştur. Hazırlanan ekstraktlar 3. ve 7. gün sürede sitotoksisiteleri incelenmek üzere 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.4. Hücre Morfolojisinin Mikroskobik Gözlenmesi

Bitkisel ekstraktların değişen konsantrasyonlarının 96 gözlü pleytlerde üretilen HT-29 hücrelerine 3. ve 7. gündeki inkübasyonları sonunda hücreler üzerindeki morfolojik etkileri Olympus Phase Contrast Invert (ULWCD 0.30) mikroskobunda x10 ve x20 gözlemlenmiştir. Gözlem sonuçları not alınarak değerlerin ölçülmesi geçilmiştir.

2.2.5. Değerlerin Analizi

Bitkisel ekstraktların değişen konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. ve 7. gün inkübasyonları sonunda sitotoksisitelerinin ölçümü kit içerisinde belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bitkisel ekstraktların uygulanan konsantrasyonları ve kontrol grupları pleytlerinden 20 µl alınarak cihaz için özel olarak üretilmiş mikrotüplere konuldu, üzerlerine 100 µl adenylate kinase ilave edildi. Beş dakika bekleme süresinden sonra sitotoksisiteleri yönünden değerlendirilmek üzere Modulus luminometer cihazında analiz edilmiştir.

Çalışmada uygulanan bitki ekstraktlarının sitotoksisite testinin ölçülmesi aşamasında hücre kaybı oranının belirlenebilmesinde gerekli olan tüm hücrelerin canlılığını kaybederek hücre kaybının %100 olduğu pozitif kontrol grubu hazırlanmıştır. Pozitif kontroller için pleytlerdeki bitki ekstraktlarının uygulanmadığı hücre kontrol gözleri kullanılmıştır. Bu pleytler içerisinden hücre üreme ortamı alınarak dışarı bırakıldı. Pleyt üzerine sırası ile kit içerisinde bulunan 50 µl lysis reagent ve 50 µl tris acetate buffer solüsyonu konuldu, 10 dk bekleme süresinden sonra üzerlerine 100 µl adenylate kinase konularak 5 dakika sonunda pleyt içerisinden 120 µl alınarak cihaz için özel olarak üretilmiş mikrotüplere konuldu. Değerler Modulus luminometer cihazında analiz edilmiştir.

2.2.6. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada her bir deney 3 kez yapılmıştır. Sitotoksisite değerleri okunan çalışmaların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Sunulan çalışmada lysis hücre kontrol grubunda hücre kaybı oranı %100'dür. Bitkisel ekstraktların uygulanan konsantrasyonları ve kontrol gruplarında 3. ve 7. gün inkübasyonlarında meydana gelen hücre kaybı lysis hücre kontrol grubu değerine bölünerek % olarak hesaplanmıştır.

Kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin uygulanan konsantrasyonlardaki hücre kaybı oranı PBS hücre kontrol grubunun üzerinde olanlar, CBD'nin uygulanan konsantrasyonları ve CBD ile aynı oranda metanol içeren metanol kontrol grubu oranlarındaki hücre kaybı oranı ise hücre kontrol grubunun üzerinde olanlar istatistiksel değerlendirmeye alınarak elde edilen

sonuçların aralarındaki farkın önemli olup olmadıkları *Student's t* testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P<0.05$ istatiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Sitotoksisite Test Sonucu

3.1.1. Kızılcık Proantosiyanidini Tip A

Kızılcık proantosiyanidini tip A'nın 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonlarının HT-29 hücre kültüründe 3. gün (Tablo 3.1.) ve 7. gün (Tablo 3.2.) inkübasyonlarından sonra sitotoksisite testi uygulanarak değerler luminometre cihazında ölçülmüştür.

Tablo 3.1. Kızılcık proantosiyanidini tip A konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	1968	1992	2866	**2275**	**6.7^{ns}**
50	1683	1550	1609	**1614**	**4.7**
100	1351	2330	2146	**1942**	**5.7**
800	1023	1061	766	**950**	**2.8**
1000	945	989	984	**973**	**2.9**
2000	595	634	662	**630**	**1.8**
4000	463	461	417	**447**	**1.3**
10000	333	319	-	**326**	**0.9**
PBS Hücre Kontrol	2299	1895	2494	**2229**	**6.6**
Lysis PBS Hücre Kontrol	31126	33747	36353	**33742**	**100**

ns: non-significant (istatistiki olarak önemsiz)

Kızılcık proantosiyanidin tip A'nın 3. günde 25 µg/ml konsantrasyonunun hücre kaybı oranı PBS hücre kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Üçüncü günde kızılcık proantisiyanidin tip A'nın 25 µg/ml konsantrasyonunda %6.7 oranında hücre kaybı meydana gelmiştir. Bu hücre kaybı oranı PBS hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranı ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonucun istatistiki açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p_{25\ \mu g/ml}=0.9001$; $p>0.05$) (Tablo 3.1.).

Tablo 3.2. Kızılcık proantosiyanidini tip A konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 7. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1. göz**	**2. göz**	**3. göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	8611	13297	12481	**11463**	**27.5***
50	8229	6341	6126	**6899**	**16.6***
100	5263	5327	5276	**5289**	**12.7***
800	4413	3948	1184	**3182**	**7.6**
1000	4993	3275	4189	**4152**	**9.9**
2000	3482	3186	3078	**3249**	**7.8**
4000	2290	1274	2280	**1948**	**4.6**
10000	1955	2122	2059	**2045**	**4.9**
PBS Hücre Kontrol	4269	4579	4429	**4426**	**10.6**
Lysis PBS Hücre Kontrol	37642	44540	42434	**41539**	**100**

***: p<0.05**

Proantosiyanidin tip A'nın 7. gün inkübasyonunda 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml'sinin hücre kaybı oranları PBS hücre kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücre kaybı oranları kızılcık proantosiyanidin tip A'nın 25 µg/ml'sinde %27.5, 50 µg/ml'sinde %16.6 ve 100 µg/ml'sinde %12.7 oranında meydana gelmiştir. Bu hücre kaybı oranları PBS hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranı ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonuçların istatistiki açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (p25 µg/ml=0.0083; p<0.05, p50µg/ml=0.0214; p<0.05, p100 µg/ml =0.0007; p<0.05) (Tablo 3.2.).

3.1.2. Prosiyanidin Tip B1

Prosiyanidin tip B1'in 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonlarının HT-29 hücre kültüründe 3. gün (Tablo 3.3.) ve 7. gün (Tablo 3.4.) inkübasyonlarından sonra sitotoksisite testi uygulanarak değerler luminometre cihazında ölçülmüştür.

Tablo 3.3. Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	1286	1280	1335	**1300**	**3.1**
50	919	1155	1278	**1117**	**2.7**
100	1036	1147	755	**979**	**2.3**
800	458	441	347	**415**	**1**
1000	552	1151	520	**741**	**1.8**
2000	416	361	274	**350**	**0.8**
4000	399	452	358	**403**	**0.9**
10000	112	137	168	**139**	**0.3**
PBS Hücre Kontrol	1198	1374	1663	**1412**	**3.4**
Lysis PBS Hücre Kontrol	41145	40139	41734	**41006**	**100**

Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının inkübasyonunun 3. gününde hücre kaybı oranları PBS kontrol grubunun hücre kaybı oranın altında olması sonucu uygulanan konsantrasyonların hücre kaybı meydana getirmediğini göstermektedir (Tablo 3.3).

Tablo 3.4. Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 7. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1.göz**	**2.göz**	**3. göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	2051	2047	1990	**2029**	**6.9**
50	1137	1044	860	**1014**	**3.4**
100	1225	892	1328	**1148**	**3.9**
800	288	270	241	**266**	**0.9**
1000	347	265	267	**293**	**1**
2000	242	212	201	**218**	**0.7**
4000	147	127	131	**135**	**0.4**
10000	57	56	63	**59**	**0.2**
PBS Hücre Kontrol	1882	2481	2369	**2244**	**7.6**
Lysis PBS Hücre Kontrol	37873	17490	32691	**29351**	**100**

Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının uygulamasının 7. gününde meydana gelen hücre kaybı oranı PBS hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranının altında olması sonucu uygulanan konsantrasyonların hücre kaybı meydana getirmediğini göstermektedir (Tablo 3.4).

3.1.3. Epigallokateşin galat

Epigallokateşin galat'ın 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonlarının HT-29 hücre kültüründe 3. gün (Tablo 3.5.) ve 7. gün (Tablo 3.6.) inkübasyonlarından sonra sitotoksisite testi uygulanarak değerler luminometre cihazında ölçülmüştür.

Tablo 3.5. Epigallokateşin galat (EGCG) konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	2500	2751	3332	**2861**	**8**
50	2782	2423	2507	**2571**	**7.2**
100	2190	2090	2166	**2149**	**6**
800	983	1047	1045	**1025**	**2.8**
1000	1123	1256	1266	**1215**	**3.4**
2000	1501	1325	1228	**1351**	**3.8**
4000	807	867	642	**772**	**2.1**
10000	70	68	63	**67**	**0.1**
PBS Kontrol	3663	3174	2878	**3238**	**9.1**
Lysis PBS Kontrol	35850	35878	34489	**35406**	**100**

Epigallakateşin galat konsantrasyonlarının uygulamasının 3. gününde hücre kaybı oranları PBS hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranının altında olması belirtilen konsantrasyonlarda PBS hücre kontrol grubuna göre hücre kaybı meydana getirmediğini göstermektedir (Tablo 3.5).

Tablo 3.6. Epigallokateşin galat (EGCG) konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 7. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
25	3212	3364	3591	**3389**	**7.1**
50	1678	1541	1627	**1615**	**3.4**
100	1563	1593	1794	**1650**	**3.5**
800	973	909	1063	**982**	**2**
1000	743	654	818	**738**	**1.5**
2000	758	1020	907	**895**	**1.8**
4000	791	628	678	**699**	**1.4**
10000	58	82	62	**67**	**0.1**
PBS Kontrol	5800	3654	5459	**4971**	**10.5**
Lysis PBS Kontrol	43425	49249	49211	**47295**	**100**

Epigallakateşin galat konsantrasyonlarının uygulamasının 7. gününde hücre kaybı oranları PBS hücre kontrol grubunun altında olması belirtilen konsantrasyonlarda PBS hücre kontrol grubuna göre hücre kaybı meydana getirmediğini göstermektedir (Tablo 3.6).

3.1.4. Kannabidiol

Kannabidiol'ün 1, 2, 8, 16, 31, 63, 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonları (metanol oranları % 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 12.5, 25 ve 50) ve metanol kontrol grubunun, metanol % 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.3, 12.5, 25 ve 50 oranlarının HT-29 hücre kültüründe 3. ve 7. gün inkübasyonlarından sonra sitotoksisite testi uygulanarak değerler luminometre cihazında ölçülmüştür. CBD'nin ve metanol kontrol grubunun sitotoksisite testi sonuçları Tablo 3.7, Tablo 3.8, Tablo 3.9 ve Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.7. Kannabidiol (CBD) konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml (MethanolOranı%)	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
1 (%0.1)	6670	4348	5591	**5536**	**13.3**
2 (%0.2)	4979	4890	4285	**4718**	**11.3**
4 (%0.4)	4175	3445	4114	**3911**	**9.4**
8 (%0.8)	7486	7098	6761	**7115**	**17.1**
16 (%1.6)	7651	7245	6727	**7208**	**17.3**
63 (%6.3)	5015	7282	8304	**6867**	**16.5**
125 (%12.5)	19980	23392	16891	**20088**	**48.4***
250 (%25)	18956	21371	22763	**21030**	**50.7***
500 (%50)	19813	24522	23928	**22764**	**54.9***
Hücre Kontrol	9869	5435	8203	**7836**	**18.9**
Lysis Hücre Kontrol	41765	42101	40508	**41458**	**100**

***: p<0.05**

Kannabidiol'ün 3. gündeki 125 µg/ml, 250 µg/ml ve 500 µg/ml konsantrasyonlarının hücre kaybı oranı hücre kontrol grubunun üstünde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7). CBD'nin 3. gündeki hücre kaybı oranları 125 µg/ml'sinde %48.4, 250 µg/ml'sinde %50.7 ve 500 µg/ml'sinde %54.9 oranında meydana gelmiştir. Bu oranlar hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranı ile istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde sonuçların istatistiki açıdan oldukça önemli olduğu tespit edilmiştir (p125 µg/ml=0.0058; p<0.05, p250 µg/ml=0.0015; p<0.05 ve p500 µg/ml= 0.0016; p<0.05).

Tablo 3.8. Metanol oranlarının HT-29 hücrelerinde 3. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Metanol Oranı %	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
%0.1	4122	5086	5166	**4791**	**11.5**
%0.2	5027	4814	4805	**4882**	**11.7**
%0.4	5154	5791	5848	**5598**	**13.5**
%0.8	6967	3601	7692	**6087**	**14.6**
%1,6	6396	7031	5813	**6413**	**15.4**
%6,3	6351	6341	6345	**6346**	**15.3**
%12,5	7996	6254	8325	**7525**	**18.1**
%25	7410	9559	9491	**8820**	**21.2**
%50	9667	11249	12229	**11048**	**26.6^{ns}**
Hücre Kontrol	9431	11302	9194	**9976**	**24**
Lysis Hücre Kontrol	41765	42101	40508	**41458**	**100**

ns: non-significant (istatistiki olarak önemsiz)

Metanol kontrol grubunun uygulanan metanol oranlarının inkübasyonunun 3. gününde metanol %50 oranının hücre kaybı oranının hücre kontrol grubunun üstünde olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.8). Hücre kaybı metanol oranın %50'sinde %26.6 oranında meydana gelmiştir. Bu hücre kaybı oranı hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranı ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonucun istatistiki açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir ($p_{\%50}=0.3442$; $p>0.05$).

Tablo 3.9. Kannabidiol (CBD) konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 7. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Konsantrasyon µg/ml (Methanol Oranı %)	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
1 (%0.1)	20675	17730	16232	**18212**	**45.9**
2 (%0.2)	28803	12248	35160	**25404**	**64**
4 (%0.4)	14914	13512	18012	**15479**	**39**
8 (%0.8)	14226	15053	14450	**14576**	**36.7**
16 (%1.6)	13939	13956	16839	**14911**	**37.6**
63 (%6.3)	12687	12851	9646	**11728**	**29.5**
125 (%12.5)	22050	18850	16004	**18968**	**47.8**
250 (%25)	26440	26679	23958	**25692**	**64.7**
500 (%50)	22968	27207	26403	**25526**	**64.3**
Hücre Kontrol	30476	30471	40334	**33760**	**85.1**
Lysis Hücre Kontrol	45541	37494	35924	**39653**	**100**

Kannabidiol konsantrasyonlarının 7. gün inkübasyonlarında hücre kaybı oranı hücre kontrol grubunun altında olması sonucu nedeniyle uygulanan konsantrasyonların hücre kaybı meydana getirmediği tespit edilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.10. Metanol oranlarının HT-29 hücrelerinde 7. gündeki sitotoksisite test sonuçları

Metanol Oranı %	**1.göz**	**2.göz**	**3.göz**	**Ortalama Değerleri**	**Hücre Kaybı %**
%0.1	25635	32644	45879	**34719**	**87.5^{ns}**
%0.2	35351	45961	29029	**36780**	**92.7^{ns}**
%0.4	34881	22008	28986	**28625**	**72.1**
%0.8	24543	25969	35959	**28824**	**72.6**
%1.6	15148	17520	20005	**17558**	**44.2**
%6.3	21132	10.05	27655	**23702**	**59.7**
%12.5	31148	25699	30537	**29128**	**73.4**
%25	23698	33774	29972	**29148**	**73.5**
%50	39389	34543	37332	**37088**	**93.5^{ns}**
Hücre Kontrol	30476	30471	40334	**33760**	**85.1**
Lysis Hücre Kontrol	45541	37494	35924	**39653**	**100**

ns: non-significant (istatistiki olarak önemsiz)

Metanol kontrol grubunun uygulanan metanol oranlarının inkübasyonunun 7. günde metanol %0.1, %0.2 ve %50 oranlarınındaki hücre kaybı oranları hücre kontrol grubundan yüksek çıkmıştır (Tablo 3.10). Metanol kontrol grubunun metanol %0.1 oranında %87.5, %0.2 oranında %92.7 ve %50 oranında %93.5 oranında hücre kaybı meydana gelmiştir. Bu hücre kaybı oranları hücre kontrol grubunun hücre kaybı oranı ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonuç istatistiki açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir (p%0.1=0.8944; p>0.05, p%0.2=0.6376; p>0.05 ve p%50= 0.4045; p>0.05).

