

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANADOLU'DA YETİŞTİRİLEN BAZI ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.)
ÇEŞİTLERİNİN BİYOKİMYASAL İÇERİĞİNİN, ANTI-KANSER
VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI

**Danışman Prof. Dr. Talip ÇETER
Jüri Üyesi Doç. Dr. Cemil İŞLEK
Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Aşlı UĞURLU BAYARSLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU-2019

TEZ ONAYI

Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI tarafından hazırlanan “Anadolu’da Yetiştirilen Bazı Üzüm (*Vitis vinifera* L.) Çeşitlerinin Biyokimyasal İçeriğinin, Anti Kanser ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Talip ÇETER
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi Doç. Dr. Cemil İŞLEK
Ömer Halisdemir Üniversitesi



Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU BAYARSLAN
Kastamonu Üniversitesi



28/08/2019

Enstitü Müdürü Doç. Dr. Nur BELKAYALI



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.



Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU'DA YETİŞTİRİLEN BAZI ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNİN BİYOKİMYASAL İÇERİĞİNİN, ANTI-KANSER VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Talip ÇETER

Bu çalışmanın amacı Anadoluda yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinin biyokimyasal içerikleri, antikanser ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesidir. Çalışmada özel bir firmanın Kırşehir bağlarından 8 adet (Narince, Boğazkere, Viognier, Kalecik karası, Malbec, Sauvignon blanc, Öküzgözü ve Syrah) beyaz ve kırmızı üzüm (*Vitis vinifera*) çeşidi toplanmış, uygun koşullarda laboratuvara getirilerek iyice yıkanıp saplarından ayıklandıktan sonra 70:30 etanol:su çözeltisi içerisinde ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

GC-MS temelli karakterizasyon metotları gerçekleştirilerek üzüm ekstraktları içerisindeki organik moleküllerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Örneklerin antioksidant özellikleri DPPH radikal süpürme yöntemine göre belirlenmiş ve askorbik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. Örneklerin antikanser aktivitesini belirlemek amacıyla özütlerin HuH-7 hücre serisi üzerine etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Çalışma sonuçları üzüm ekstratlarının kanser hücrelerinin büyümesini üzüm çeşidine göre değişmekle birlikte farklı oranlarda baskıladığını göstermiştir. Kanser hücreleri üzüm özütleri ile 24 saat muamele edildiğinde gözlemlenen büyüme baskılaması %14 ila %30 arasında tespit edilmiştir. 72 saatlik muamele sonucunda ise %14 ila %40 arasında baskılanma tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar büyümede gözlemlenen baskılanmanın üzümün çeşidine ve üzüm çeşitlerinin sahip olduğu fenolik içerik ve antioksidan aktivitesi ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda gerek biyokimyasal içeriğe göre değiştiğini gerekse antioksidan ve antikanser etkinlik bakımından en etkili üzüm çeşidinin Narince olduğu ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Anti-kanser, anti-oksidadn, biyokimyasal içerik, üzüm çeşitleri, *Vitis vinifera*.

2019, 47 sayfa
Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF THE BIOCHEMICAL CONTENT, ANTI-CANCER AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME GRAPE (*Vitis vinifera* L.) CULTIVAR CULTIVATED IN ANATOLIA

Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Graduate School of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Talip ÇETER

Abstract: The goal of this study was to examine some Anatolian grape species for their biochemical content, anticancer and antioxidant activities. The used eight type of white and red grapes (*Vitis vinifera*) including Narince, Boğazkere, Viognier, Kalecik karası, Malbec, Sauvignon Blanc, Öküzgözü and Syrah were collected in vineyards of a private company in Kırşehir. The collected grapes were protected under appropriate conditions to bring to the lab, where the grape beads were rinsed and underwent extraction in 70:30 ethanol:water solvent system.

GC-MS based techniques were utilized to characterize organic molecules found in the extracts. Antioxidant capacity of the samples were evaluated using DPPH radical scavenging assay, where ascorbic acid was used as reference reducing agent. Huh-7 cells were used to determine anticancer activity of the extracts, for which MTT tests were preferred. The anticancer studies revealed that all the extracts suppressed cancerous cell growth, where the suppression degree showed dependence on the grape type. 24-h treatment of the cells with the extracts resulted in 14-30 %suppression while that was between 14 and 40 %for 72-h treatment. The obtained results showed correlation with the phenolic content of the grape species. The species Narince gave the very characteristic biochemical content and the strongest anticancer potentials.

Key Words: Anticancer, antioxidant, biochemical content, grape type, *Vitis vinifera*.

2019, 47 pages

Science Code: 203

TEŞEKKÜR

Güllerle dolu bir yol değildi ve olması da beklenemezdi. Bununla birlikte bu yol, hedefime ulaşmamda beni destekleyenlerle doluydu.

Yüksek lisans tezimi tamamlamamdan ve Yüksek Lisans derecesini almaktan dolayı gururlu olduğumu belirtir, çaişma sonuçlarının bu alnadan çalışanlara faydalı olmasını dilerim.

İlk olarak çalışmalarım boyunca sabır, güç ve irade veren Allah (cc) şükranlarımı sunmak istiyorum. İkinci teşekkürümü yurt dışında (Türkiye’de) okuma fırsatını bana sunan, okul ve barınmam için maddi destek sağlayan Libya Devletine sunmak istiyorum.

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirmeyen, değerli fikirleri ve yönlendirmeleriyle bana yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Talip ÇETER’e içten saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca arazi çalışması ile üzüm örneklerini toplayan Yüksek lisans öğrencisi Sayın Kutlu SALİHOĞLU ve örneklerin ekstraksiyon işlemlerinde yardımcı olan Uzman Biyolog Seda ÇİÇEK’e katkıları için teşekkür ederim. Tezim Biyokimyasal analiz ve antioksidan bölümlerinin laboratuvar çalışmasına sağladıkları desteklerden dolayı sayın Dr. İdris YAZGAN ve Dr. Hafize Dilek TEPE’ye, ve tezin antikanser kısmında yardımcı olan sayın Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU BAYARSLAN’a ayrı ayrı şükranlarımı sunarım.

Ayrıca üzüm örneklerinin sağlanması aşamasında, Kavaklıdere Şarapçılık A.Ş. Bağlar Direktörü Ahmet GÜRBÜZ, Ankara Bağlar Müdürü Ergün GÜMÜŞ, Kırşehir Bağlar Sorumlusu Özgür MERT ve Bağ İşçisi Halis CAMUŞ’a çalışmamıza verdikleri destek için teşekkür ederim.

Çalışmamı, sabırsızca bugünü bekleyen babamın ruhuna armağan ediyorum. Aileme ve her daim bana dua eden anneme teşekkür ederim. Kardeşim Basheer ve kocam Khaled’e maveni destekleri için teşekkür ederim.

Bu basamakta yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Onların kıymetli destekleri olmadan bu tez çalışması bitmezdi.

Son olarak inşallah Allah (cc) yakın zamanda Doktora derecesi almayı da nasip eder.

Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI
Kastamonu, Ağustos, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xii
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Fitokimyasallar.....	4
1.2. Çalışılan Bitki Örnekleri.....	6
1.2.1. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Syrah.....	6
1.2.2. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Öküzgözü.....	7
1.2.3. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Narince.....	8
1.2.4. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Boğazkere.....	8
1.2.5. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Viognier.....	9
1.2.6. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Kalecik Karası.....	9
1.2.7. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Malbec.....	10
1.2.8. <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Sauvignon Blanc.....	10
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Üzüm Örnekleri.....	16
3.2. Numunelerin Ekstraksiyonu.....	17
3.3. Sitotoksisite Testi İçin Kullanılan Aletler ve Sarf Malzemeleri.....	18
3.4. Hücre Kültürü.....	18
3.5. MTT Metodu.....	19
3.6. Genel Materyaller.....	19
3.7. Örneklerin Biyokimyasal İçerik Analizi.....	20
3.8. Üzümün Antioksidan Etkisinin Belirlenmesi.....	20
3.9. Üzüm Özütlerinin Antikanser Etkisinin Belirlenmesi.....	21
3.9.1. Araştırma Metotları.....	21
3.9.2. Hücre Hattı.....	21
3.9.3. HuH-7 Hücre Hattının Karakteristikleri.....	22
3.9.4. Bitki Özütü Hazırlanması.....	22
3.9.5. Hücre Kültürü.....	23
3.9.6. MTT Metodu.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Üzüm İçeriğinin Analizi.....	24
4.2. Üzüm Örneklerinin Antioksidan Sonuçları.....	26
4.3. Antikanser Testlerinin Sonuçları.....	26
5. TARTIŞMA.....	40

6. SONUÇ	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	47



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler
%

Yüzde

Kısaltmalar

AGC	Tipik olmayan salgı hücresi
BME	Eagle temel ortamı
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle ortamı
DPPH	1.1-Difenil-2-pikrilhidrazil
FBS	Fötal Sığır serumu
g	Gram
GC	Gaz kromatografisi
ICP-OES	İndüktif bileşenli plazma atomic emisyon spektrometri
kg	Kilogram
mM	Milimetre
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
SDS	Sodyum dodesil sülfat
µg	Miligram
µL	Mililitre
µM	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Bitkinin Farklı Parçalarında Tanımlanan Farklı Polifenoller	6
Şekil 3.1. Üzüm İçeriklerinin GC-EI-MS Analizi ve Çalışmada Takip Edilen Basamaklar.	20



TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>V. vinifera</i> ve Aktif Bileşenlerinin Antikanser Etkileri	12
Tablo 2.2. <i>V. vinifera</i> ve Aktif Bileşenlerinin Kalp Koruma Üzerine Etkileri ...	15
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan <i>Vitis vinifera</i> L. Çeşitleri.....	16
Tablo 3.2. Örneklerin Miktarı ve Alkol İçeriği.....	17
Tablo 4.1. Sekiz Üzüm Numunesinin GC-EI-MS Analizi Sonuçları	25



GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 4.1. Üzüm örneklerinin DPPH sonuçları	26
Grafik 4.2. Kalecik Karası'nın 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	27
Grafik 4.3. Malbec'in 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	27
Grafik 4.4. Viognier'in 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	28
Grafik 4.5. Syrah'ın 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	28
Grafik 4.6. Sauvignon Blanc'ın 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	29
Grafik 4.7. Boğazkere'nin 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	29
Grafik 4.8. 24 Saat Sonra Öküzgözü'nün Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi	30
Grafik 4.9. Narince'nin 24 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	30
Grafik 4.10. Narince'nin 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	31
Grafik 4.11. 48 Saat Sonra Kalecik Karası'nın Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi	31
Grafik 4.12. Syrah'ın 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	31
Grafik 4.13. Malbec'in 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	32
Grafik 4.14. Sauvignon Blanc'ın 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	32
Grafik 4.15. Boğazkere'nin 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	32
Grafik 4.16. Viognier'in 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	33
Grafik 4.17. Öküzgözü'nün 48 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	33
Grafik 4.18. Sauvignon Blanc'ın 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	34
Grafik 4.19. Kalecik Karası'nın 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi.....	34
Grafik 4.20. Narince'nin 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	35
Grafik 4.21. Syrah'ın 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	35
Grafik 4.22. Malbec'in 72 Saat Sonra Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi.....	36
Grafik 4.23. Boğazkere Kanser Hücrelerinin 72 Saat Sonra Etkisi	36
Grafik 4.24. Viognier'in 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	37
Grafik 4.25. Öküzgözü'nün 72 Saat Sonra Kanser Hücrelerine Etkisi	37

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 1.1. <i>Vitis vinifera</i> 'ya ait Kırmızı Üzüm Meyvesi ve Çiçek Durumu....	3
Fotoğraf 1.2. <i>Vitis vinifera</i> cv. Syrah	7
Fotoğraf 1.3. <i>Vitis vinifera</i> cv. Öküzgözü	7
Fotoğraf 1.4. <i>Vitis vinifera</i> cv. Narince	8
Fotoğraf 1.5. <i>Vitis vinifera</i> cv. Boğazkere	8
Fotoğraf 1.6. <i>Vitis vinifera</i> cv. Viognier	9
Fotoğraf 1.7. <i>Vitis vinifera</i> cv. Kalecik Karası	9
Fotoğraf 1.8. <i>Vitis vinifera</i> cv. Malbec	10
Fotoğraf 1.9. <i>Vitis vinifera</i> cv. Sauvignon blanc	10
Fotoğraf 3.1. Örneklerin Toplandığı Alan - Kırşehir	16
Fotoğraf 3.2. Her Numunenin Etanol ve Distile Su ile Karışımı	22
Fotoğraf 4.1. Boğazkere ve Narince Özütü ile Muamele Sonrası Huh7 Hücrelerinin Morfolojik Değişimleri	38
Fotoğraf 4.2. Kalecik Karası ve Syrah Özütü ile Muamele Sonra Huh7 Hücrelerinin Morfolojik Değişiklikleri	38
Fotoğraf 4.3. Malbec ve Sauvignon Blanc Özütü ile Muamele Sonra Huh7 Hücrelerinin Morfolojik Değişiklikleri	39
Fotoğraf 4.4. Viognier ve Öküzgözü Özütü ile Muamele Sonrası Huh7 Hücrelerinin Morfolojik Değişiklikleri	39

1. GİRİŞ

İnsan uygarlığının başlangıcından itibaren tıbbi bitkiler enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Hint tıbbında bazı tanımlamar yapılmıştır. Dünya sağlık örgütüne göre dünya nüfusunun %75'i bitki ve diğer klasik çözümleri hastalık tedavisinde kullanılmaktadırlar [1]. Herhangi bir koşulda, bitkilerden farklı metotlar ile özütlerin eldesi ve karakterizasyonu yapılarak terapötik ve farmasötik amaçlı araştırmalar yapılmaktadır [2].

Üzüm, dünya çapında 2000 yıldır tatlı gıda olarak tüketilmekte olup çok çeşitli doğal karaktere sahiptir [3]. Taksonomik sınıflandırma olarak Thalamifloreae grubu altında, Rhamnales takımında, Vitaceae familyası ve *Vitis* cinsine bağlı türler (*Vinifera*) şeklinde ifade edilebilir. 1950'den bu yana meyveleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır [1].

Üzüm, klasik ve değerli bir tüketim meyvesi olarak kabul edilmektedir. Üzüm sadece farklı hastalıklara karşı ilaç geliştirmek için kullanılmamakta, aynı zamanda pekçok ürünün geliştirilmesin de tercih edilmektedir. Geçen yıllarda, üzüm özütlerinin biyolojik aktiviteleri üzerine önemli çalışmalar yapılırken kimyasal analizleri ihmal edilmiştir. Şimdilerde yapılan çalışmalar üzümün yüksek besin değerinin yanısıra değerli kimyasalları içerdiğini, örneğin; Resveratrol gösterilmektedir. Rasveratrol üzüm içerisinde yer alan aktif bir bileşik olup birçok hastalığın tıbbi tedavisinde kullanılma yeteneğine sahiptir. Bizim amaçlarımızdan birisi üzümde elde edilmiş polifenolik kimyasalların hastalıkların tedavisinde kullanımının temellerini araştırmaktır. Çünkü bilindiği gibi üzüm tüketimi oksidatif stresin azaltılması ile kanser ve farklı nörolojik problemlerin çözümüne fayda sağlamaktadır.

Üzümler yüksek oranda besin, vitamin, makromolekül ve fosfor (%0,01-0,08) içermektedir. Üzüm ayrıca kemikler için esansiyel olan bor mineralinide içermektedir. Bu besin ve vitaminler çekirdek, küspe ve kabukta bulunmaktadır [3].

Üzümün Sınıflandırılması

Alem:	Bitki
Bölüm:	Magnolifita
Sınıf:	Magnoliofisida
Takım:	Vitalis
Familya:	Vitaceae
Cins:	<i>Vitis</i>

Vitis vinifera Vitaceae familyasına ait bir türdür. Familya farklı türlerden meydana gelmektedir ve dünyanın farklı yerlerinde yayılış göstermektedir. Bilindiği üzere üzümler ılıman ve subtropik bölgelerde üretilmektedirler. Her ne kadar bazı türlerinin ticari meta olarak kullanılabilirliği olsada bazı türlerinin ticari üretimi çeşitli nedenlerden ötürü mevcut değildir (örneğin *V. Berlandieri*). Üretimi yapılan türler yoğunluklu olarak *Vitis vinifera* türünün varyete yada kültür formlarıdır [4]. Yabani üzüm tip türlerinin azalması bilhassa 19.yy'da Kuzey Amerika'da başlayan insan faktörünün etkisi ile açıklanabilir [5].

Vitis, Vitaceae familyası içerisinde 60 civarında türü bulunmaktadır. Familya ismi *Vitis* cinsinden almakta ve bazen Vitidaceae olarak ta kullanılmaktadır. Bununla birlikte Vitaceae, Vitidaecae'ye göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda varyeteye sahip dikotil bir bitki olan *Vitis* ağırlıklı olarak kuzey yarım kurede yayılış göstermekte ve yetiştirilmektedir.

Pek çok durumda kaliks ya küçüktür ya da mevcut değildir. Taç yapraklar tepe bölgesi ile birleşebilir ve zemine yakın kısımda farklılaşabilmektedir. Çiçeklenme kış sonrası başlar ve baharda olgun hale gelmektedirler. Steril ve verimli çiçekler iki türdür ve büyüyerek kendi karakterlerini ortaya çıkarabilmektedir. Steril olanları 5 filament ihtiva ederken, fertil olanları pistile organlarına sahiptirler. Meyveleri ise yumurta şeklinde sulu bir meyvedir.

Tüm Yabani *Vitis* tipleri biseksüeldir. Gelişmiş çiçekler cinsiyet organlarının her ikisine de sahiptir. *Vitis* üyelerinin çoğunluğu 38 kromozom (n=19) içermektedir. *Vitis* türlerinin çoğu Kuzey Amerikada bulunmaktadır. Benzer şekilde Asya ve bazı tropik bölgelerde de *Vitis* türleri mevcuttur. *Vitis vinifera* ise hem Avrupa hem de Asyada mevcuttur (Fotoğraf 1.1).



Fotoğraf 1.1. *Vitis vinifera* ya ait kırmızı üzüm meyvesi ve çiçek durumu

Asyadaki türlerin sayısı tam olarak bilinmediği için *Vitis* cinsinin toplamda ki tür sayısı tam bilinmemektedir. Tahmin edilen 40-60 arasında türün olduğu bilinmektedir. *Vitis* cinsine ait bazı türler aşağıda verilmiştir.

Vitis vinifera: Akdeniz ve Orta Asya orjinlidir.

Vitis labrusca: Tilki üzümü olarak bilinmektedir. Şarap fermentasyonunda ve meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır.

Vitis riparia: Riverbank üzümü olarak bilinir. Kuzey Amerika, ABD nin dopu yakası ve Quebec de yaygındır. Reçel ve şarap yapımında kullanılmaktadır.

Vitis rotundifolia (Muscadinia rotundifolia): Muscadine olarak bilinir ve reçel ve şarap yapımında kullanılmaktadır. Meksika körfezi ve güney ABD de bulunur.

Vitis vulpine: Don üzümü olarak bilinir ve ABD kökenlidir [6].

Vitis coignetia: Crinson Glory Wine olarak bilinir ve doğu Asya kökenlidir.

Vitis amurensis: Asya kökenli çok önemli bir türdür.

Deniz üzümü olan *Coccoloba uvifera*, Polygonaceae familyasına dahildir. Karayip orjinlidir. Kültürü yapılan birden fazla üzüm türü olmasına karşın en yaygın kültürü yapılan *V. vinifera*'dır.

1.1. Fitokimyasallar

Üzümler farklı renklerde olabilirler ve 6 ile 300 meyve barındırabilirler. Beyaz üzümler kırmızı üzümlerden evrimleşerek meydana gelmiştir. Antosiyanin üzüme kırmızı rengini veren moleküldür ve bir anomaliliktir. Üzümlerin sınıflandırılması ve karakterizasyonunda farklı yaklaşımlar mevcuttur. Yemeklik üzüm, şarap üzümü, çekirdekli ve çekirdeksiz üzüm tanımlamaları mevcuttur. Meyve suları ve şaraplar üzümden üretilerek üzüm tüketimi için bir yol çizilmiş olunur. Üzümler yüksek vitamin, mineral ve besin içermektedir. Üzümler içersinde bulunan ve insan sağlığına yüksek katkısı olan polifenoller mevcuttur [7].

Polifenoller antosiyanin ve flavonoidler gibi pek çok farklı gruba ayrılabilirler. Üzüme rengini antosiyanin verir ve meyvenin dış kısmında bulunur. Flavonoidler ise üzüm meyvesinin her bir bölgesine dağılmıştır. Flavonoidler beyaz üzümde daha yaygın iken antosiyanin kırmızı üzümde daha yaygındır.