3.2. Mikroskobik Gözlem Sonucu

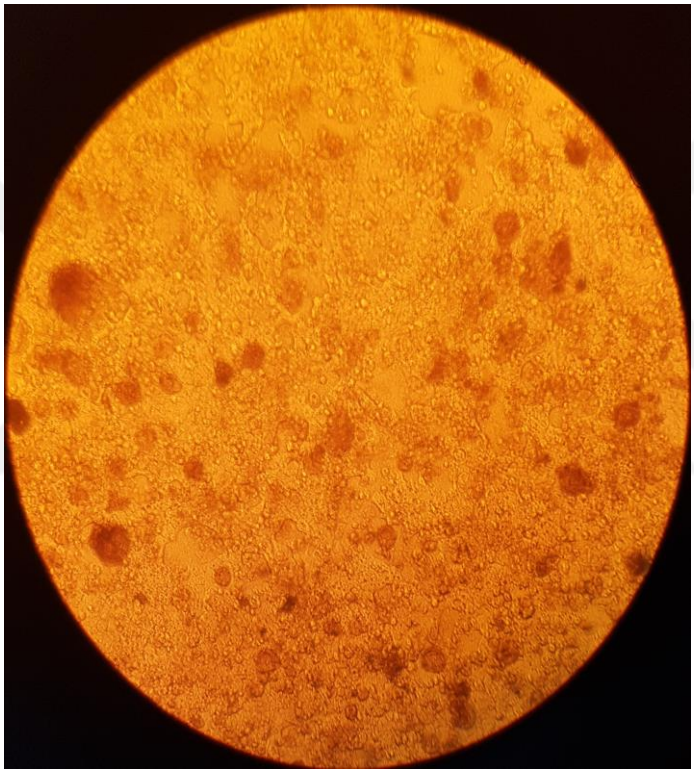
3.2.1. Kızılcık Proantosiyanidini Tip A

3. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

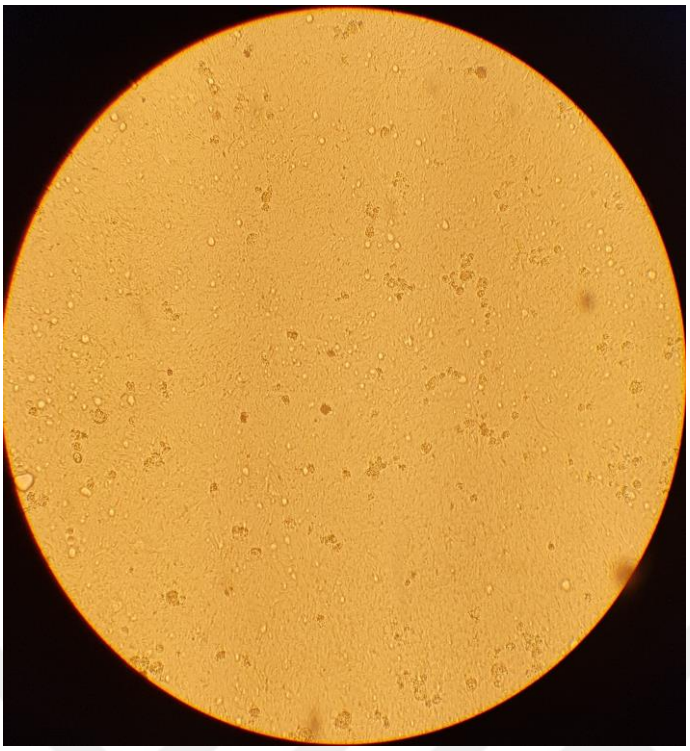
Kızılcık proantosiyanidini tip A konsantrasyonlarının uygulamasının ve PBS kontrol grubunun inkübasyonunun 3.gününde HT-29 hücrelerinin morfolojilerinde ve monolayer hücre bütünlüğünde bir değişim meydana getirmediği gözlemlenmiştir.

7. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Kızılcık proantosiyanidini tip A konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerine uygulamasının 7. gününde 10000 µg/ml konsantrasyonunda hücrelerde genişleme ve yuvarlaklaşmalar meydana getirdiği ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkımlar başlattığı gözlemlenmiştir (Resim 3.1). PBS kontrol grubunda ise hücrelerin tipik şekilde, koloni tarzında büyüme modelinde olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin bütünlüğünde ve morfolojisinde bir değişim meydana getirmemiştir (Resim 3.2).



Resim 3.1. Kızılcık proantosiyanidini tip A 10000 µg/ml 7. gün (x10)



Resim 3.2. PBS kontrol 7. gün (x10)

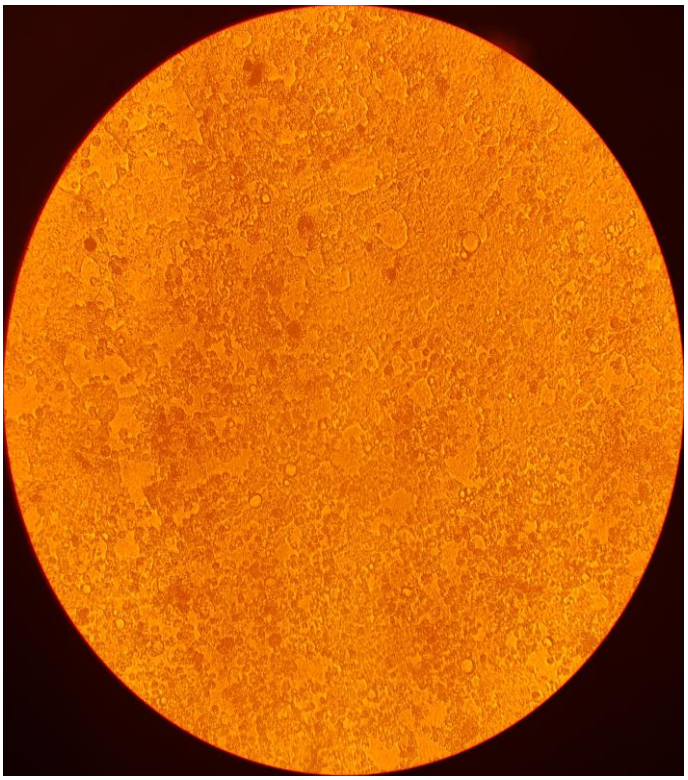
3.2.2. Prosiyanidin Tip B1

3. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının uygulamasının ve PBS kontrol grubunun 3. gününde HT-29 hücrelerinin morfolojilerinde ve monolayer hücre bütünlüğünde bir meydana getirmediği gözlemlenmiştir.

7. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Prosiyanidin tip B1 konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerine uygulamasının 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonun hücrelerde yuvarlaklaşmalar, kümeleşmeler meydana getirdiği ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkımlar başlattığı gözlemlenmiştir (Resim 3.3). PBS kontrol grubunda ise hücrelerin tipik şekilde, koloni tarzında büyüme modelinde olduğu, hücre bütünlüğünde ve morfolojisinde bir değişim meydana getirmediği gözlenmiştir (Resim 3.4).



Resim 3.3. Prosiyanidin tip B1 4000 µg/ml 7. gün (x10)



Resim 3.4. PBS hücre kontrol 7.gün (x10)

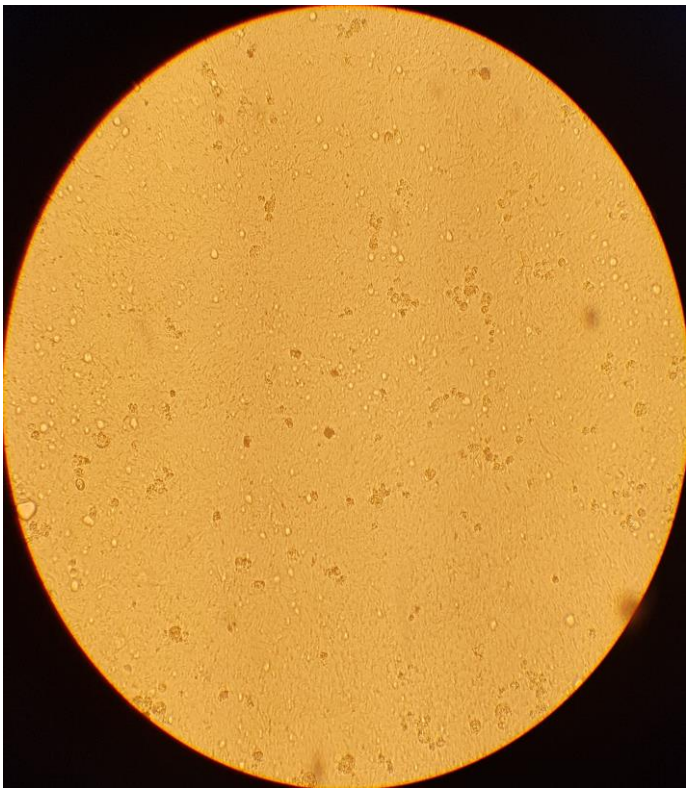
3.2.3. Epigallokateşin galat

3. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Epigallokateşin galat'ın HT-29 hücrelerine uygulanmasının 3. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonun HT-29 hücrelerinin morfolojilerinde genişlemeler ve yuvarlaklaşmalar oluşturduğu, kümeleşmeler başladığı ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkım meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Resim 3.5). PBS kontrol grubunda ise hücrelerin tipik şekilde, koloni tarzında büyüme modelinde olduğu, hücre bütünlüğünde ve morfolojisinde bir değişim meydana getirmediği gözlenmiştir (Resim 3.6).



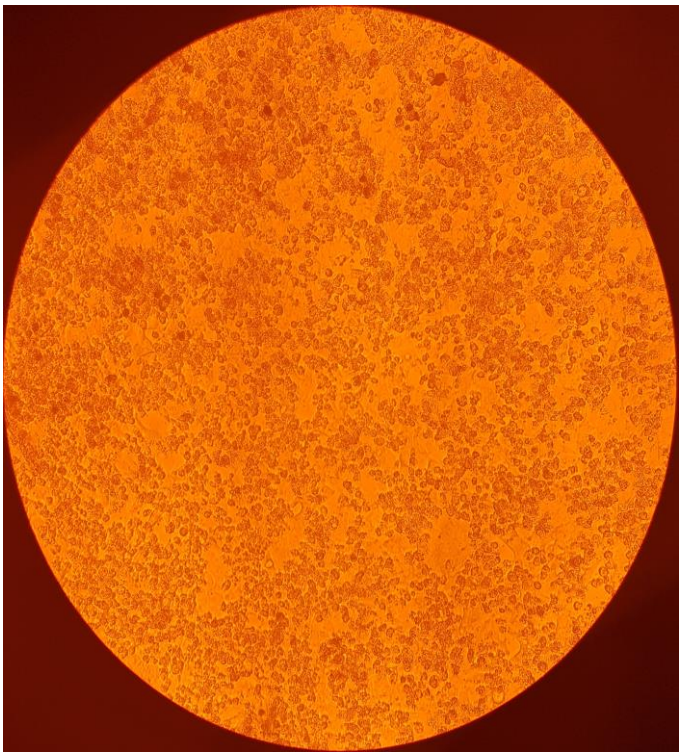
Resim 3.5. Epigallokateşin galat (EGCG) 4000 µg/ml 3. gün (x10)



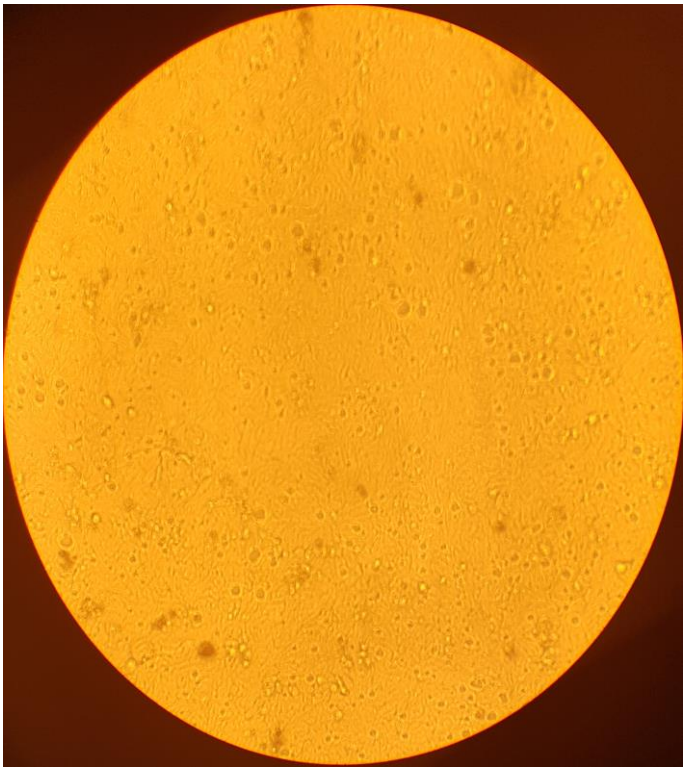
Resim 3.6. PBS hücre kontrol 3. gün (x10)

7. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Epigallokateşin galat'ın HT-29 hücrelerine uygulanmasının 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonun HT-29 hücrelerinin morfolojilerinde yuvarlaklaşmaların belirginleştiği ve hücrelerin birbirlerinden ayrılarak monolayer hücre bütünlüğünün yıkıldığı gözlemlenmiştir (Resim 3.7). PBS hücre kontrol grubunda ise hücre morfolojilerinde ve monolayer hücre bütünlüğünde bir değişim meydana getirmediği gözlenmiştir. Hücreler tipik şekilde ve koloni tarzında büyüme modelindedir. (Resim 3.8).



Resim 3.7. Epigallokateşin galat (EGCG) 4000 µg/ml 7. gün (x10)

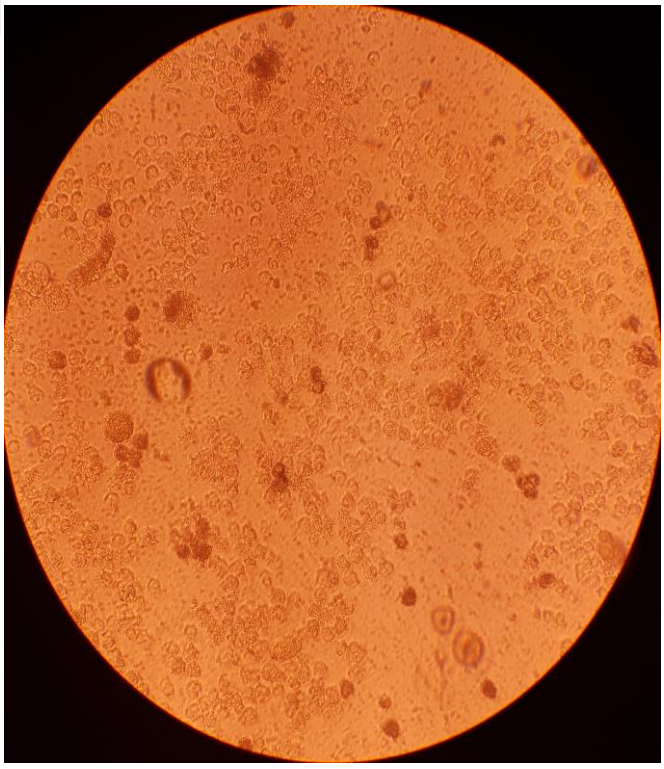


Resim 3.8. PBS hücre kontrol 7. gün (x10)

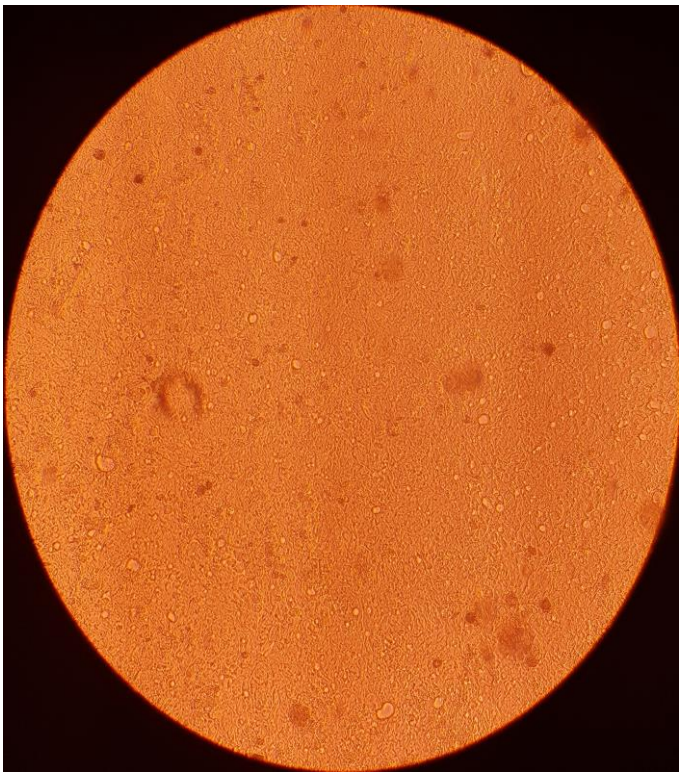
3.2.4. Kannabidiol

3. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Kannabidiol ve metanol kontrol grubunun HT-29 hücrelerine uygulamasının 3. gününde CBD'nin 500 µg/ml konsantrasyonunun (metanol oranı %50) hücre morfolojisinde değişim oluşturduğu, hücrelerde belirgin büyük yuvarlaklaşmalar meydana getirdiği, kümeleşmeler başladığı ve monolayer hücre bütünlüğünün yıkıldığı gözlenmiştir (Resim 3.9). Metanol kontrol grubunun metanol %50 oranında hücrelerin tipik şekilde, koloni tarzında büyüme modelinde olduğu gözlemlenirken, monolayer hücre bütünlüğünde ve hücre morfolojisinde ise bir değişim meydana getirmediği gözlenmiştir (Resim 3.10).



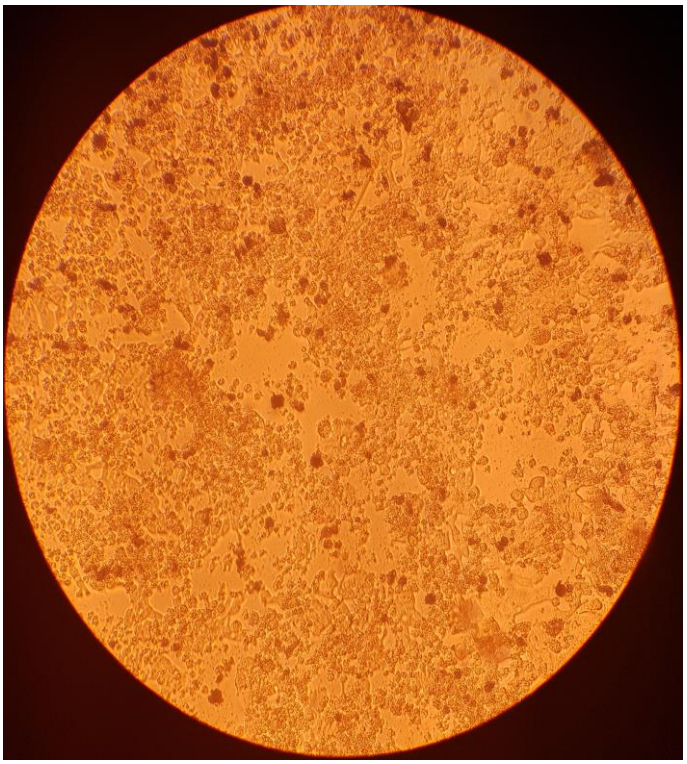
Resim 3.9. Kannabidiol (CBD) 500 µg/ml (metanol oranı %50) 3. gün (x10)



Resim 3.10. Metanol kontrol %50 oranı 3. gün (x10)

7. Gün Mikroskobik Gözlem Sonucu

Kannabidiol ve metanol kontrol grubunun HT-29 hücrelerine uygulamasının 7. gününde CBD'nin 63 µg/ml konsantrasyonunun (metanol oranı %6.3) hücrelerin boyutunda küçülmeler oluşturduğu, kümeleşmelerin arttığı ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkım meydana getirdiği gözlenmiştir (Resim 3.11). Metanol kontrol grubunun metanol %6.3 oranında kümeleşmeler meydana getirmediği, hücrelerin tipik şekilde, koloni tarzında büyüme modelinde olduğu gözlenmiştir (Resim 3.12).



Resim 3.11. Kannabidiol (CBD) 63 µg/ml (metanol oranı %6.3) 7.gün (x10)



Resim 3.12. Metanol kontrol %6.3 oranı 7. gün (x10)

4. TARTIŞMA

Bitkisel bileşenlerden olan proantosiyanidin, prosiyanidin, epigallokateşin galat ve kannabidiol tamamlayıcı tıpta alternatif tedavi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar eczane ve besin desteği satan mağazalardan kapsül, tablet veya damla formunda kolaylıkla temin edilmektedirler. Fakat bu maddelerin fazla miktarda alımının *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda hücreler için toksik olup olmadığına dair bilgiler yeterli değildir.

Sunulan çalışmada kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonları ve CBD'nin 1, 2, 8, 16, 31, 63, 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde 3. ve 7. günlerde inkübasyonunun hücre canlılığına etkisi sitotoksisite testi ile analiz edilmiş ve hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikler mikroskopla incelenmiştir.

Beslenme ve besin bilimine karşı ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bitkisel aktif bileşenler sağlığa yararlı etkilere sahiptirler ve birçok hastalığı tedavi etmede önemli bir alternatiftirler (Cadenas ve Packer 1996, Houdo ve ark 2006). Günümüze kadar yapılan çalışmalar gıdalarda ve doğal ürünlerde bulunan bu bileşiklerin metabolik hastalıklara, kalp damar rahatsızlıklarına ve kansere karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Scalbert ve Williamson 2000, Yang ve ark 2002).

Besinler ve besin ürünlerinin etkileri *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda çalışılmaktadır (Jassim ve Naji 2003). Yapılan hücre kültürü çalışmaları ile meyve ve sebzelerin içinde bulunan polifenol bileşiklerin serbest radikal yakalayıcı antioksidan özellikleri ile normal hücrelerin canlılıklarını koruduklarını, kanser hücrelerinde ise hücre ölümlerine neden olduğu bildirilmektedirler (Hsu ve ark 2004). Bu şekilde bitkisel bileşiklerin kansere karşı koruyucu ve tedavi edici olduğu ileri sürülmektedir (Surh 2003, Kim 2005, Linseisen ve Rohrmann 2008, Marshall 2008).

Kızılcık proantosiyanidinlerinin kullanıldığı IMR-32, SH-Sy5Y, SK-N-SH ve SMS-KCNH nöroblastoma kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada kızılcık proantosiyanidinlerin hücre canlılığını önemli oranda düşürdüğü tespit edilmiştir (Singh ve ark 2009, Singh ve ark 2012).

Üzüm çekirdeği proantosiyanidinin HT-29, Caco-2, LoVo ve CRC kolon kanser hücre hatlarında hücre canlılığının azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Kaur ve ark 2006, Engelbrecht ve ark 2007). Hücre hatlarında üzüm çekirdeği proantosiyanidini kaspaz-3 proteinini aktive ederek programlanmış hücre ölümünü başlattığı bildirilmektedir. Bu hücre ölümünü başlatıcı etkisinin cilt ve göğüs kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması sonucu meydana geldiğini göstermişlerdir (Meeran ve Katiyar 2007, Mantena ve ark 2006). Mitokondriyal membranın yıkımı sonucu sitoplazmaya bir mitokondriyal protein olan sitokrom c salınımına neden olduğu rapor edilmiştir (Kaur ve ark 2006, Engelbrecht ve ark 2007).

Hsu ve ark. (2009) üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin HT-29, SW-480, Lovo ve Colo 320DM kolon kanser hücrelerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada proantosiyanidin konsantrasyon miktarının artışına bağlı olarak hücrelerin çoğalmasında azalma tespit etmişlerdir. Hücrelerin bu bitkisel ekstraktla 2. ve 3. gün inkübasyonlarında büyümelerinin yavaşladığı ve hücrelerin üzüm çekirdeği proantosiyanidini ile inkübasyonu sonucu mitokondriyal membran potansiyeli kaybolarak hücrelerde ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidininin 50 mg/l konsantrasyonda uygulanmasıyla SW480, HT-29 ve LoVo hücrelerinin membran potansiyelini %30 oranında azalttığı rapor edilmiştir. Mitokondriyal membran potansiyelinin azalması kaspaz-3 aktivasyonunun artmasına neden olarak hücrelerin programlanmış ölümünü başlattığı bildirilmiştir. Üzüm proantosiyanidininin HT-29, SW-480, Lovo hücre hatlarına 24 saatlik inkübasyonunda kaspaz-3 protein seviyelerini artırdığı belirtilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidini 50 mg/l'sinin HT-29, SW-480, Lovo hücrelerinde 3 günlük inkübasyonunda ise hücre kaybı hücre kontrol grubuna göre HT-29'da %90, SW-480 ve Lovo hücrelerinde %80 ve Colo hücrelerinde ise %40 olarak bildirilmiştir. Bu hücre hatlarından HT-29'un diğer kolon kanser hücrelerine göre üzüm çekirdeği proantosiyanidinine karşı oldukça hassas olduğu rapor edilmiştir.

Pankreas kanser Miapaca-2 hücreleri ve CSCs kolon kanser kök hücre hattında üzüm çekirdeği proantosiyanidininin hücrelerin büyümesini durdurduğu rapor edilmiştir. Proantosiyanidinin kolon kanser hücre hattında kanser genlerini baskıladığı rapor edilirken, hücrelere toksik ve genotoksik etkisinin olmadığı

bildirilmiştir (Prasad ve ark 2012, Reddivari ve ark 2016). Luan ve ark. (2015)'nın göğüs kanseri hücre hattında üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada, proantosiyanidinlerin kanser hücrelerinin büyümesini durdurğu ve canlılıklarını azalttığı belirtilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidinin HNSCC baş ve boyun skuamöz kanser hücrelerinde çoğalmasını önlediği rapor edilmiştir (Sun ve ark 2011). Katiyar (2016)'nın HNSCC baş ve boyun skuamöz kanser hücrelerinde üzüm çekirdeği proantosiyanidinin etkisini araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada, proantosiyanidinin hücre döngüsünü durdurarak hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidinin MG63 osteosarcoma hücre hattında hücre döngüsüne etki ederek hücrelerin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Bu hücrelere 100 µg/ml konsantrasyonda uygulanan proantosiyanidinin 2. gün inkübasyonu hücre döngüsündeki proteinlerin ekspresyonlarını önemli oranda düşürdüğü belirtilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyanidinin MG63 osteosarcoma hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı derece azalttığı ve konsantrasyon miktarı artıkça hücre ölümü oranında artış meydana getirdiği rapor edilmiştir (Li ve ark 2018).

Ejderha gözü çiçeklerinden elde edilen proantosiyanidinin makrofaj hücrelerine etkisini araştıran bir çalışmada, bu ekstraktın makrofaj hücrelerinde nitrik oksit (NO) üretimi uyarımını inhibe ederek hücre canlılığını artırdığı bildirilmektedir (Ho ve ark 2007). Ejderha gözü çiçeklerindeki proantosiyanidin CRS, SW480 ve Colo 320DM kolon kanser hücre hatlarında hücre döngüsünü S fazında tutarak hücrelerin büyümelerini inhibe ettiği belirtilmektedir (Hsu ve ark 2010). Chung ve ark. (2018), HT-29 kolon kanser hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, ejderha gözü çiçeklerindeki proantosiyanidinin hücrelerin büyümelerini durdurduğunu rapor etmişlerdir. Bu proantosiyanidinin inkübasyonunun 2. gününde hücrelere uygulanan konsantrasyon miktarı arttıkça hücre canlılığında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Hücrelerin morfolojilerinde küçülmeler görülmüştür. Ayrıca bu hücrelerde proantosiyanidinin programlanmış hücre ölümünü düzenlediği tespit edilmiştir.

Hsu ve ark. (2009) Chung ve ark. (2018) ve Li ve ark. (2018)'nın çalışmalarında üzüm çekirdeği proantosiyanidini ve ejderha gözü çiçeklerindeki proantosiyanidinin HT-29, SW-480, Lovo ve Colo 320DM kolon kanser ve MG63

osteosarcoma hücrelerinde uygulanan artan konsantrasyonları sonucu oluşan hücre kaybının sunulan çalışmada HT-29 kolon kanser hücrelerinde uygulanan kızılcık proantosiyanidini tip A'nın artan konsantrasyonlarında belirlenmemiştir. Sunulan çalışmadaki bulgular hücre kaybının artan konsantrasyon miktarından bağımsız olduğunu ve sitotoksisite testlerinin farklı çeşit kitlerle gerçekleştirilmesi nedeniyle benzer bulguların tespit edilmediğini düşündürmektedir.

Hsu ve ark. (2009) HT-29, SW-480, Lovo ve Colo 320DM kolon kanser hücrelerine uygulanan üzüm çekirdeği proantosiyanidinin 50 mg/l konsantrasyonun inkübasyonunun 3. gününde hücre kaybı hücre kontrol grubunun üzerinde rapor edilirken sunulan araştırmada çalışılan aynı hücre hattı olan HT-29 kolon kanser hücrelerine kızılcık proantosiyanidin tip A'nın 25 µg/ml'den 10000 µg/ml'sine kadar uygulanan konsantrasyonlarının 3. gününde PBS hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meydana gelen hücre kaybının istatiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Hsu ve ark. (2009) ile mevcut araştırmadaki bulgular çalışılan aynı HT-29 kolon kanser hücrelerinin canlılığının üzüm çekirdeği ve kızılcık proantosiyanidini tip A gibi farklı bitki türlerinden elde edilen proantosiyanidinlere göre değiştiğini düşündürmektedir.