Üzüm barındırdığı bu fitokimyasallar sayesinde hem bozunmasının önüne geçmekte hem de bakteri enfeksiyonlarına karşın meyveyi korumaktadır. Fitokimyasalların pozitif etkilerinin yanısıra negative etkiler gösterebileceği de bilinmektedir. Bilhassa ağır metal barındırma durumlarında olumsuz etkiler beklenmektedir.

Bugüne kadar yapılmış mevcut çalışmalar üzümün bilinen faydalarının fitokimyasallar aracılığıyla olduğunu göstermektedir. Fitokimyasallar içerisinde, antosiyaninler ve flavonoidler (örneğin resveratrol) biyolojik aktivite yönünden en önemli moleküllerdir. Polifenollerin üzümden ekstraksiyonu ve doğrudan tüketilebilir hale gelmesi için pek çok metot geliştirilmiştir. Sıvı ve gaz temelli ekstraksiyonlar polifenollerin ekstraksiyonunda en yaygın tercih edilen metotlardır ve özüte edilen polifenoller kromatografik teknikler yardımıyla karakterize edilmiştir. Polifenoller yüksek antioksidant kapasitesine sahip olmaları nedeniyle kalp rahatsızlıklarından korunmada, kanser gelişimine karşı direnç oluşturma,

yaşlanmayı geciktirme, inflasmasyonun regülasyonu ve mikrobiyal ataklara karşı organizmayı koruma gibi görevler icra etmektedir. Tüm bunlar profilaktik etki gösterdiğinden dolayı tıp ve sağlık alanında kullanılmaktadırlar [8].

Fenolik bileşikler üzümün en önemli aktif bileşenleridir [9]. Amico vd. (2009) yapmış oldukları çalışmaya göre üzüm sürgünün etanol içerisinde sıvı ekstraksiyonla yoğun olarak şu metabolitler elde edilmiştir; iki çeşit triterpenoid asit, oleanolic asit ve betulinik asit, ve ayrıca D-galaktopiranozil gliseroller elde edilmiştir [10]. Buna karşın *V. vinifera* çekirdeklerinin ekstraksiyonu ile p-kumarik-, kafeik-, ferrulik- asit ve gallik asit izole edilmiştir [11]. Bu durum üzümün farklı bölgelerinden yapılacak ekstaksiyonlar ile farklı metabolitlerin izole edileceğini göstermektedir.

Kuş üzümünün ekstraksiyonu ile malvidin -3-O-glukozid, peonidin-3-O-glukozid ve siyanidin-3-O-glukozid isimli 5 tane antosiyanin-3-O-glukozit izole edilmiştir [12]. Kırmızı üzüm ezme özütlerinde kateşin ve epikateşin en yaygın flavon olarak bulunurken malvidin-3-glukozid antosiyaninide en yaygın antosiyanin olarak bulunmaktadır. Bunlara ek olarak ilk defa resveratrol benzeri bir molekülde üzüm ezmesi içerisinde rastlanılmıştır [13]. *V. vinifera* L. kompozisyonu analiz edilmiştir. Şekil 1.1'de de görüldüğü gibi izole edilen fitokimyasalların karakteri yoğunluklu olarak üzümün hangi bölgesinden izole edildiği ile ilgilidir [14, 15].



Şekil 1.1. Bitkinin farklı parçalarında tanımlanan farklı polifenoller

1.2. Çalışılan Bitki Örnekleri

Vitis çok yıllık bir bitki olup odunsu sürgünleri 11 metreye kadar uzayabilmektedir. Toprak altında geniş bir yayılım gösteren odunsu köklere sahiptir. Yapraklar kenarları serrat olup yaprak uzun kalp şekillidir. Genellikle çiçekler daha alt yapraklarda kendini göstermektedir; genellikle küçük ve sarımsı yeşil renktedirler. Üzüm asmaları yaprak ve meyveler birlikte bulunduğu yeşil, kırmızı, eflatun, mavi veya siyah kümeler şeklinde görülmektedir [16]. Bizim çalışmamızda ise *Vitis vinifera* türünün 8 kültüvarı (cv) kullanılmıştır.

1.2.1. *Vitis vinifera* L. cv. Syrah

Türkiye’de ve Fransa’da üretilmektedir. Ülkemizde Şiraz üzümü olarak adlandırılmaktadır. Doğu ve İç Anadolu bölgelerinde yetiştirilen bu tür ceylanlar tarafından tercih edilmektedir. Küme yapısına ve siyahımsı renge sahiptir (Fotoğraf 1.2).



Fotoğraf 1.2. *Vitis vinifera* cv. syrah (Fotoğraf: K. Salihoğlu).

1.2.2. *Vitis vinifera* L. cv. Öküzgözü

Türkiyede bir çok bölgenin yanı sıra Elazığ ve Malatya bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmekte, Eylül ortasından Ekim ortasına kadar hasadı yapılmakta olan koyu siyah renkli bir üzüm türüdür. Öküzgözü üzüm içeriğindeki şeker oranı yüksektir (Fotoğraf 1.3) [17].



Fotoğraf 1.3. *Vitis vinifera* cv. öküzgözü (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.3. *Vitis vinifera* L. cv. Narince

Kumlu ve çakıllı-killi topraklarda yetişirilmektedir. Türkiyenin bir çok bölgesinde yetiştirilmektedir. Orta kalın bir kabuğa ve sarı-beyaz renkli tanelere sahiptir (Fotoğraf 1.4) [17].



Fotoğraf 1.4. *Vitis vinifera* cv. narince (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.4. *Vitis vinifera* L. cv. Boęzkere

Bu tür Anadolu'da bulunan ve Diyabakır'da, Dicle-Fırat nehirleri arasındaki bölgede kırmızı topraklarda yetiştirilmektedir. Mezopotamyanın st kısımlarında ve Anadolu'nun yüksek dağlarında mevcuttur. Ortalama beyaz ve sarı renkli kalın bir kabuk ve renkli taneler içermektedir (Fotoğraf 1.5) [17].



Fotoğraf 1.5. *Vitis vinifera* cv. boęzkere (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.5. *Vitis vinifera* L. cv. Viognier

Bu tür Fransa'da (Côte du Rhone) yetiştirilmektedir. *Vinifera* düşük-orta asitli, güzel kokulu, beyaz renkli ve lezzetli meyvelere sahiptir (Fotoğraf 1.6) [17].



Fotoğraf 1.6. *Vitis vinifera* cv. viognier (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.6. *Vitis vinifera* L. cv. Kalecik Karası

Anadolu'daki en yüksek kalitedeki üzüm olarak kabul edilmektedir. Kızılırmak deltasının Kalecik bölgesinde yetiştirilmektedir. Mavi renkli tanelere sahiptir (Fotoğraf 1.7) [17].