Chung ve ark. (2018)'nın yaptıkları çalışmada ejderha gözü çiçeklerindeki proantosiyanidinin 200 µg/ml konsantrasyonu uygulamasının 2. gününde konsantrasyon miktarı arttıkça HT-29 hücrelerinin canlılığında azalma olduğu bildirilirken sunulan çalışmada aynı hücre hattı olarak çalışılan HT-29 hücrelerinde kızılcık proantosiyanidini tip A'nın uygulanan konsantrasyonlarının miktarı arttıkça inkübasyonunun 3. gününde sitotoksisite testi ölçümlerinde hücre kaybı meydana gelmediği tespit edilmiştir. Mikroskobik incelemelerde Chung ve ark. (2018)'nın ejderha gözü çiçeklerindeki proantosiyanidinin 200 µg/ml uygulamasının inkübasyonun 2. gününde HT-29 hücrelerinde gözlenen hücrelerin morfolojilerinde meydana gelen değişimler ve küçülmeler, sunulan araştırmada ise kızılcık proantosiyanidin tip A'nın 10000 µg/ml konsantrasyonunda inkübasyonunun 7. gününde hücre morfolojilerinde yuvarlaklaşmalar oluştuğu ve monolayer hücre bütünlüğünün yıkıldığı gözlenmiştir. Sunulan çalışmada, mikroskobik gözlemlerde proantosiyanidin tip A'nın inkübasyonunun 3. gününde uygulanan konsantrasyonların hücre morfolojilerinde ve monolayer hücre bütünlüğünde değişim

meydana getirmediği tespit edilirken, inkübasyonunun 7. gününde ise PBS kontrol grubuna göre hücrelerde yuvarlaklaşmalar oluşturduğu ve monolayer bütünlüğünün yıkılmaya başladığı gözlemlenmiştir. Mikroskobik incelemeler sonucu kızılcık proantosiyanidini tip A'nın inkübasyon süresi arttıkça uygulanan 10000 µg/ml en yüksek konsantrasyonunda hücre morfolojileri üzerine yıkıcı etkisi gözlenmiştir. Sunulan projede sitotoksisite testi analizlerinde kızılcık proantosiyanidin tip A'nın uygulanan konsantrasyonlarının inkübasyonunun 3. gününde PBS hücre kontrol grubuna göre meydana gelen hücre kaybının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenirken; inkübasyonun 7. gününde ise proantosiyanidin tip A'nın 25 µg/ml'sinde %27.5, 50 µg/ml'sinde %16.6 ve 100 µg/ml'sinde %12.7 oranında hücre kaybı meydana geldiği ve sonuçların istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. Mevcut araştırmadaki kızılcık proantosiyanidin tip A'nın mikroskobik incelemelerde olduğu gibi inkübasyonunun 3. gününde sitotoksisite testinde de hücre kaybı tespit edilmediği, inkübasyonun 7. gününde ise mikroskobik gözlemlerin aksine hücre kaybı daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada sitotoksisite ve mikroskobik gözlemler sonucu kızılcık proantosiyanini tip A'nın 25 µg/ml'den 10000 µg/ml'ye kadar uygulanan konsantrasyonlarının HT-29 kolon kanser hücrelerine uygulamasının hücre canlılığına etkisi yönünden inkübasyonunun 3. günün 7. gününe göre daha güvenli olduğu düşünülmektedir.

Singh ve ark. (2009, 2012)'nın IMR-32, SH-Sy5Y, SK-N-SH ve SMS-KCNH nöroblastoma kanser hücrelerinde mevcut çalışmayla benzer şekilde kullanılan kızılcık proantosiyanidinlerin hücre canlılığını önemli oranda düşürdüğü belirtilirken sunulan projede kızılcık proantosiyanidini tip A'nın HT-29 hücrelerine uygulanan konsantrasyonlarının inkübasyonunun 3. gününde hücre kaybı meydana gelmediği, inkübasyonunun 7. gününde ise sırasıyla 25-50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda meydana gelen hücre kaybının istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Benzer proantosiyanidin kullanılmasına rağmen sonuçların farklılık göstermesi kullanılan hücre hattı çeşidinin farklı olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca HT-29 hücre hattının IMR-32, SH-Sy5Y, SK-N-SH ve SMS-KCNH nöroblastoma kanser hücre hattına göre kızılcık proantosiyanidini uygulamasının hücre canlılığını daha az etkilediğini, kızılcık proantosiyanidini ve kızılcık proantosiyanidinin bir tip çeşidi olan kızılcık proantosiyanidini tip A'nın

hücre canlılığına birbirlerinden farklı etkiler gösterebileceği ve kızılcık proantosiyanidi tip A'nın kızılcık proantosiyanine göre hücre canlılığını daha az etkilediği düşünülmektedir.

Üzüm çekirdeğinden elde edilen prosiyanidin ekstraktının 10-100 µg/ml konsantrasyonunun 2. günden 6. güne kadar olan inkübasyonunun DU145 insan prostat kanser hücrelerinin büyümelerini durdurduğu ve kontrol gubuna göre hücre kaybı meydana geldiği rapor edilmiştir (Agarwal ve ark 2000). Gastrik kanser MGC-803 hücre hattında ise prosiyanidinler otofajiyi başlatarak kanser hücrelerin canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Nie ve ark 2016).

Prosiyanidin tip B2'nin kanser hücrelerinde toksik etkisinin olduğu belirtilmiştir. Prosiyanidin tip B2'nin LNCap ve DU145 insan prostat kanseri hücrelerinin canlılığını azaltarak hücre ölümlerini artırdığı bildirilmektedir (Agarwal ve ark 2007, Chou ve ark 2010). Zhao ve ark. (2007)'nın MCF-7 göğüs kanser ve insan embriyotik akciğer fibroblast hücrelerinde yaptıkları çalışmada prosiyanidin tip B2'nin prosiyanidin tip B4 ve etil asetat fraksiyonlarına göre daha toksik olduğu gösterilmiştir.

Prosiyanidin tip B2'nin HL-60 insan lösemi hücre hattında hidrojen peroksit (H_2O_2)'in neden olduğu DNA hasarına karşı koruduğu bildirilmektedir (Sakano ve ark 2005). Kakao prosiyanidini ve prosiyanidin tip B2'nin PC12 rat feokromosit hücrelerinde c-Jun N-terminal kinaz ve p38 mitojen aktive edilmiş protein kinazı inhibe edip, hücreleri oksidatif stresten koruyarak hücrelerin dinamiğini artırdığı belirtilmektedir. Bu prosiyanidinlerin 1 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının PC12 hücrelerinde H_2O_2'nin neden olduğu hücre ölümlerini azaltarak hücre canlılığını artırdığı ve hücreleri H_2O_2'nin etkisinden koruduğu gösterilmiştir (Cho ve ark 2008).

Mutajenik çalışmalarda prosiyanidin tip B2'nin bakteri ve fare hücrelerindeki mikronükleus testinde mutajeniteye neden olmadığı, memeli hücre hatlarında yapılan kromozomal abresyon testinde ise poliplodiye neden olduğu gösterilmiştir (Takahashi ve ark 1999).

Choi ve ark. (2011)'nın LNCaP ve PC-3 insan prostat kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada prosiyanidin tip B3'ün 100 µM konsantrasyonunun hücrelerde

histon asetiltransferazı inhibe ederek hücrelerin tamamına yakınının ölümüne sebep olduğu rapor edilmiştir.

Cyboran ve ark. (2014)'nın prosiyanidin tip B3 ve prosiyanidin tip B içeren kivi ekstraktının domuz eritrositleri ve L5178 fare lenfoma T hücrelerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada prosiyanidin tip B içeren kivi ekstraktının fare lenfoma T hücrelerinde sitotoksik olmadığı ve antiproliferatif etki oluşturmadığı bildirilmiştir. Ayrıca prosiyanidin tip B içeren kivi yaprak ekstraktının lenfoma hücre membranlarını çeşitli faktörlerin neden olduğu oksidasyondan koruduğunu göstermişlerdir. Fakat bu ekstraktın lenfoma hücreleriyle etkileşime geçerek hücre boyutunda ve granulasında küçük değişimler meydana getirdiğini rapor etmişlerdir. Prosiyanidin tip B içeren kivi yaprağı ekstraktının eritrosit hücreleri için de toksik olmadığını, eritrositlerin de şeklini değiştirebilme ve oksidatif hasardan koruma özelliği gösterdiği rapor edilmiştir. Cyboran-Mikolajczky ve ark. (2018) prosiyanidin tip B3 ve prosiyanidin tip B içeren kivi ekstraktı kullanarak domuz eritrositleri ve L5178 fare lenfoma T hücre hatlarında yaptıkları çalışmada prosiyanidin tip B3'ün prosiyanidin tip B içeren kivi ekstraktına göre eritrosit hücrelerini serbest radikallerin meydana getirdiği hasardan daha iyi koruma gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Huang ve ark. (2010)'nın SAS insan ağız kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada prosiyanidinlerin siklooksijenaz-2 protein ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkisiyle hücre kayıplarını azalttığı rapor edilmiştir. Bak ve ark. (2012) HepG2 insan hepatoselüler kanser hücre hattında üzüm çekirdeği prosiyanidinlerinin nükleer faktör E2 (Nrf2) yolunu başlatıp antiinflamatuvar etki oluşturarak hücre canlılığını artırdığını göstermişlerdir. Üzüm çekirdeği prosiyanidinleri RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinde antiinflamatuvar etki göstererek hücrelerin canlılığını artırdığı bildirilmektedir (Schramm ve ark 2001, Bak ve ark 2013).

Prosiyanidinlerin polimer derecelerine göre hücrelerdeki etkinliklerinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Mononükleer hücrelerde yapılan çalışmalarda prosiyanidinler monomer alt ünitelerine göre IL-2 salımını durdurarak hücre canlılığını artırdığı bildirilmiştir (Mao ve ark 1999, Pearson ve ark 2001).

Cho ve ark. (2008)'nın prosiyanidinin tip B2 ve kakao prosiyanidinlerinin 1 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının PC12 rat feokromosit hücrelerinde sunulan çalışmaya benzer şekilde hücre canlılığını etkilemediği bildirilirken, Agarwal ve ark. (2007) ve Chou ve ark. (2010)'nın LNCap ve DU145 insan prostat kanseri hücrelerinde prosiyanidin tip B2 uygulamasının toksik etkileri rapor edilmiştir. Agarwal ve ark. (2007) ve Chou ve ark. (2010)'nın bulgularına benzer şekilde Choi ve ark. (2011)'nın LNCaP ve PC-3 insan prostat kanser hücrelerinde prosiyanidin tip B3'ün 100 µM konsantrasyonu uygulamasında hücrelerin tamamına yakınının canlılığını kaybettiği rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada ise prosiyanidin tip B1'in 25 µg/ml'den 4000 µg/ml'ye kadar artan konsantrasyonlarının HT-29 kolon kanser hücrelerinde inkübasyonunun 3. ve 7. günlerinde sitotoksisite testi ölçümlerinde toksik etkisi tespit edilmemiştir. Bu bulgular doğrultusunda prosiyanidin tip B1'in diğer prosiyanidinin tiplerine göre yüksek konsantrasyonda bile toksik olmadığını ve prosiyanidinin tipleri çalışmalarında prosiyanidin tip B1'in hücre çalışmalarında daha güvenli olduğunu düşündürmektedir. İleri araştırmalarda prosiyanidin tip B1'in diğer prosiyanidin tiplerine göre sunulan araştırmada çalışılan yüksek konsantrasyonlarının güvenli olup olmadığının diğer hücre hatlarında da araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Cho ve ark. (2008)'nın prosiyanidin tip B2'nin 1 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının sunulan araştırmadaki prosiyanidin tip B1'in 25 µg/ml'den 4000 µg/ml'ye kadar artan konsantrasyonlarına göre düşük konsantrasyonlarında PC12 rat feokromosit hücrelerini antioksidan etkisi ile oksidatif stresten koruyarak hücre canlılıklarını arttırdığı ifade edilmiştir. Cyboran ve ark. (2014) ve Cyboran-Mikolajczky ve ark. (2018)'nın prosiyanidin tip B3 ve prosiyanidin tip B içeren kivi ekstraktının domuz eritrositleri ve L5178 fare lenfoma T hücrelerinde antioksidan etki göstererek hücrelerin canlılıklarını koruduğu, Huang ve ark. (2010) ve Bak ve ark. (2012,2013)'nın çalışmalarında da prosiyanidinlerin SAS insan ağız kanser, HepG2 insan hepatoselüler kanser ve RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinde anti-inflamatuvar etki göstererek hücrelerin canlılığını artırarak hücre kaybı meydana gelmediği bildirilmektedir. Sunulan araştırmada da prosiyanidin tip B1'in HT-29 kolon kanser hücrelerine uygulamasında PBS kontrol grubuna göre hücre kaybı meydana gelmemesi Huang ve ark. (2010) ve Bak ve ark. (2012,2013) Cyboran ve

ark. (2014) ve Cyboran-Mikolajczky ve ark. (2018)'nın çalışmalarında olduğu gibi antioksidan ve anti-inflamatuvar etki göstermesi sonucu hücre canlılıklarını sürdürerek hücre kaybı meydana getirmediğini düşündürmektedir.

Mevcut çalışmada prosiyanidin tip B1'in 25 µg/ml'den 10000 µg/ml'ye kadar uygulanan konsantrasyonlarının inkübasyonunun 3. ve 7. gününde yapılan sitotoksisite testi analizleri sonucunda belirlenen hücre kaybının PBS hücre kontrol grubuna göre kıyaslandığında oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Sunulan projede prosiyanidin tip B1'in inkübasyonun 3. gününde HT-29 hücrelerin morfolojilerinde ve monolayer hücre bütünlüğünde bir değişim oluşturmadığı gözlemlenirken, inkübasyonunun 7. gününde ise 4000 µg/ml konsantrasyonu PBS hücre kontrol grubuna göre hücrelerde yuvarlaklaşma, kümeleşmeler ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkım meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Mikroskobik incelemelerdeki bu bulgular prosiyanidin tip B1'in 25-10000 µg/ml arası konsantrasyonlarının inkübasyonlarının 3. gününden 7. gününe kadar olan bu inkübasyon süresi arttıkça hücrelerin morfolojilerine olan yıkım etkisinin de arttığı gözlenmiştir. Sunulan çalışmada sitotoksisite ve mikroskobik incelemeler sonucu prosiyanidin tip B1'in 25-10000 µg/ml arası uygulanan konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerine uygulamasının inkübasyonunun 3. günün 7. gününe göre hücre canlılığına etkisi bakımından daha güvenli olduğunu düşündürmektedir.

Epigallokateşin galat'ın HepG2, HT-29 ve HeLa gibi kanser hücre hatlarında hücrelerin büyümesini durdurduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark 2003). Chen ve ark. (2003)'nın HT-29 kolon kanser hücre hattında EGCG'nin hücrelere etkisinin araştırıldığı bir çalışmada EGCG'nin 100 µM konsantrasyonun 36 saatlik inkübasyonu sonucu hücrelerin büyümelerini inhibe ettiği, 100 µM üzeri konsantrasyonun ise hücrelerde oksidatif strese neden olarak stres sinyallerinin salınımını başlattığı ve bu sinyallerin mitokondri membranının geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c salınımını, kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonunu sağlayarak DNA parçalanması ve nükleer yoğunlaşmaya neden olarak hücre ölümünü başlattığını rapor etmişlerdir.

Epigallokateşin galat'ın 50µM konsantrasyonunun HCT-116 insan kolorektal hücre hattında hücre döngüsünde G1 fazını uyardığı ve 80-100 µM

konsantrasyonlarının hücrelerde programlanmış hücre ölümünü başlattığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak kanser hücrelerinin canlılığının azaldığı rapor edilmiştir (Kumar ve ark 2007, Du ve ark 2012).

Hsu ve ark. (2002, 2003) EGCG'nin normal epitelyal ve kanser epitelyal hücrelerde farklı etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. EGCG ağız kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetiklerken, normal insan keratinosit hücrelerinde canlılığının devamını sağladığı rapor edilmiştir. Kanser ve normal hücre hatları üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, çay polifenollerinin kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu ve programlanmış hücre ölümünü başlattığı belirtilmektedir. EGCG'nin cilt kanseri hücrelerinde normal hücrelere göre trankripsiyon faktörlerinden olan nükler faktör-kapa B (NF-kB) inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark 1998, Ahmad ve ark 2000, Chen ve ark 2003).

Epigallokateşin galat'ın NS-SV-DC tükrük bezi ve OSC-2 ve OSC-4 ağız skuamöz karsinoma hücrelerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada EGCG'nin 50 µM konsantrasyonunun NS-SV-DC tükrük bezi hücrelerinin canlılığına olumsuz bir etkisinin tespit edilmediği, fakat OSC-2 ve OSC-4 hücrelerinde ise 50 µM EGCG'nin hücre canlılığının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu hücrelere 200 µM EGCG uygulanması sonucunda ise hücre canlılığının %80 ve %50 oranında azaldığı rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark 2004).

Epigallokateşin galat'ın kanser hücrelerinin canlılığına etkisi birçok hücre hattında olduğu gibi deney hayvanlarında ve klinik araştırmalarda da çalışılmıştır Hayvanlar üzerindeki toksisite çalışmalarında rodentlere ağız ve enjeksiyon yoluyla verilen EGCG'nin dokularda varlığı tespit edilmediği bildirilmiştir (Chen ve ark 1998). Klinik araştırmalarda EGCG içeren yeşil çay alımının ve içiminin kanser hücreleri oluşumunda önemli bir azalış meydana getirdiği bildirilmiştir (Bushman 1998). İnsanlar üzerindeki klinik epidemiyolojik çalışmalarda 12 hafta süresince günde 3 defa 52 g EGCG içeren yeşil çay ekstraktı tüketenlerde ikincil kolon kanseri hücrelerinin oluşum oranının düştüğü rapor edilmiştir (Shimizu ve ark 2008). *İn vitro* ve *in vivo* ortamdaki EGCG'nin genotoksik etkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda genotoksik olmadığı gösterilmiştir (Isbrucker ve ark 2006).

Günümüze kadar çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar EGCG'nin kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı, mutasyona karşı genlerin ifadelerini sağladığı, kanser hücre oluşumuna karşı koruyucu ve tedavi edici olduğu bildirilmiştir (Cheng ve ark 1991, Katiyar ve ark 1992, Gupta ve ark 2002, Cabrera ve ark 2006, Jochmann ve ark 2008, Meltzer ve ark 2009, Lambert ve Elias 2010, Butler ve Wu 2011, Forester ve Lambert 2011, Gerhauser 2013). EGCG'nin kanser hücrelerine yönelik bu etkilerinin antioksidan aktivitesinden ileri geldiği belirtilmektedir (Kumar ve ark 2007). EGCG'nin biyolojik etkisinin molekül yapısındaki aromatik iki yakın paralel halkanın ve aromatik üçüncü halkasının birbirine paralel uzanan iki halkaya dik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Du ve ark 2012).

Du ve ark. (2012) ve Kumar ve ark. (2007), HCT-116 hücre hattında EGCG'nin 80-100 µM konsantrasyonlarının hücre kaybını başlattığı rapor edilirken, sunulan çalışmada ise EGCG'nin 25-10000 µg/ml arası uygulanan konsantrasyonlarının HT-29 kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı bir etkisi tespit edilmemiştir.

Chen ve ark. (2003)'nın çalışmasında HT-29 kolon kanser hücrelerinde EGCG'nin 100 µM konsantrasyonun 36 saatlik inkübasyonunda hücre ölümünü başlattığı bildirilirken, sunulan araştırmada aynı hücre hattında EGCG'nin 25-10000 µg/ml arası uygulanan konsantrasyonlarının 3. ve 7. gün inkübasyonlarında sitotoksisite analizleri sonucu hücre canlılığını azalttığı tespit edilmemiştir.

İnsan keratinosit, ağız kanser ve epitelyal kanser, NS-SV-DC tükrük bezi ve OSC-2 ve OSC-4 hücrelerinde olduğu gibi kanser ve kanser olmayan hücre hatlarında EGCG'nin aynı miktar konsantrasyon uygulaması sonucu kanser hücre hattı olmayan insan keratinosit, epitelyal ve NS-SV-DC hücre hatların canlılığına olumsuz etkisinin tespit edilmediği, kanser hücre hatlarınının ise ölümlerini tetikleyerek canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Chen ve ark 1998, Ahmad ve ark 2000, Chen ve ark 2003, Hsu ve ark 2002, 2003 ve Yamamoto ve ark 2004). Sunulan araştırmada ise bir kolon kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerinin EGCG'nin 25-10000 µg/ml arası uygulanan konsantrasyonlarının sitotoksisite analizleri sonucunda yukarıdaki araştırmalarda belirtilen kanser olmayan hücre hatlarına benzer şekilde

hücre canlılığını etkilemediği tespit edilmiştir. Bu sitotoksisite testi analizleri bulguları EGCG'in uygulanan konsantrasyonlarında HT-29 hücrelerinin canlılığının ağız kanser, epitelyal kanser, OSC-2 ve OSC-4 hücrelerinin canlılığından daha yüksek olduğunu ve sitotoksisite analizlerinde kullanılan sitotoksisite test sisteminin kitlerin diğer araştırmacıların farklı olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Mevcut araştırmada mikroskobik incelemelerde ise EGCG' nin inkübasyonunun 3. ve 7. günlerinde 4000 µg/ml konsantrasyonunun hücrelerde morfolojik değişimlere neden olduğu, inkübasyonun 3. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonunun HT-29 hücrelerinde PBS hücre kontrol grubuna göre hücrelerde meydana getirdiği değişim daha yavaş iken inkübasyonunun 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonunun hücrelerin şeklinde yuvarlaklaşmaların belirginleştiği ve hücrelerin birbirlerinden ayrılarak monolayer hücre bütünlüğünde yıkım gözlenmiştir. Mikroskobik gözlem sonucu elde edilen bulgular EGCG konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde uygulamasının ardından inkübasyon süresi arttıkça EGCG'nin hücrelerin morfolojilerinde daha yıkıcı etki meydana getirdiğini göstermektedir. Mevcut araştırmada sitotoksisite ve mikroskobik gözlemler sonucu EGCG'nin 25 µg/ml'den 10000 µg/ml'ye kadar uygulanan konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde inkübasyonun 3. günün 7. gününe göre hücre canlılığına etkisi yönünden daha güvenli olduğu düşünülmektedir.

Ligresti ve ark. (2006), MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde CBD'nin hücre canlılığını azalttığını belirlemişlerdir. CBD'nin göğüs kanseri hücrelerinde DNA bağlanması inhibitörü-1 (Id-1) geninin inhibisyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (McAllister ve ark 2007). Shrivastava ve ark. (2011), CBD'nin göğüs kanseri hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne neden olduğunu bildirmektedirler. Fare göğüs kanseri 4T1 hücrelerinde CBD'nin hücrelerin çoğalmasını ve yayılmasını azalttığı gösterilmiştir (McAllister ve ark 2011). CBD'nin MCF7 göğüs kanser hücrelerinde artan doz konsantrasyonunun sitotoksisiteye neden olduğu rapor edilmiştir (Javid ve ark 2011). Göğüs kanseri MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 hücre hatlarında ve prostat kanseri ZR-7-1 ve PC-3 hücre hatlarında da CBD'nin hücrelerin çoğalmasını durdurarak apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Sharma ve ark 2014). Olmos ve Vetrone. (2018)'nın, CBD'nin LNCap prostat kanser hücreleri ve MCF7 hücrelerine etkisini araştırdıkları bir

çalışmada 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 20µg/ml konsantrasyonlarının 3 günlük inkübasyonun 2. gününde CBD'nin 2 hücre hattında da hücre canlılığının azaldığını ve LNCap hücre hattında MFC7 hücre hattına göre daha yüksek oranda hücre ölümü meydana getirdiğini rapor etmişlerdir.

Fisher ve ark (2016), CBD'nin SK-N-SH, NUB-6, IMR-32 ve LAN-1 nöroblastoma kanser hücrelerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada CBD'nin değişen zaman aralığına ve doz konsantrasyonuna göre hücrelerin büyümelerini ve çoğalmalarını durdurduğu, hücrelerin morfolojilerinde değişim oluşturduğu, canlılığını azalttığı ve apoptozisi başlattığını göstermişlerdir. Hücrelerin canlılığını azaltıcı etkisinin kaspaz-3'ün aktivasyonunu başlatmasından ileri geldiği bildirilmiştir. Nöroblastoma SK-N-SH ve NUB-5 hücre hatlarında IMR-32 ve LAN-1 hücre hatlarına göre %50 oranında hücre kaybı meydana geldiği rapor edilmiştir.

Lukhele ve Motadi (2016) tarafından servikal kanser HeLa, ME-180 ve SiHa hücre hatlarında CBD'nin programlanmış hücre ölümünü başlatma oranları çalışılmıştır. CBD uygulamasını takiben 2. ve 24. saatte ATP seviyeleri ölçülmüştür. İki saatlik inkübasyon sonucunda ATP seviyesinin HeLa hücrelerinde %93, ME-180 hücrelerinde %8 ve SiHa hücrelerinde ise %61 azaldığı, 24 saatlik inkübasyonda ise ATP seviyesinin HeLa hücrelerinde %97, ME-180 hücrelerinde %8.5 ve SiHa hücrelerinde %66 azaldığı bildirilmiştir. Apoptozisi başlatma oranları ise HeLa hücrelerinde %43.3, ME-180 hücre hattında %28.6 ve SiHa hücrelerinde ise %51.3 olarak rapor edilmiştir.

Kannabidiol'ün NIH3T3 fibroblast, SNU-C4 kolon kanser ve B16 melanoma hücrelerinde sitotoksik etkisi bildirilmiştir. CBD'nin zamana ve değişen doz konsantrasyonuna göre bu kanser hücrelerinin büyümesini durdurarak hücre canlılığının azalttığı tespit edilmiştir. CBD'nin 5 µg/ml'den 80 µg/ml'e kadar artan konsantrasyonlarında hücre canlılığını azalttığı, morfolojiksel olarak hücrelerde küçülme, membranda kabarma meydana geldiği bildirilmektedir. CBD'nin kaspaz-3'ü aktive ederek hücre ölümlerinin meydana geldiği ileri sürülmüştür (Choi ve ark 2008).

Kannabidiol'ün alveoler rhabdomiyosarkom ve osteosarkom hücre hattında apoptozisi başlattığı, endoplazmik retikulumda stresi tetiklediği ve otofajiye neden

olduğu gösterilmiştir. Mikroskobik incelemelerde CBD'nin 10 µg/ml konsantrasyonlarının kanser hücrelerinde yuvarlaklaşma ve morfolojiksel değişime neden olduğu bildirilmektedir. Bu iki hücre hattında da CBD'nin 10µg/ml konsantrasyonunun inkübasyonunun 2. gününde hücre döngüsüne etki ederek hücrelerin G1 fazında kaldığı rapor edilmiştir (Oesch ve ark 2009, Notaro ve ark 2014).

Choi ve ark. (2008), Javid ve ark. (2011), Fisher ve ark. (2016) ve Olmos ve Vetrone (2018)'nın araştırmalarında CBD'nin değişen zaman aralığına ve artan konsantrasyon miktarına bağlı olarak meydana gelen hücre kaybı benzer şekilde sunulan araştırmada da tespit edilmiştir. Choi ve ark. (2008)'nın çalışmasında CBD'nin 5 µg/ml'den 80 µg/ml'e kadar artan konsantrasyonlarının NIH3T3 fibroblast, SNU-C4 kolon kanser ve B16 melanoma hücrelerinin canlılığını azalttığı, Olmos ve Vetrone (2018)'nin araştırmalarınında, CBD'nin 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 20 µg/ml artan konsantrasyonların da LNCap prostat kanser hücreleri ve MCF7 göğüs kanseri hücrelerinde hücre canlılığının azalttığı belirtilirken, mevcut çalışmada da CBD'nin inkübasyonun 3. gününde 125 µg/ml'den 500 µg/ml'ye kadar artan konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinin canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Choi ve ark. (2008) ve Olmos ve Vetrone (2018)'nin araştırmalarındaki hücre hatlarında hücre kaybı sunulan çalışmaya göre CBD'nin 5 µg/ml'den 80 µg/ml'ye, 5 µg/ml'den 20 µg/ml'ye kadar olan düşük konsantrasyonlarında meydana gelirken mevcut çalışmada CBD'nin 125 µg/ml'den 500 µg/ml'ye kadar artan daha yüksek konsantrasyonlarında hücre kaybı meydana gelmiştir. Bu bulgular HT-29 kolon kanser hücrelerinin Choi ve ark. (2008) ve Olmos ve Vetrone (2018)'nin araştırmalarındaki NIH3T3 fibroblast, SNU-C4 kolon kanser, B16 melanoma, LNCap prostat kanser ve MCF7 göğüs kanseri hücrelerine göre CBD'nin daha yüksek konsantrasyonlarında hücre kaybı meydana getirdiğini düşündürmektedir.

Choi ve ark. (2008)'nın araştırmasında CBD'nin NIH3T3 fibroblast, SNU-C4 kolon kanser ve B16 melanoma hücrelerinde 5 µg/ml'den 80 µg/ml'e kadar artan konsantrasyonlarında hücrelerde morfolojiksel olarak küçülme, membranda kabarma meydana getirdiği, Oesch ve ark. (2009) ve Notaro ve ark. (2014)'nın araştırmalarında da CBD'nin 10 µg/ml'sinde rhabdomiyosarkom ve osteosarkom hücrelerinin morfolojilerinde yuvarlaklaşmaya neden olduğu bildirilirken, mevcut

çalışmada da HT-29 hücrelerinde CBD'nin inkübasyonunun 3. gününde 500 µg/ml konsantrasyonunda hücrelerde belirgin büyük yuvarlaklaşmalar meydana geldiği ve kümeleşmeler başladığı, inkübasyonunun 7. gününde ise 63 µg/ml konsantrasyonunda hücrelerin boyutunun küçüldüğü, kümeleşmelerin arttığı ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkım meydana geltirdiği gözlenmiştir. Bulgular HT-29 hücrelerinin sitotoksisite ölçümlerindeki hücre kaybı çalışmalarında olduğu gibi mikroskobik incelemelerde de morfolojilerindeki değişimin NIH3T3 fibroblast, SNU-C4 kolon kanser, B16 melanoma, rhabdomiyosarkom ve osteosarkom kanser hücrelerine göre CBD'nin daha yüksek konsantrasyonunda meydana geldiğini göstermektedir.

Sunulan araştırmada sitotoksisite testi ölçümlerinde CBD'nin inkübasyonun 3. gününde hücre canlılığını konsantrasyonunun 125 µg/ml'sinde %48.4, 250 µg/ml'sinde %50.7 ve 500 µg/ml'sinde %54.9 oranında azalttığı belirlenmiştir. CBD'nin bu konsantrasyonlarındaki metanol oranları, metanol kontrol grubu ile çalışıldığında meydana gelen hücre kaybının istatistiki olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Bu bulgular CBD'nin sırasıyla 125-250 ve 500 µg/ml konsatrasyonlarındaki hücre kaybının metanolden bağımsız olarak direk kendi etkisini göstermektedir. CBD'nin uygulanan konsantrasyonlarının inkübasyonun 7. gününde hücre kaybı oranları hücre kontrol grubunun altında olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyonun 7. gününde hücre kontrol grubundaki hücre kaybı oranlarının CBD konsantrasyonlarındaki hücre kaybı oranlarının üzerinde olması CBD'nin daha uzun zaman inkübasyonunun hücre kontrol grubuna göre hücre canlılığını artırıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir. CBD ile aynı oranlarda metanol içeren metanol kontrol grubu oranları 7. günde hücre kaybı meydana getirmemesi CBD'nin metanolden bağımsız kendi etkisini açığa çıkarmıştır.