Fotoğraf 1.7. *Vitis vinifera* cv. kalecik karası (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.7. *Vitis vinifera* L. cv. Malbec

Fransa'da yetişen bir üzüm cinsidir. Malbec taneleri oldukça koyu renklidir (Fotoğraf 1.8) [17].



Fotoğraf 1.8. *Vitis vinifera* cv. malbec (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

1.2.8. *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc

Türkiye ve Fransa'da yetiştirilmektedir. Marmara ve Ege gibi nemli alanları seven bir türdür. Kahve renkli, kumlu toprak ve volkanik toprakları sever ve Türkiye'de Denizli ve Kapapokya'da yetiştirilmektedir. Salkımları orta sıklıkta ve kalın kabuklara sahip, aromatik bir üzüm çeşitidir (Fotoğraf 1.9) [17].



Fotoğraf 1.9. *Vitis vinifera* cv. sauvignon blanc (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Sahpazidoua vd. [18], Yunanistanda yetiştirilen dört farklı üzüm (*Vitis vinifera*) çeşidinin sap özütlerinin toplam polifenolik içerik (TPC) ve polifenol bileşimini HPLC ile belirlemişlerdir. Daha sonra, üzüm sapı özütleri, kolon (HT29), meme (MCF-7 ve MDA-MB-23), renal (786-0 ve Caki-1) ve tiroid (K1) kanser hücrelerinin büyümesini önleme aktivitelerini testetmişlerdir. Kanser hücreleri, özütlere 72 saat maruz bırakıldıktan sonra hücre büyümesi üzerindeki etkileri SRB hücre poliferasyon testi ile ölçülmüştür. Sonuçlar, tüm özütlerinin IC₅₀ 121-230 µg/mL (MCF-7), 121-184 µg/mL (MDA-MD-23), 175-309 µg/mL (HT29), 159-314 µg/mL (K1), 180-225 µg/mL (786-0) ve 134-400 µg/mL (Caki-1) değerleri ile hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.

Dinicola vd. [19] Hücre sayımı ve akış sitometri analizlerini kullanarak, üç farklı üzüm çekirdeği özütünün (Italia, Palieri ve Red Globe) Caco2 ve HCT-8 kolon kanseri hücreleri üzerinde sitostatik ve apoptotik etkilerini incelemişlerdir. Üzüm ekstralarının gösterdiği etki epigalokateşin ve prosiyanidinlerin gösterdiği etkiyle karşılaştırılmıştır. Tüm ekstralar, intrinsik apoptotik yol boyunca Caco2 ve HCT-8 hücrelerinde apoptozu uyarmışve büyümeyi inhibe etmiştir. Her iki hücre hattında, Italia ve Palieri üzüm çekirdeği özütleri tarafından indüklenen büyüme inhibisyonu, epigalokateşin, prosiyanidinler ve bunların birlikte gösterdikleri inhibisyondan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her iki hücre hattında Italia, Palieri ve Red Globe üzüm çekirdeği özütleri tarafından indüklenen apoptoz, epigalokateşin, prosiyanidinlerle ve bunların bir arada kullanılmasının oluşturduğu indüklemenden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Postescu, Chereches, Tatomir, Daicoviciu ve Filip [20], üzüm çekirdek ekstratlarının normal hücreleri doksorubisin toksisitesine karşı seçimli olarak koruduğunu göstermiştir. Tüm bunlar doksorubisin temelli kemoterapi uygulamalarında normal hücrelerin üzüm çekirdeği ekstratları ile korunabileceğini göstermektedir.

Resveratrol metabolitleri kolon kanseri üzerine antikanser etki göstermektedir. Resveratrolün 30 µM derişiminde uygulanmasıyla kanser hücrelerinin S fazında

tutulmasını ve metastatik kolon hücrelerinin genişlemesini engellediği gösterilmiştir. SW620 kolon kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda resveratrol'ün 10 ve 20 µM konsantrasyonlarda kullanımının SN38 ve oksaliptatin ile birlikte sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgular, resveratrolün kemoterapi uygulamaları için gelecek vaad ettiğini göstermektedir [21].

Tablo 2.1. *V. vinifera* ve aktif bileşenlerinin antikanser etkileri

Bileşik	Çalışma	Etki	Referans
In vitro çalışmalar/ <i>V. vinifera</i>			
Yunan üzümü (Kuru ürün 500 µg/mL)	AGC hücre hattı	TNF- α ile uyarılmış hücrelerde ICAM-1 protein ve mRNA seviyesi azaltılmış, apoptozis ile hücre çoğalması baskılanmıştır	Kaliora vd. [22]
Kuş üzümü (Frenk üzümü, CR) ve Sultanas üzümü (S), vini fiye edilmiş ekstre 1-10 µM	HT29	Anti-proliferatif, anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etki göstermiştir.	Kountouri vd. [23]
Sürgün ekstresi (polifenoller)	MCF-7, MDA-MB-23, 786-0, Caki-1, K1, HT29 hücre hatları HEPG2 ve HeLa hücre hatları	ROS aracılığı ile DNA hasarını engellemiştir	Apostolou vd. [24]
Çekirdek ekstresi 600 µg/mL	KB ve HUVEC hücre hatları	Sadece KB hücre hatlarında apoptozis indüklenerek hücre büyümesi baskılanmıştır	Aghbali vd. [25]
Çekirdek ekstresi 25 ve 50 µg/mL	Caco2 ve HCT8	Hücre büyümesi baskılanmış ve apoptozis tetiklenmiştir. Apoptozis kaspaz aracısız bir şekilde tetiklenmiştir	Dinicola vd. [19]
Çekirdek ekstresi 40 µg/mL	Detroit 562, FaDu	ROS üretimi artırılarak hücre büyümesi baskılanmıştır. Apoptozis ve DNA hasarı gerçekleşmiştir	Shrotriya vd. [26]
Kabuk ekstresi (Polyphenols) 5–100 µg/mL	4 T1 hücreleri	PI3K / Akt ve MAPK yollarının baskılanması ile hücre canlılığı ve migrasyonu baskılanmıştır	Sun vd. [27]
Resveratrol 200 µM	HEPG2 hücre hattı	Siklin D1 baskılanarak p38 MAP kinaz Akt / PKB ve PAK1 yolları baskılanmıştır ve hücre canlılığı ve korunması azalmıştır	Parekh, Motiwale, Naik ve Rao [28]
50µM	FTC-133, NPA, FRO hücreleri	CD97 gelişimi azalmıştır ve tümör gelişimi durdurulmuştur	Kang vd. [29]
100µM	HeLa, SiHa	Wnt, Notch ve STAT3 inhibisyonu ile hücre büyümesi baskılanmış ve apoptozis artırılmıştır	Zhang vd. [30]

Yi, Fischer ve Akoh [31], dört adet muskadin üzüm çeşidinin (Carlos, Ison, Noble ve Supreme) içeriğindeki fenolik bileşiklerin kanser hücrelerinde apoptozu nasıl etkilediklerini araştırmışlardır. HLB ve LH20 kolonları kullanılarak muskadin üzüm