Sunulan çalışma ile mikroskobik gözlemlerde CBD ve metanol kontrol grubunun HT-29 hücrelerine uygulamasının 3. gününde CBD'nin 500 µg/ml konsantrasyonunun (metanol oranı %50) hücre morfolojisinde belirgin büyük yuvarlaklaşmalar meydana getirdiği ve kümeleşmeler başladığı, CBD'nin 63 µg/ml konsantrasyonunun (metanol oranı %6.3) inkübasyonunun 7. gününde ise hücrelerin boyutunun küçüldüğü, kümeleşmelerin arttığı ve monolayer hücre bütünlüğünde yıkım meydana geldiği gözlenmiştir. Mikroskobik olarak yapılan incelemelerde

sitotoksisite testi ölçümlerinde olduğu gibi CBD ile aynı oranda metanol içeren metanol kontrol grubunun hücrelerde değişim oluşturmaması CBD'nin hücreler üzerindeki kendi etkisini bir kez daha göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Araştırmada, kızılcık proantosiyanidini tip A'nın 7. gün inkübasyonunun 25 µg/ml'sinde % 27.5, 50 µg/ml'sinde %16.6 ve 100 µg/ml'sinde %12.7 oranında hücre kaybı meydana gelmiştir. Sonuçların istatiksel olarak önemli ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

- Prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin uygulanan konsantrasyonlarının insan kolon kanser hücrelerinde (HT-29) 3. ve 7. gün inkübasyonlarının PBS hücre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre kaybı meydana getirmediği belirlenmiştir.

- Kannabidiol'ün inkübasyonunun 3. gününde 125 µg/ml'sinde %48.4, 250 µg/ml'sinde %50.7 ve 500 µg/ml'sinde %54.9 oranında hücre kaybı meydana gelmiştir. Sonuçların istatiksel olarak önemli ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

- Mikroskobik gözlemlerde kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1, EGCG ve CBD'nin artan konsantrasyonlarının kontrol gruplarına göre monolayer hücre bütünlüğünde bozulma ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirdiği gözlenmiştir.

- Proantosiyanidin tip A'nın inkübasyonunun 7. gününde 10000 µg/ml konsantrasyonu, prosiyanidin tip B1'in inkübasyonunun 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonu, EGCG'nin inkübasyonunun 3. ve 7. gününde 4000 µg/ml konsantrasyonu, CBD'nin inkübasyonunun 3. gününde 500 µg/ml konsantrasyonu ve inkübasyonunun 7. gününde ise 63 µg/ml konsantrasyonunun monolayer hücre bütünlüğünde bozulma ve hücre morfolojisinde değişimler oluşturduğu gözlenmiştir.

- Sunulan çalışma ile kızılcık proantosiyanidini tip A, prosiyanidin tip B1 ve EGCG'nin 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 2000, 4000 ve 10000 µg/ml konsantrasyonlarının ve CBD'nin 1, 2, 8, 16, 31, 63, 125, 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarının HT-29 hücrelerinde sitotoksisite testi ile hücre canlılığına etkisi aydınlatılmış ve mikroskopla hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikler gözlenmiştir.

- Uygulanan bitkisel ekstraktların zamana ve konsantrasyon miktarının artmasına bağlı olarak hücrelerin canlılığında ve morfolojilerinde değişim meydana getirdiği, düşük konsatrasyonlarda ve 3 gün inkübasyon süresinin HT-29 hücrelerinde daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon süresi ve bitkisel ekstraktların konsantrasyonları HT-29 hücrelerin canlılığını ve monolayer hücre

bütünlüğünü etkileyen önemli faktör olduğu görülmektedir. İnkübasyon süresi ve bitkisel ekstraktların konsantrasyon miktarının artması HT-29 hücrelerinin canlılığını ve monolayer hücre bütünlüğünün kaybı ile bağlantılı olarak görünsede, bitkisel ekstraktların hücresel toksisiteye ve monolayer hücre bütünlüğünün morfolojisindeki değişikliklerine etkilerinde kimyasal özelliklerinin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

- Bulgular sonucunda planlanacak çalışmaların bu bitkisel ekstraktların hücrelere ve organellere etkilerini moleküler düzeyde daha detaylı bir şekilde aydınlatılması, elektron mikroskobu ile elde edilmesi muhtemel sonuçların bitkisel kökenli ilaç geliştirme, bitkisel bileşenler içeren besin destek ürünlerinin geliştirilmesine ve güvenilir doz aralıklarının tespit edilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adams R, Hunt M, Clark JH, 1940. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. J Am Chem Sos, 62, 196-200.

Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R, 2000. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of GI arrest and apoptosis. Mol Carcinog, 28, 129-38.

Agarwal C, Veluri R, Kaur M, Chou SC, Thompson JA, Agarwal R, 2007. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. Carcinogenesis, 28, 1478-84.

Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H, 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kapa B in cancer cells versus normal cells. Arch Biochem Biophys, 376, 338-46.

Anderson RA, Brantner JH, Polansky MM, 1978. An improved assay for biologically active chromium. J Agric Food Chem, 26, 1219-21.

Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, Schoene NW, Graves DJ, 2004. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. J Agric Food Chem, 52, 65-70.

Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E ve Rahman MM, 2008. Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: a structure-activity study. J Nat Prod, 71, 1427-30.

Ariga T, Hamano M, 1990. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxyl radical. Agric Biol Chem, 54, 2499-2504.

Ariga T, 2004. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. Biofactors, 21, 197-201.

Arteel GE, Sies H, 1999. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. FEBS Lett, 462, 167-70.

Artim R, DiBella N, 1983. Tetrahydrocannabinol (THC) plus prochlorperazine (PCZ) for refractory nause and vomiting (N/V). ASCO Abstr, 2, 85.

Arts IC, 2008. A review of the epidemiological evidence on tea, flavonoids, and lung cancer. J Nutr, 138, 1561-66.

Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, Apostolides Z, 1997. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (Camellia sinensis). Anticancer Res, 17, 4381-85.

Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ, 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. Gen Pharmacol, 30, 771-6.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG, 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicol, 148, 187-97.

Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA, 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. Mut Res, 523-524, 87-97.

Bais H, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM, 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Sci, 301, 1377-80.

Bak MJ, Jun M, Jeong WS, 2012. Procyanidins from wild grape (Vitis amurensis) seeds regulate ARE-mediated enzyme expression ia Nrf2 coupled with p38 and PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. Inter J Mol Sci, 13, 801-18.

Bak MJ, Truong VL, Kang HS, Jun M, Jeong WS, 2013. Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (Vitis amurensis) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. Oxid Med Cell Longev, 2013, 409321.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC, 1997. The chemistry of tea flavonoids. Crit Rev Food Sci Nutr, 37, 693-704.

Barnard DL, Smee DF, Huffman JH, Meyerson LR, Sidwell RW, 1993. Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. Chemotherapy, 39, 203-11.

Beecher GR, 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. J Nutr, 133, 3248-54.

Belguise K, Gua S, Sonenshein GE, 2007. Activation of FOXO3a by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate induces estrogen receptor alpha expression reversing invasive phenotype of breast cancercells. Cancer Res, 67, 5763-70.

Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepien M, Pupek-Musialik D, Jablecka A, 2012. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves

parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. Nutr Res, 32, 421-27.

Bolla KI, Brown K, Eldreth D, Tate K, Cadet JL, 2002. Dose-related neurocognitive effect of marijuana use. Neurol, 59, 1337-43.

Borges RS, Batista J, Viana RB, Baetas AC, Orestes E, Andrade MA, Honorio KM, da Silva AB, 2013, Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. Molecules, 18, 12663-74.

Bornhein LM, Borys HK, Karier R, 1981. Effect of cannabidiol on cytochrome P-450 and hexobarbital sleep time. Biochem Pharmaco, 30, 503-07.

Bors W, Michel C, 2002. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. Ann NY Acad Sci, 957, 57-69.

Brieskorn CH, Betz R, 1988. Procyanidin polymers crucial to the structure of the almond seed coat. Z Lebensm Unters Forsch, 187, 347-53.

Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I, Ofek I, 2002. Inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus by a high-molecular weight constiuent of cranberry juice. Crit Revs Food Sci Nutr, 42, 279-84.

Bushman JL, 1998. Green tea and cancer in humans: a review of the literature. Nutr Cancer, 31, 151-59.

Butler LM, Wu AH, 2011, Green and black tea in relation to gynecologic cancers. Mol Nutr Food Res, 55, 931-40.

Cabrera C, Artacho R, Gimenez R, 2006. Beneficial effects of green tea- a review. J Am Coll Nutr, 25, 79-99.

Cadenas E, Packer L (eds), 1996. Handbook of antioxidants. New York, NK, USA. Marcel Dekker Inc, p.711.

Carando S, Teissedrec PL, Pascual-Martinez L, Cabanis JC, 1999. Levels of flavan-3-ols in french wines. J Agric Food Chem, 47, 4164-66.

Chen ZP, Schell JB, Ho CT, ChenKY, 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. Cancer Lett, 129, 173-79.

Chen CG, Shen V, Hebbar R, Hu ED, Owuor A, Kong NT, 2003. Epigallocatehin 3-gallate-induced stres signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Carcinogenesis, 24, 1369-78.

Cheng S, Ding L, Zhen Y, Lin P, Zhu Y, Chen Y, Hu X, 1991. Progress in studies on the antimutagenicity and anticarcinogenicity of green tea epicatechins. Clin Med Sci J, 6, 233-38.

Cheng JT, Hsu FL, Chen HF, 1993. Antihypertensive principles from the leaves of melastoma candidum. Planta Med, 59, 405-7.

Chiavari G, Vitali P, Galletti GC, 1987. Electrochemical detection in the high-performance liquid chromatography of polyphenols (vegetable tannins). J Chromatogr, 392, 426-34.

Cho ES, Lee KW, Lee HJ, 2008. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrojen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. Mutat Res, 640, 123-130.

Choi KC, Park S, Lim BJ, Seong AR, Lee YY, Shiota M, Yokomizo A, Naito S, Na Y, Yoon HG, 2011. Procyanidin B3, an inhibitor of histone acetyltransferase, enhances the action of antagonist for prostate cancer cells via inhibition of p300-dependent acetylation of androgen receptor. Biochem J, 433, 235-44.

Choi WH, Park H D, Baek S H, Chu J P, Kang MH, Mi Y J, 2008. Cannabidiol induces cytotoxicity and cell death via apoptotic pathway in cancer cell lines. Biomol Therap 16, 87-94.

Choi SW, Friso S, 2010. Epigenetics: A new bridge between nutrition and health. Adv Nutr, 1, 8-16.

Chou SC, Kaur M, Thompson JA, Agarwal R, Agarwal C, 2010. Influence of gallate esterification on the activity of procyanidin B2 in androgen-dependet human prostate carcinoma LNCaP cells. Pharm Res, 27, 619-27.

Chung YC, Chiang HC, C Hang H, Lin CC, Lo LT, Wang AY, Chou KF, Hsu CP, 2018. Longan flower proanthoctanidins induce apoptosis in HT-29 colorectal carcinoma spheroids. J Can Res Ther, 14, 388-93.

Clapperton J, Hammerstone JF, Romanczyk LJ, Yow S, Lim D, Lockwood R Polyphenols and Cocoa Flavour. Proceedings of the 16th International Conference of Groupe Polyphenols, Tome II: p. 112-15, 1992. Lisbon, Portugal, Groupe Polyphenols, Norbonne, France.

Clement Y, 2009. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. Prev Med, 49, 83-87.

Cunha J, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R, 1980. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacol, 21, 175-85.

Cyboran S, Oszmianski J, Kleszczynska H, 2014. Modification of the properties of biological membrane and its protection against oxidation by Actinidia arguta leaf extract. Chem Biol Interact, 222, 50-59.

Cyboran-Mikolajczyk S, Csonka A, Molnar J, Szabo D, Oszmianski J, Kleszczynska H, 2018. In vitro studies of anti-hemolytic and cytotoxic activity of procyanidin-rich extract from the leaves of Actinidia arguta Pol. J Food Nutr Sci, 68, 171-77.

Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ, Thomas WA, Jones WT, 1979. Direct prof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. J Chem Soc Chem Commun, 375-77.

De Bruyne T, Pieters L, Witvrouv M, De Clercq E, Berghe DV, Vlietinck AJ, 1999. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. J Nat Product, 62, 954-58.

Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A, 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low molecular-weight phenolic acids. J Nutr, 130, 2733-38.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin L, Howlett AC, 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, 34, 605-13.

Du GJ, Zhang Z, Wen XD, Yu C, Calway T, Yuan CS, Wang CZ, 2012. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. Nutrients, 4, 1679-91.

Eberhardt TL, Young RA, 1994. Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: Characterization by C NMR spectroscopy and determinetion of antifungal activities. J Agric Food Chem, 42, 1704-08.

Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, Smith R, Peters S, Smith C, Myburgh K, 2007. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. Cancer Lett, 258, 144-53.

Erker L, Schubert R, Yakushiji H, Barlow C, Larson D, Mitchell JB, Wynshaw-Boris A, 2005. Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol acts partially via the p53 tumor suppressor. Hum Mol Genet, 14, 1699-1708.

Escribano-Bailon T, Gutierrez-Fernandes Y, Rivas-Gonçalo JC, Santos-Buelga C, 1992. Characterization of procyanidins of vitis vinifera variety Tinta del Pais grape seeds. J Agric Food Chem, 40, 1794-99.

Facino RM, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, Morazzoni P, 1996. Procyanidines from vitis vinifera seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: Antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. Planta Medica, 62, 495-502.

Fankhauser M, 2002. History of cannabis in western Medicine. Cannabis and Cannabinoids, Eds: Grotenhermen F and Russo E. New York: The Haworth Integrative Healing Press, p. 37-51.

Fanos V, Atzei A, Zaffanello M, Piras A, Cataldi L, 2006. Cranberry and prevention of urinary tract infections in children. J Chemother, 18, 21-24.

Fisher T, Golan H, Schiby G, PriChen S, Smoum R, Moshe I, Peshes-Yaloz N, Castiel A, Waldman D, Gallily R, Mechoulam R, Toren A, 2016. In vitro and in vivo efficacy of non-psychoactive cannabidiol in neuroblastoma. Cur Oncol, 23, 15-22.

Flamini R, 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. Mass Spectrometry Reviews, 22, 218-50.

Forester SC, Lambert JD, 2011. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. Mol Nutr Food Res, 55, 844-54.

Gali HU, Perchellet EM, Gao XM, Karchesy JJ, Perchellet JP, 1994. Comparison of the inhibitory effect of monomeric, dimeric, and trimeric procyanidins on the biochemical markers of skin tumor promotion in Mouse epidermis in vivo. Planta Med, 60, 235-39.

Gaoni Y, Mechoulam R, 1971. The isolation and structure of Δ-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. J Am Chem Soc, 93, 217-24.

Gerhauser C, 2013. Cancer chemoprevention and nutriepigenetic: state of the art and future challenges. Top Curr Chem, 329, 73-132.

Grant I, Gonzalez R, Carey CL, Natarajan L, Wolfson T, 2003. Non-acute (residual) neurocognitive effects of cannabis use: Ameta-analytic study. J Int Neuropsychol Soc, 9, 679-89.

Grotenhermen F, 2005. Cannabinoids. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 4, 507-30.

Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL, 2003. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. J Agric Food Chem, 51, 7513-21.

Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardı S, Prior RL, 2004. Concentrations of procyanidins in common foods and estimations of normal consumption. J Nutr, 134, 613-17.

Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W, 1996. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipit peroxidation in synaptosomes. Biochim Bioophys Acta, 1304, 210-22.

Gupta S, Saha B, Giri AK, 2002. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. Mutat Res, 512, 37-65.

Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JF, 1998. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (Malus domestica var. Kermerrien). J Agric Food Chem, 46, 1698-1705.

Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL, 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J Agr Food Chem, 46, 1887-92.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE, 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now. J Lab Clin Med, 199, 598-620.

Hammerstone JF, Lazarus SA, 2000. HPLC/MS analysis of flavonoids in foods and beverages. In: Caffeinated beverages: health benefits, physiolpgical effects and chemistry. Eds: Parliament TH, Ho CT, Schieberle P, Washington DC: American Chemical Society, p. 374-84.

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelroad J, Wink D, 1998. Cannabidiol and (-)Δ9- tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Nat Aca Sci, 95, 8268-73.

Hannum SM, Schmitz HH, Keen CL, 2002. Chocolate: A heart-healthy food? Show me the science. Nutr Today, 37, 103-09.

Haslam E, 1980. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the aging of red wines. Phytochemistry, 19, 2577-82.

Haslam E, 1989. Polyphenols (vegetable tannins) as drugs. Cambridge, Cambridge University Press, p. 1-89.

Haslam E, 1998. Polyphenols: structure and biosynthesis. In: practical polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action. Eds: Haslam E. Cambridge, U.K: Cambridge University Press, p. 10-83.

Heyser CJ, Hampson RE, Deadwyler SA, 1993. Effects of Δ9- tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. J Pharmacol Exp Ther, 264, 294-307.

Higdon JV, Frei B, 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit Rev Food Sci Nutr 43, 89-143.

Hirvonen J, Goodwin RS, Li CT, Terry GE, Zoghbi SS, Morse C, Pike VW, Volkow ND, Huestis MA, Innis RB, 2012. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabidiol CB1 reseptors in chronic Daily cannabis smokers. Mol Psychiatry, 17, 642-49.

Ho SC, Hwang LS, Shen YJ, Lin C, 2007. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (Dimocarpus longan Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. J Agric Food Chem, 55, 10664-70.

Hollman PCH, Hertog MLG, Katan MB, 1996. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and corronary heart disease. Biochem Soc Transac, 24, 785-89.

Hollman PCH, Katan MB, 1997. Absorption, metabolism and healt effect of dietary flavoids in man. Biomed Pharmacother, 51, 305-10.

Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Frage CG, Schmits HH, Keen CL, 2002. Procyanidin dimer B2 (epicatechin-(4beta-8)- epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. Am J Clin Nutr, 76, 798-804.

Houde V, Grenier D, Chandad F, 2006. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. J Periodontol, 77, 1371-79.

Howell AB, 2002. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary health. Crit Revs Food Sci Nutr, 76, 798-804.

Howell AB, Reed LD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M, 2005. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. Phytochemistry, 66, 2281-91.

Hsieh TC, Wu JM, 2008. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. Int Oncol, 33, 851-59.

Hsu S, Yu FS, Lewis J, Singh B, Borke J, Osaki T, Athar M, Schuster G, 2002. Induction of p57 is required for cell survival when exposed to green tea polyphenols. Anticancer Res, 22, 4115-20.

Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, Porter AG, Schuster G, 2003. Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cells inducing caspase 3- dependent apoptosis. Anticancer Res, 23, 1533-39.

Hsu S, Singh B, Schuster GS, 2004. Inducing apoptosis in oral cancer cells. Oral Oncol, 40, 461-73.

Hsu CP, Lin YH, Chou CC, Zhou SP, Hsu YC, Liu CL, Ku FM, Chung YC, 2009. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells. Anticancer research, 29, 283-90.

Hsu CP, Lin YH, Zhou SP, Chung YC, Lin CC, Wang SC, 2010. Longan flower extract inhibits the growth of colorectal carcinoma. Nutr Cancer, 62, 229-36.

Huang PL, Chi CW, Liu TY, 2010. Effects of Areca catechu L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo. Food Chem Toxciolog, 48:1, 306-13.

Iffland K, Grotenhermen F, 2017. An update on safety and side effects of cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies on chronic CBD administration. Cannabis and Cannabinoid Res, 2, 139-54.

Imai K, Nakachi K, 1995. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. Br Med J, 310, 693-96.

Imparl-Radosevich J, Deas S, Polansky MM, Baedke DA, Ingebritsen TS, Anderson RA, Graves DJ, 1998. Regulation of PTP-1 and insulin receptor kinase by fractions from cinnamon. Implications for cinnamon regulation of insulin signaling. Horm Res, 50, 177-82.

Ioannides C, Yoxall V, 2003. Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols. Cur Op Clin Nutr Met Care, 6, 649-56.

Isbrucker RA, Bausch J, Edwards JA, Wolz E, 2006. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. Food Chem Toxicol, 44, 626-35.

Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, Steardo L, 2009. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? CNS Neurosci Ther, 15, 65-75.

Izzo AA, Coutts AA, 2005. Cannabinoids and the digestive tract. Handb Exp Pharmacol, 168, 573-98.

Izzo AA, Camilleri M, 2009. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. Pharmacol Res, 60, 117-25.

Izzo AA, Sharkey KA, 2010. Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. Pharmacol Ther, 126, 21-38.

Jamontt JM, Molleman A, Pertwee RG, Parsons ME, 2012. The effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis. Br J Pharmacol, 160, 712-23.

Jassim SA, Naji MA, 2003. Novel antiviral agents: a medical plant perspective. J Appl Microbiol, 95(3), 412-27.

Jaszewska E, Kosmider A, Kiss AK, Naruzzewicz M, 2010. Oenothera paradoxa defatted seeds extract containing pentagalloylglucose and procyanidins potentiates the cytotoxicity of vincristine. J Physiol Pharmacol, 61, 637-43.

Jatoi A, Windschiti HE, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhii SR, Mailliard JA, Pundaleeka S, Kardinal CG, Fitch TR, Krook JE, Novotny PJ, Christensen B, 2002. Dronabinol versu megestrol acetate versu combination therapy for cancer-associated anorexia: a north central cancer treatment group study. J Clin Oncol, 20, 567-73.

Javid FA, Afshinjavid S, Philips RJ, Stott CG, Ayerakwa L, 2011. The effect of CBD (BDS) botanical cannabinoid extraction on MCF-7 human breast carcinoma cells. In: 21st Annual symposium of the international cannabinoid research society, Pheasant Run, St. Charles Illinois, USA, p120.

Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK, 2001. Antioxidant activitiy of grape seed (Vitis vinefera) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chem, 73, 285-90.

Jochmann N, Baumann G, Stangl V, 2008. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 11, 758-65.

Johnson JJ, Bailey HH, Mukhtar H, 2010. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. Phytomedicine, 17, 3-13.

Jones G, Pertwee RG, 1972. A metabolic interaction in vivo between cannabidiol and 1-tetrahydrocannabinol. Br J Pharmacol, 45, 375-77.

Kahkonen MP, Hopia AI, Heinonen M, 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. J Agric Food Chem, 49, 4076-82.

Kanda T, Akiyama H, Yanagida A, Tanabe M, Goda Y, Toyoda M, Teshima R, Saito Y, 1998. Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL2H3 cells and rat mast cells. Biotechnol Biochem, 62, 1284-89.

Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H, 1992. Green tea in chemoprevention of cancer. Compr Ther, 18, 3-8.

Katiyar SK, 2016. Emerging phytochemicals for the prevention and treatment of head and neck cancer. Molecules, 21, E1610.

Kato MT, Magalhaes AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA, 2009. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. J Appl Oral Sci, 17, 560-64.

Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C, 2006. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. Clin Cancer Res, 12, 6194-02.

Khan A, Safdar M, Khan A, Khattak KN, Anderson RA, 2003. Cinnamon improves glucose and lipids o people with type 2 diabetes. Diabetes Care, 26, 3215-18.

Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H, 2006. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallete. Cancer Res, 66, 2500-05.

Kim H, Keeney PG, 1984. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. J Food Sci, 49, 1090-92.

Kim H, 2005. New nutrition, proteomics, and how both can enhance studies in cancer prevention and therapy. J Nutr, 135, 2715-18.

Kim A, Chiu A, Barone MK, Avino D, Wang F, Coleman CI, Phung OJ, 2011. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: A systematic review and meta-analysis. J Am Diet Assoc, 111, 1720-29.

Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Ariga T, 1999. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. J Agric Food Chem, 47, 1892-97.

Kondo K, Kurihara M, Fukuhara K, Tanaka T, Suzuki T, Miyata N, Toyoda M, 2000. Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. Tetrahedron Letters, 41,485-88.

Kozikowski AP, Tückmantel W, Böttcher G, Romanczyk LJ, 2003. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity 4(1) synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all -4beta, 8-interflaven connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. J Org Chem, 68, 164-258.

Kris-Etherton PM, Lefevre M, Beecher GR, Gross MD, Keen CL, Etherton TD, 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. Ann Rev Nutr, 24, 511-38.

Krueger CC, Dopke NC, Treidchel PM, Folts J, Reed JD, 2000. Matrix-assisted LASER desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed exract. J Agric Food Chem, 48, 1663-67.

Kumar N, Shibata D, Helm J, Coppola D, Malafa M, 2007. Green tea polyphenols in the prevention of colon cancer. Front Biosci, 12, 2309-15.

Kurahashi N, Sasazuki S, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S, JPHC Study Group, 2008. Green tea consumption and prostate cancer risk in japanese men: a prospective study. Am J Epidemiol, 167, 71-77.

Labarbe B, Cheynier V, Brossaud F, Souquet JM, Moutounet M, 1999. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. J Agric Food Chem, 47, 2719-23.

Lahat A, Lang A, Ben-Horin S, 2012. Impact of cannabis treatment on the quality of life, weight and clinical disease activity in inflammatory bowel disease patients: a pilot prospective study. Digestion, 85, 1-8.

Lal S, Prasad N, Ryan M, Tangri S, Silverberg MS, Gordon A, Steinhart H, 2011. Cannabis use amongst patients with inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol, 23, 891-896.

Lambert JD, Yang CS, 2003. Cancer chemopreventive activitiy and bioavailability of tea and tea polyphenols. Mutat Res, 523-524, 201-208.

Lambert RJ, Elias RJ, 2010. The antioxidant and prooxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. Arch Biochem Biophys, 501, 65-72.

Lea AGH, 1978. The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. J Sci Food Agric, 29, 471-77.

Lea AGH, Arnold GM, 1978. The phenolic of cider: bitterness and astringeney. J Sci Food Agric, 29, 478-83.

Lee YH, Kwak J, Choi HK, Choi KC, Kim S, Lee J, Jun W, Park HJ, Yoon HG, 2012. EGCG supresses prostate cancer cell growth modulating acetylation of androgen receptor by anti-histone acetyltransferanse activity. Int J Mol Med, 30, 69-74.

Li Y, Sun Y, Si M, 2018. Grape seed procyanidins induces apoptosis and inhibits proliferation of osteosarcomas cells in vitro. Int J Clin Exp Med, 11, 6483-90.

Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V, 2006. Antitumor activity of plant cannabinoid with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. J Phatmacol Exp Ther, 318, 1375-87.

Lin XH, Yuece B, Li YY, Feng YJ, Feng JY, Yu LY, Li K, Li YN, Storr M, 2011. A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. Neurogastroenterol Motil, 23, 862-e342.

Linseisen J, Rohrmann S, 2008. Biomarkers of dietary intake of flavonoids and phenolic acids for studying diet-cancer relationship in humans. Eur J Nutr, 47, 60-68.

Liviero L, Puglisi PP, Morazzoni P, Bombardelli E, 1994. Antimutagenic activity of procyanidins from Vitis vinifera. Fitoterapia LXV, 203-09.

Lou H, Yamazaki Y, Sasaki T, Uchida M, Tanaka H, Oka S, 1999. A-type proanthocyanidins from peanut skins. Phytochemistry, 51, 297-308.

Luan YY, Liu ZM, Zhong JY, Yau RY, Yu HS, 2015. Effect of grape seed proanthocyanidins on tumor vasculogenic mimicry in human triple-negative breast cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev, 16, 531-35.

Lukhele ST, Motadi LR, 2016. Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. BMC Complement Altern Med, 16, 335.

Macheix JJ, Fleuriet Ave Billot J, 1990. Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. In: fruit phenolics. Eds: Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Boca, Raton, FL: CRC Press, p. 149-234.

Maffei FR, Carini M, Aldini G, Calloni MT, Bombardelli E, Morazzoni P, 1998. Sparing effect of procyanidins from vitis vinifera on vitamin E: In vitro studies. Planta Medica, 64343-347.

Mantena SK, Baliga MS, Katiyar SK, 2006. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. Carcinogenesis, 27, 1682-91.

Mao TK, Powell JJ, van de Water L, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME, 1999. The influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells. Int J Immunother, XV, 23-29.

Mao T, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Hammerstone JF, Gershwin ME, 2000a. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 beta in peripheral blood mononuclear cells. Life Sci, 66, 1377-86.

Mao T, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME, 2000b. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. J Nutr, 130, 2093-99.

Mao T, Powell J, Van de Water J, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME, 2002. Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. J Med Food 5:17-22.

Marshall JR, 2008. Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. Gastroenterol Clin North Am, 37, 7382.

Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B, 2004. The endogenous cannabinoid system protects egainst colonic inflammation. J Clin Invest, 113, 1202-09.

McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY, 2007. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in agressive breast cancer cells. Mol Cancer Ther, 6, 2921-27.

McAllister SD, Murase R, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Allison J, Almanza C, Pakdel A, Lee J, Limbad C, Liu Y, Debs RJ, Moore DH, Desprez PY, 2011. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. Breast Cancer Res Treat, 129, 37-47.

McMurrough I, Baert T, 1994. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. J Inst Brew, 100, 409-16.

Mechoulam R, Shani A, Edery H, Grunfeld Y, 1970. Chemical basis of hashish activity. Science, 169, 611-12.

Mechoulam R, Shvo Y, 1963. Hashish. I. The structure of cannabidiol. Tetrahedron 19, 2073-78.

Meeran SM, Katiyar SK, 2007. Grapeseed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdki-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. Exp Dermatol, 16, 405-15.

Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, Ross SA, Khan IA, ElSohly MA, 2010. Potency trends of Δ9-THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. J Forensic Sci, 55, 1209-17.

Meltzer SM, Monk BJ, Tewari KS, 2009. Green tea catechins for treatment of extemal genital warts. Am J Obstet Gynecol, 200, 233, e1-7.

Middleton E, Kandaswami C, 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. Ed: Harborne JB. London: Chapman and Hall, p. 619-52.

Mikuriya TH, 1969. Marijuana in medicine: past, present and future. California Medicine, 110, 34-40.

Monagas M, Gomez-Cordoves C, Bartolome B, Laureano O, Ricardo da Silva JM, 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. J Agric Food Chem, 51, 6475-81.

Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G, 2007. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. Lancet, 370, 319-28.

Morimoto S, Nonaka GI, Nishioka I, 1986. Tannins and related compounds. XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark (Cinnamomun cassia). Chem Pharm Bull, 34, 633-42.

Mukhtar H, Ahmad N, 1999. Green tea in chemoprevention of cancer. Toxicol Sci, 52, 111-17.

Munro S, Thomas KL, Abu Shaar M, 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature (London), 365, 61-65.

Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y, 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 32, 613-22.

Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ, 2003. Dietary flavonols and procyanidin oligomers from cocoa (theobroma cacao) inhibit platelet function. Am J Clin Nutr, 77, 1466-73.

Nie C, Zhau J, Qin X, Shi X, Zeng Q, Liu J, Yan S, Zhang L, 2016. Reduction of apoptosis by proanthocyanidin-induced autophagy in the human gastric cancer cell line MGC-803. Oncol Rep, 35, 649-58.

Nishida S, Satoh H, 2003. Mechanisms for the vasodilation induced by Gingko biloba extract and its main consitituent, bilobide in rat aorta. Life Sci, 72, 2659-67.

Notaro A, Sabella S, Pellerito O, Di Fiore R, De Blasio A, Vento R, Calvaruso G, Giuliano M, 2014. Involvement of PAR-4 in cannabinoid-dependent sensitization of osteosarcoma cells toTRAIL-induced apoptosis. Int J Biol Sci, 10, 466-78.

Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, Gasperini C, Pozzilli C, Cefaro L, Comi G, Rossi P, Ambler Z, Stelmasiak Z, Erdmann A, Montalban X, Klimek A, Davies P, Sativex Spasticity Group, 2011. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel -group, enriched-desing study of nabiximols (Sativex), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused bu multiple sclerosis. Eur J Neurol, 18, 1122-31.

Noyes R Jr, Brunk SF, Baram DA, Canter A, 1975. Analgenic effect of Δ-9 tetrahydrocannabinol. J Clin Pharmacol, 15, 139-43.

Oesch S, Walter D, Wachtel M, Pretre K, Salazar M, Guzman M, Velasco G, Schafer BW, 2009. Cannabinoid receptor 1 is a potential drug target for treatment of translocation-positive rhabdomyosarcoma. Mol Cancer Ther 8, 1838-45.

Ogawa S, Kimura H, Niimi A, KatsubeT, Jisaka M, Yokota K, 2008. Fractionation and structural characterization of polyphenolic antioxidants from seed shells of japanese horse chestnut (aesculus turbinata Blume). J Agric Food Chem, 56, 12046-51.

Okuda T, Yoshida T, Hastano T, 1989. New methods of analyzing tannins. J Nat Prod, 52, 1-31.

Okuda T, Yoshida T, Hastano T, 1995. Fractionation of plant polyphenols. In chromatographic science series. Centrifual partition chromatography. Eds: Foucault AP. Dekker M. New York. 68, p.71-97.

Olah A, Toth BI, Borbiro I, Sugawara K, Szöllösi AG, Czifra G, Pal B, Ambrus L, Kloepper L, Camera EM, Ludovici M, Picardo M, Voets T, Zouboulis CC, Paus R, Biro T, 2014. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effect on human sebocytes. J Clin Inves, 124, 3713-24.

Olmos M, Vetrone S, 2018. Investigating the effect of the cannabidiol on cancer cells. Poster 1, Creveling 9, 17.11.2018. Life Science Poster.

Ostenfeld T, Price J, Albanese M, Bullman J, Guillard F, Meyer I, Leeson R, Costantin C, Ziviani L, 2011. A randomized, controlled study to investigate the analgesic efficacy of single doses of the cannabinoid receptor-2 agonist GW842166, ibuprofen or placebo in patients with acute pain following third molar tooth extraction. Clin J Pain, 27, 668-76.

Özen FS, 2012. Kızılcık proantosiyanidinlerinin ve moleküler bileşenlerini meydana getiren kateşin ve epikateşinin anti-rotavirus aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Packer L, Rimmbach G, Virgili F, 1999. Antioxidant activitiy and biologic properties of a procyanidin-rich exract from pine (Pinus maritima) bark, pycnogenol. Free Radical Biol Med, 27, 704-24.

Pacher P, Batkai S, Kunos G, 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rew, 58, 389-462.

Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, El-Nagar A, den Hollander P, Liu D, Hittelman WN, Hong WK, 2001. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: Role in response to chemoprevention and cancer development. Clin Cancer Res, 7, 3127-34.

Pearson DA, Schmitz HH, Lazarus SA, Keen CL, 2001. Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. Meth Enzymol, 335, 350-60.

Pertwee RG, 2006. Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. Br J Pharmacol, 147, 163-71.

Pertwee RG, 2008. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ9-tetrahydrocannabinol. Cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabivarin. Br J Pharmacol, 153, 199-215.

Peterson J, Dwyer J, 1998. Flavonodis: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutr Res, 18, 1995-2018.

Peynaud E, Ribereau-Gayon P, 1971. The grape. The biochemistry of fruits and their products. Eds: Hulme AC. London, Academic Press. p.172-204.

Pinsger M, Schimetta W, Volc D, Hiermann E, Riederer F, Pölz W, 2006. Bennefits of an add-on treatment with the synthetic cannabinomimetic nabilone on patients with chronic pain-a randomized controlled trial. Wien Klin Wochenschr, 118, 327-35.

Porter LJ, 1988. Flavans and proanthocyanidins. In the flavanoids: advances in research since 1980. Eds: Harborne JB. New York, Chapman and Hall, p.21.

Porter LJ, 1994. Flavans and proanthocyanidins. In the flavonoids: advances in research since 1986. Eds: Harborne JB. London, Chapman Hall, 23-55.

Porter ML, Krueger CG, Wiebe DA, Cunningham DG, Reed JD, 2001. Cranberry proanthocyanidins associate with low-density lipoprotein and inhibit in vitro Cu^{2+}-induced oxidation. J Sci Food Agric 81, 1306-13.

Potenza MA, Marasciula FL, Tarqunio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M, 2007. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. Am J Physiol Endocrinol Metab, 292, 1378-87.

Potter DJ, Clark P, Brown MB, 2008. Potency of Δ9-THC and other cannabinoids in cannabis in England in 2005: implications for psyhoactivity and pharmacology. J Forensic Sci, 53, 90-94.

Prasad R, Vaid M, Katiyar SK, 2012. Grape proanthocyanidin inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo through induction of apoptosis and by targeting the PII3K/Akt pathway, PLoS one, 7, e43064.

Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M, 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins form grape seeds. Phytochem, 36, 781-84.

Prior RL, Gu L, 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. Phytochem, 66, 2264-80.

Putter M, Grotemeyer KH, Wurthwein G, Araghi-Niknam M, Watson RR, Hosseini S, Rohdewald P, 1999. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. Thromb Res, 95, 155-61.

Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F, 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. J Ethnopharmacol, 72, 35-42.

Raz R, Chazan B, Dan M, 2004. Cranberry juice and urinary tract infection. Clin Infect Dis, 38, 1413-19.

Reddivari L, Charepalli V, Radhakrishnan S, Vadde R, Elias RJ, Lambert JD, Vanamala JK, 2016. Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. BMC Complement Altern Med, 16, 278.

Reed JD, 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J Anim Sci, 73, 1516-28.

Reed J, 2002. Cranberry flavonoids atherosclerosis and cardiovascular health. Crit Rev Food Sci Nutr, 42, 301-16.

Reed JD, Krueger CG, Vestling MM, 2005. MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. Phytochem, 66, 2248-63.

Ren F, Zhang S, Mitchell SH, Butler R, Young CY, 2000. Tea polyphenols down-regulate the expression of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. Oncogene, 19, 1924-32.

Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Imeida CM, 2007. Chemical composition of green tea (Camellia sinensis) infusions commercialized in portugal. Plant Foods Hum Nutr, 62, 139-44.

Ricardo da Silva JM, Rigaud J, Cheynier V, Cheminat A, Moutounet M, 1991. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. Phytochem, 30, 1259-64.

Rice-Evans CA, Miller NJ, 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochem Soc Transactions, 24, 790-95.

Rigaud J, Escribano-Bailon MT, Prieur C, Souquent JM, Cheynier V, 1993. Normal phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. J Chromatogr A, 654, 255-60.

Ross R, 1999. Atherosclerosis-An inflammatory disease. N Engl J Med, 340, 115-26.

Russo EB, Guy GW, Robson PJ, 2007. Cannabis, pain, and sleep: Lessons from therapeutic clinical trials of sativex, a cannabis-based medicine. Chem&Biochem, 4, 1729-43.

Russo EB, 2011. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. Br J Pharmacol, 163, 1344-64.

Saint-Cricq de Gaulejac N, Provost C, Vivas N, 1999. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. J Agri Food Chem, 47, 425-31.

Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S, 2005. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. Free Radic Biol Med, 39, 1041-49.

Salles EL, Khodadadi H, Jarrahi A, Ahluwalia M, Paffaro Jr VA, Costigliola V, Yu JC, Hess DC, Dhandapani KM, Baban B, 2020. Cannabidiol (CBD) modulation of apelin in acute respiratory distress syndrome. J Cell Mol Med, 24, 12869-72.

Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS, 1989. Dietary tannins: Consequences and remedies. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.

Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M, 2003. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. Biosci Biotechnol Biochem, 67, 1140-43.

Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau JF, 1999. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (Malus domestica sp.). J Agric Food Chem, 47, 4847-53.

Santos-Buelga C, Francia-Aricha EM, Escribano-Bailon MT, 1995. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. Food Chem, 53, 197-201.

Santos-Buelga C, Scalbert A, 2000. Proanthocyanidins and tanin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. J Sci Food Agric, 80, 1094-1117.

Sato M, Maulik N, Das DK, 2002. Cardioprotection with alcohol: Role of both alcohol and polyphenolic antioxidant. Ann NY Acad Sci, 957, 122-35.

Scalbert A, 1991. Antimicrobial properties of tanin. Phytochem, 30, 3875-83.

Scalbert A, Williamson G, 2000. Dietary intake and bioavailabilitty of polyphenols. J Nutr, 130, 2073-85.

Schicho R, Storr M, 2012. Topical and systemic cannabidiol improves trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. Pharmacol, 89, 149-55.

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German J, Keen CL, 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. Am J Clin Nutr, 73, 36-40.

Schramm L, 2013. Going green: The role of the green tea component EGCG in chemoprevention. J Carsinog Mutagen, 4, 1000142.

Shanmuganayagam G, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JG, 2002. Grape seed and grape skin extrach elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individuelly in dogs and humans. J Nutr, 132, 3592-98.

Sharma M, Hudson JB, Adomat H, Guns E, Cox ME, 2014. In vitro anticancer activity of plant-derived cannabidiol on prostate cancer cell lines. Pharmacol Pharmacy, 5, 806-20.

Shimizu M, Fukutomi Y, Ninomiya M, Nagura K, Kato T, Araki H, Suganuma M, Fujiki H, Morivaki H, 2008. Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: A pilot study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 17, 3020-25.

Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A, 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. Mol Cancer Ther, 10, 1161-72.

Singh AP, Singh RK, Kim KK, Satyan KS, Nussbaum R, Torres M, Brard L, Vorsa N, 2009. Cranberry proanthocyanidins are cytotoxic to human cancer cells and sensitize platinium-resistance ovarian cancer cells to paraplatin. Phytother Res, 23, 1066-74.

Singh AP, Lange TS, Kim KK, Brard L, Horan T, Moore RG, Vorsa N, Rakesh K, 2012. Purified cranberry proanthocyanidines (PAC-1A) cause pro-apoptotic signaling, ROS generation, cyclophosphamide retention and cytotoxicity in high-risk neuroblastoma cells. Int J Oncol, 40, 99-108.

Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M, 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. Phytochem, 43, 509-12.

Struwe M, Kaempfer SH, Geiger CJ, Pavia AT, Plasse TF, Shepard KV, Reis K, Evans TG, 1993. Effect of dronabiol on nutritional status in HIV infection. Ann Pharmacother 27, 827-31.

Su X, Howell AB, D'Souza DH, 2010a. The effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on the infectivity of human enteric viral surrogates. Food Microbiol, 27, 535-40.

Su X, Howell AB, D'Souza DH, 2010b. Antiviral effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates-a time dependence study in vitro. Food Microbiol, 27, 985-91.

Sun Q, Prasad R, Rosenthal E, Katiyar SK, 2011. Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasive potential of head and neck cutaneous squamous cell carcinoma cells by targeting EGFR

expression and epithelial-to-mesenchymal transition. BMC Complement Altern Med, 11, 134.

Surh YJ, 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer, 3, 768-80.

Suzuki-Sugihara N, Kishimoto Y, Saita E, Taguchi C, Kobayashi M, Ichitani M, Ukawa Y, Sagesaka YM, Sszuki E, Kondo K, 2016. Green tea carechins prevent low-density lipoprotein oxidation via their accumulation in low- density lipoprotein particles in humans. Nutr Res, 36, 16-23.

Takahashi T, Kamiya T, Hasegawa A, Yokoo Y, 1999. Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells in vitro and activate hair follicle growth in vivo. J Invest Derma, 112, 310-16.

Thompson RS, Jacques D, Haslam E, Tanner RJN, 1972. Plant proanthocyanidins. PartI. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. J Chem Soc Perkin Trans, 1, 1387-99.

Turner CE, Elsohly MA, Boeren EC, 1980. Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents. J Nat Prod, 43, 169-234.

Turner CE, Elsohly MA, 1981. Biological activity of cannabichromene, its homologs and isomers. J Clin Pharmacol, 21, 283-91.

Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wachter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillen JM, 1996. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth four selected human tumor cell lines. Anticancer Drugs, 7, 461-68.

Van Der Sluis AA, Dekker M, Skrede G, Jongen WM, 2002. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. J Agric Food Chem, 50, 721-29.

Vanden BW, 2012. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. Pharmacol Res, 65, 565-76.

Vandrey RG, Budney AJ, Hugnes JR, Liguori, 2008. A within-subject comparison of withdrawal symptoms during abstinence from cannabis, tobacco, and both substances. Drug Alcohol Depend, 92, 48-54.

Volicer L, Stelly M, Morris J, McLaughlin J, Volicer BJ, 1997. Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer s disease. Int J Geriatr Psychiat, 12, 913-19.

Waghorn GC, McNabb WC, 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. Proc Nutr Soc, 62, 383-92.

Wan L, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM, 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibilty and prostaglandin concentrations in humans. Am J Clin Nutr, 74, 596-602.

Watanabe M, 1998. Catechins as antioxidants from buckwheat (fagopyrum esculentum moench) groats. J Agric Food Chem, 46, 839-45.

Weinreb O, Amit T, Mandel S, Youdim MB, 2009. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: A reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. Genes Nutr, 4, 283-96.

Weisburg JH, Weissman DB, Sedaghat T, Babich H, 2004. In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from human oral cavity. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 95, 191-200.

Weisburger JH, 1999. Tea and health: the underlying mechanisms. Proc Soc Exp Biolog Med, 200, 271-75.

Weisburger JH, 2001. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. Exp Biol Med, 226, 891-7.

Williamson G, Manach C, 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. Am J Clin Nutr, 81, 243-55.

Wolfram S, 2007. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. J Am Coll Nutr, 26, 373-88.

Wu D, Guo Z, Ren Z, Guo W, Meydani SN, 2009. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. Free Radic Biol Med, 47, 636-43.

Yamamoto T, Staples J, Wataha J, Lewis J, Lockwood P, Schoenlein P, Rao S, Osaki T, Dickinson D, Kamatani T, Schuster G, Hsu S, 2004. Protective effects of EGCG on salivary gland cells treated with γ-radiation or cis-platinum (II) diammine dichloride. Anticancer Res, 24, 3065-74.

Yang CS, Lee MJ, Chen L, 1999. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 8, 83-9.

Yang CS, Maliakal P, Meng X, 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 42, 25-54.

Yang G, Shu XO, Li H, Chow WH, Ji BT, Zhang X, Gao YT, Zheng W, 2007. Prospective cohort study of green tea consumption and colorectal cancer risk in women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 16, 1219-23.

Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T, 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. Phytother Res, 1, 44-7.

Yuan JM, 2011. Green tea and prevention of esophageal and lung cancers. Mol Nutr Food Res, 55, 886-904.

Zhao M, Yang B, Wang J, Liu Y, Yu L, Jiang Y, 2007. Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (Litch chinensis) pericarp. Int Immunopharmacol, 7, 162-66.

Zuardi AW, Crippa JAS, Hallak JEC, Moreira FA, Guimaraes FS, 2006. Cannabidiol, a cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. Braz J Med Biol Res, 39, 421-29.

Zuardi AW, Hallak JE, Crippa JA, 2011. Interaction between cannabidiol (CBD) and Δ-(9)-tetrahydrocannabinol (THC) influence of administration interval and dose ratio between the cannabinoids and psycharmacology (Berl), 219, 247-49.

7. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Konya'da doğdu. Lisans Eğitimini 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Yüksek Lisans eğitimini 2012 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalı (Vet)'nda tamamladı. 2012 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (Vet)'nda başladığı Doktora eğitimini sürdürmektedir.