çeşitlerinin kabuğundaki flavonoller ve antosiyaninler ayrı ayrı izole edilmiştir. HPLC analizler ile bazı fenolik asitler ve flavonoidler ileri saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Antosiyanin %90'ın üzerinde bir saflıkta elde edilmiş ve elde edilen bu fraksiyonlar (HT-29 ve Caco-2) kolon kanseri hücre hatları üzerinde denenmiştir. 1-7 µg/ml konsantrasyonlar ile kanser gelişiminin %50 oranında baskılanması gözlenmiştir. Fenolik asit fraksiyonu ise 0,5-3 µg/ml aralığındaki uygulamalar ile %50'lik bir engelleme oluşturmuştur. En yüksek baskılama ise antosiyanin fraksiyonu ile elde edilmiştir. %50'lik büyüme engelleme için 200 µg/mL ve 100-300 µg/mL arasında bir konsantrasyon Caco-2 ve HT-29 hücre hatları için belirlenmiştir. Ayrıca antosiyanin fraksiyonu 2 ila 4 kat daha fazla DNA fragmentasyonuna neden olmuştur. DNA fragmentasyonu apoptozun indüklenmesinin bir göstergesidir. Bu bulgular muskadin üzümündeki polifenollerin potansiyel antikanser özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

Jang ve Pezzuto [32], resveratrolün kanser gelişimini engellemesini organ bazında çalışmıştır. Ayrıca, bu etkinin moleküler temelleri hakkında da fikir sahibi olmamızı sağlayan bulgular elde etmiştir. Hayvan çalışmaları (fare) TPA uygulaması ile tetiklenen deri kanserinin gelişimini oksidatif strese karşı etkinlik göstererek farklı biyokimyasal yollar üzerinden etkilediğini göstermiştir. Hidrojen peroksit üretiminin regülasyonu, artmış miyeloperoksidaz seviyeleri, düşmüş glutatyon seviyeleri ve süperoksit dismutaz aktivitesi şeklinde bu etkiler görülmüştür.

Cantos, Espin ve Tomás-Barberán [33], dört kırmızı (Red Globe, Flame Seedless, Crimson Seedless ve Napoleon) üç beyaz (Superior Seedless, Dominga ve Moscatel Italica) üzüm çeşidinde bulunan polifenollerini HPLC-DAD-MS ile analiz etmişlerdir. Üzüm çeşitlerinde Antosiyanin peonidin 3-glukozid, Siyanidin 3-glukozid, malvidin 3-glukozid, petunidin 3-glukozide ve delphinidin 3-glukozide bileşikleri saptanmıştır. Bunların yanında çok sayıda farklı bileşik de tespit edilmiştir. Antosiyanin 69 -151 mg/kg taze üzüm ağırlığı oranıyla kırmızı üzümlerde en fazla rastlanan fenolik bileşik olurken, beyaz üzüm çeşitlerinde 52-81 mg/kg taze üzüm ağırlığı oranıyla flavan-3-ol en fazla rastlanan fenolik bileşik olmuştur. Bu, soyulmamış sofralık üzümlerin 200 g'lık bir porsiyonununun 72 mg'a kadar toplam fenolik sağlayabildiği anlamına gelmektedir. Bu sonuçlar, soyulmamış sofralık üzüm alımının, diyet

alışkanlıklarında potansiyel bir antioksidan ve antikanserojen fenolik kaynağı olarak önerilmesi gerektiğini göstermektedir [33].

Llobera ve Canellas [34], Manto Negro kırmızı üzüm çeşidinden şarap üretimi sürecinde ortaya çıkan üzüm sapsarı ve posanın genel içeriklerini belirlemişlerdir. Her iki yan üründe toplam kuru maddenin üçte birini içeren yüksek miktarda toplam diyet lifi (TDF) saptanmıştır. Posa'nın yüksek protein (%12,2) ve yağ (%13,5) değerleri ile büyük miktarda özüte edilebilir polifenollere (%11,6) sahip olduğu belirlenmiştir. Yüksek lif içeriği nedeniyle, çözünür diyet lifi (SDF), çözünmeyen diyet lifi (IDF), üronik asitler (UA) ve Klason lignin (KL) her iki üründe de tespit edilmiştir. Her iki yan üründe, özellikle üzüm sapsarında (%31,6) Klason lignin (KL) içeriğinin yüksek olmasının yanı sıra, Posa'da toplam diyet lifi ile ilgili olarak yüksek oranda çözünür lif (%15) tespit edilmiştir. Bu fraksiyonlar (KL), önemli miktarlarda kondense tanenler (CT) ve dayanıklı proteinler (RP) içermektedir. Bu yan ürünlerin serbest radikal temizleme kapasitesi DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve EC₅₀ değerleri üzüm sapsarı için 0.46 mg dm/mg DPPH ve Posa için 1,41 mg dm/mg DPPH olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, kırmızı üzümünden (Manto Negro) şarap üretme sırasında ortaya çıkan her iki yan ürünü, özellikle de üzüm sapsarının, literatürde tarif edilen diğer ürünlerden açıkça üstün olan serbest radikal temizleyiciler olarak mükemmel antioksidan özelliklere sahip oldukları tespit edilmiştir [34].

Liang, Cheng, Zhong ve Liu [35], 24 üzüm (*Vitis vinifera*) çeşidinin fenolik profilleri, antioksidan ve antiproliferatif aktivitelerini incelemişlerdir. Bu çeşitlerin, toplam fenolik (95,3-686,5 mg/100 g), flavonoid (94,7-1055 mg/100 g), antioksidan aktiviteleri (378,7-3386,0 mg Trolox eşdeğerleri) ve antiproliferatif aktiviteleri (özütlerinin 100 mg/mL konsantrasyonlarında %25-%82 arasında inhibisyon) arasında oransal olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Toplam antioksidan aktivite ile toplam fenolikler ve flavonoidler arasında önemli ölçüde ilişki saptanırken, antiproliferatif aktivite ile total fenolik veya total flavonoid içeriği arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Şaraplık üzümler ve renkli üzümler sofralık üzümlerden üzümlerden çok daha yüksek seviyede fitokimyasal içerik ve

antioksidan aktivite göstermiştir. Fenolikler ve flavonoidlerin çok fazla içeriğine sahip birçok germplazm girişi ve toplam antioksidan aktivite tespit edilmiştir [35].

Shanmuganayagam vd. [36], *V. vinifera* kabuğundaki poligaloil-3-ol içeriğinin etkisini *in-vitro* koşullarda araştırmıştır. İnsan platelet agregasyon inhibisyonunda ve LDL oksidasyonunun engellenmesinde oldukça başarılı oldukları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar üzümün bu içeriği sayesinde ilgili özellikleri ortaya çıkardığı fikrinin belirmesini sağlamıştır.

Resende vd. [37], laktasyon dönemindeki ve yetişkin erkek sıçanların üzüm kabuğu özütleri (ACH09) ile beslenmesi sıçanları yüksek yağlı diyetle dahi hipertansiyona karşı korumaktadır. ACH09 adipoz dokusunun artmasını baskılayabilirken aynı zamanda plazma trigliserit seviyesi, insüline direnç ve oksidatif stresin regülasyonunu NO sentezinin modülasyonu üzerinden gerçekleştirmiştir [37]. Tablo 2.2'de üzüm bileşenlerinin ve ürünlerinin kalp sağlığını koruyucu özellikleri üzerine bazı önemli bilgileri özetlemektedir.

Tablo 2.2. *V. vinifera* ve aktif bileşenlerinin kalp koruma üzerine etkileri

Bileşik	Doz	Model	Etki	Referans
Miyrisetin	100, 300 mg/kg, p.o., 21	ISO-tetiklemeli MI	Histopatolojik çalışmalara göre daha az hücre infiltrasyonu vardır	Tiwari, Mohan, Kasture, Maxia ve Ballero [38]
	100, 300 mg/kg, p.o., 6 w	Fruktoz tetiklemeli hipertansiyon ve metabolic değişim	Metabolik bozulmalar düzeltilmiştir ve yüksek kan şekeri gelişimi engellenmiştir	Godse, Mohan, Kasture ve Kasture [39]
	100, 300 mg/kg, p.o., 4 w	DOCA-tetiklemeli hipertansiyon	Antioksidant kapasitesi yükseltmiştir ve hipertansiyon baskılanmıştır	Borde, Mohan ve Kasture [40]
Frenk üzümü	Normal ve yüksek kolesterollü diyete %10 oranında eklenmiştir.	%0,5w/w kolesteroldiyet, 8 w	Atherosklerotik lezyon oluşumu azalmıştır, plazma oksidatif stress markırlarında düşüş ve AST'nin normal seviyeye gelmesi sağlanmıştır.	Yanni, Efthymiou, Lelovas, Agrogiannis, Kostomitsopoulos ve Karathanos [41]

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Üzüm Örnekleri

Çalışmada kullanılan üzüm örnekleri, Eylül 2017'de Kavaklıdere Fabrikası'nın Kırşehir Toklumen Bağlarından toplanmış ve uygun saklama koşullarında Laboratuvar ortamına getirilmiştir (Fotoğraf 3.1). Örneklere ait bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan *Vitis vinifera L.* çeşitleri.

Tür Adı	Yer	Toplanma Zamanı	Örnek Kodu
Öküzgözü	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS101-102-103
Narince	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS104-105-106
Syrah	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS107-108-109
Boğazkere	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS110-111-112
K. Karası	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS113-114-115
Viognier	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS116-117-118
Malbec	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS119-120-121
Sauvignon Blanc	Kırşehir Toklumen Bağları	10.09.2017	KS122-123-124



Fotoğraf 3.1. Örneklerin toplandığı alan - Kırşehir (Fotoğraf: K. Salihoğlu)

3.2. Numunelerin Ekstraksiyonu

Öncelikle Kırşehir Toklumen'de Kavaklıdere Fabrikası'na ait üzüm bağlarından üç ayrı ağaç örneğinden sekiz üzüm çeşidi, uygun şartlarda toplanmış, laboratuvara getirilerek ekstraksiyon işlemi yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Vitis vinifera L. türlerine ait eklenen alkol ve elde edilen numune miktarları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Örneklerin miktarı ve alkol içeriği.

Örnek Adı	Üzüm Suyu + Üzüm Posası	Eklenen %96 Etil Alkol Miktarı
Öküzgözü	900 ml.	900 ml.
Narince	505 ml.	505 ml.
Syrah	500 ml.	500 ml.
Boğazkere	600 ml.	600 ml.
Kalecikkarası	600 ml.	600 ml.
Viognier	750 ml.	750 ml.
Malbec	400 ml.	400 ml.
Sauvignon blanc	250 ml.	250 ml.

Laboratuvara getirilen üzüm örnekleri salkım halinde bol su ile yıkandıktan sonra üzüm taneleri temiz bir jilet yardımıyla tek tek saplarından ayrılarak temiz bir kap içerisine konulmuş ve tekrar bol su ile yıkanmıştır. Tıkanan üzüm taneleri kap içerisinde ezildikten sonra bir gazlı bezle süzülerek tartımı yapılmıştır. Çekirdek ve posa; sıvı azot ile öğütülerek sonrasında posa ve elde edilen üzüm suyu birleştirilmiştir. Üzüm suyu miktarına göre örnekler %96'lık etanol eklenmiştir ve oda sıcaklığında 3 gün çalkalayıcıda 100 rpm'de özütlenmiştir.

Çalkalayıcıdan alınan numuneler bir filtre kağıdı kullanılarak süzme işlemi gerçekleştirildikten sonra süzüntü Rotary Evaporatöre (buharlaştırıcı) takılarak, 25-40°C'lik bir sıcaklıkta vakum altında 100-120 rpm'lik bir dönüş hızıyla içerisindeki etanol buharlaştırılmıştır. Bu işlemin sonra, örnekler bir gece derin dondurucuda saklanmıştır.

Numunelerin içerisindeki suyun buharlaştırılması için numuneler Liyofilizator cihazında -80°C ve 0,12 basınç altında bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Üçüncü günün sonunda, kurutulan numuneler buharlaşma balonlarından kazınarak steril falkon (konik) tüplere toplanmıştır.

3.3. Sitotoksosite Testi için Kullanılan Aletler ve Sarf Malzemeleri

Anti-kanser testler sırasında kullanılan kimyasallar, sarf malzemeleri, cihazlar ve ekipmanlar kullanım amacı ile birlikte aşağıda belirtilmiştir:

- Etanol: Bitki örneklerinin ekstraksiyonu ve dezenfeksiyon işlemleri için kullanılmıştır.
- Distile su: Ekstraksiyon ve hazırlama sürecinde kullanılmıştır.
- Ölçme silindirleri (Mezür)
- 96 kuyucuklu mikro plaka
- Test tüpleri
- Balon jojeler.

3.4. Hücre Kültürü

- Besiyeri: Hücrelerin büyümesi için kullanılan ve gerekli besinleri içeren ortamdır. Besiyeri; DMEM'de %10 FBS, %1 NEAA, %0,1 penisilin/streptomisin'den oluşmaktadır.
- Laminer kabin: Numunenin kirlenmesini önler, steril çalışma ortamı sağlar.
- İnkübatör: Kanser hücrelerini uygun sıcaklık koşullarında gelişimini sağlamak için kullanılmaktadır.
- Çamaşır suyu: Kullanılmayan hücreleri öldürmek için flask yada plakalara eklenmiştir.

- Tripsin: Hücreleri tutundukları plakanın (flask içinde) yüzeyinden ayırmak için kullanılmıştır.

3.5. MTT Metodu

- MTT: Hücre canlılığını test etmek için kullanılmıştır.
- HCl/Izopropanol/SDS: MTT testinde Formazan kristallerini çözmek için kullanılmıştır.
- Tuzlu fosfat tamponu (PBS): Hücre kültüründe tampon çözelti olarak kullanılmaktadır.
- Spektrofotometre, Thermoskan-Go (Thermo Scientific) 96 kuyucuklu mikroparka okuyucu.

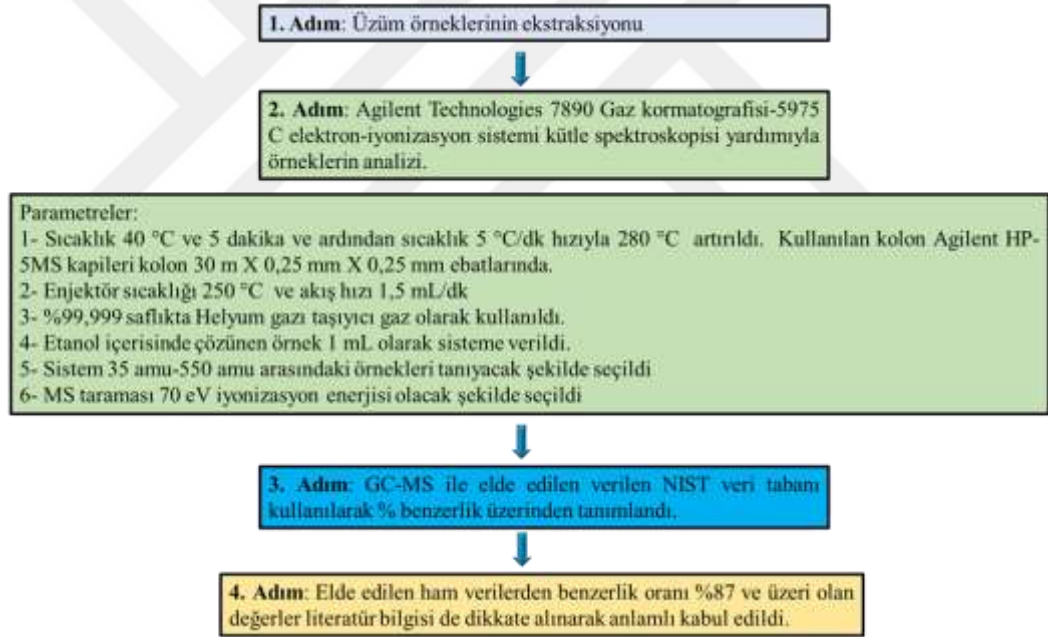
3.6. Genel Materyaller

- Pipet: sıvının emilmesi ve eklenmesi için kullanılmıştır.
- Çalkalayıcı: Dijital hızını ve zamanlayıcısını kontrol ederek ve sessiz bir çalkalama sağlamaktır.
- Buzdolabı: Malzemeleri en uygun saklama koşullarında tutmak için kullanılmıştır.
- Otoklav: Bu çalışmada kullanılan malzemeleri sterilize etmek için kullanılmıştır.
- Santrifüj: Numunenin katı kısmı veya ana bileşenleri, yoğunluk santrifüjüyle sıvı kısımdan ayrılmalısında kullanılmıştır.
- Ters Mikroskop: Işık mikroskobu altında hücresel büyümeyi gözlemlemek için kullanılmıştır.
- Bilgisayar: Verileri toplama ve analiz edilmesinde kullanılmıştır.
- Hemasitometre: Hücre sayısını belirlemek için kullanılmıştır.
- Çeşitli kaplar, petri kapları, steril pamuk ve eldivenler

3.7. Örneklerin Biyokimyasal İçerik Analizi

Üzüm özütlerinin GC-MS analizi, ekstrelerin kimyasal bileşimini incelemek için kullanılmıştır. Üzüm özütlerinin kalitatif analizi Agilent Technologies 7890 kullanılarak yapılmıştır. Ekstrelerdeki muhtemel molekülleri bulmak için E-Standart ve Teknoloji (NIST) veri tabanına birleştirilmiş bir Gaz kromatografi (GC) sistemi kullanılmıştır.

Üzüm özütlerinin kalitatif analizi, tarif edildiği gibi 5975C elektron iyonizasyon kütle spektrometresine (EI-MS) birleştirilmiş Agilent Technologies 7890A Gaz kromatografisi (GC) sistemi kullanılarak aşağıda belirtilen aşamalar takip edilerek yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Üzüm içeriklerinin GC-EI-MS Analizi ve çalışmada takip edilen basamaklar

3.8. Üzümün Antioksidan Etkisinin Belirlenmesi

DPPH (1,1-Dipenil-2-pikrilhidrazil radikal) radikal süpürme aktivitesi belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 10 µg/mL DPPH radikali kullanarak standart grafikler çizmek için askorbik asit (20 µg/mL-1 µg/ml aralığı) kullanılmıştır. Bütün numuneler, numunelerin nispi antioksidan özelliklerini hesaplamak için 20 µg/ml'de

kullanılmıştır. Tüm testler tamamen çözünmüş üzüm örneklerinin elde edilmesi için su içinde yapılmıştır. Muhtemel hataları en aza indirmek için test edilen konsantrasyonlarda üzüm özütlerinden kaynaklanan absorbans normalize edilmiştir.

DPPH'nin stok çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. Tüm ölçümler loş ışık altında yapılmıştır. Spektral ölçümler, Spectronic Genesys Spectrophotometer 5 kullanılarak 517 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, sekiz türün (Narince 0,12 g, Syrah 1,039 g, Öküzgözü 1,03 g, Boğazkere 1,09 g, Viognier 1,03 g, Sauvignon blanc 1,05 g, Kalecik Karası 1,08 g) üzüm numuneleri belirli miktarlarda işlenmiş ve her numune 1,0 mL distile su içinde işlenmiştir.

Test için yedi set metanol hacmi (1 600 µL, 1 595 µL, 1 590 µL, 1 570 µL, 1 560 µL, 1 550 µL, 1 500 µL), DPPH (örnek başına 400 µL), askorbik asit (0,5 µL, 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL, 100 µL) olarak hazırlanmıştır. Toplam hacim 2,0 mL'dir.

İkinci adımda, örnekler iki bölüme ayrılmıştır. 400 µL DPPH alınmış ve daha sonra 100 µL numuneden ve 1 500 µL metanolden eklenmiştir. DPPH eklenmeden ikinci parçaya her bir numuneden 100 µL ve 1 900 µL metanol eklenmiştir. DPPH ile antioksidan aktivite tayini yapılmıştır.

3.9. Üzüm Özütlerinin Antikanser Etkisinin Belirlenmesi

3.9.1. Araştırma Metotları

Çalışmada, sekiz farklı üzüm çeşidinden elde edilen özütler kullanılmıştır (Fotoğraf 3.2). Özütlerinin kanser hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Her bir özütün 24, 48 ve 72 saat sonraki sonuçları kaydedilmiştir.

3.9.2. Hücre Hattı

HuH-7, 1982 yılında 57 yaşında bir Japon erkekte karaciğer kökenli bir tümörden alınan, iyi ayırt edilmiş bir hepatosit türevli hücresel karsinom hücre hattıdır.

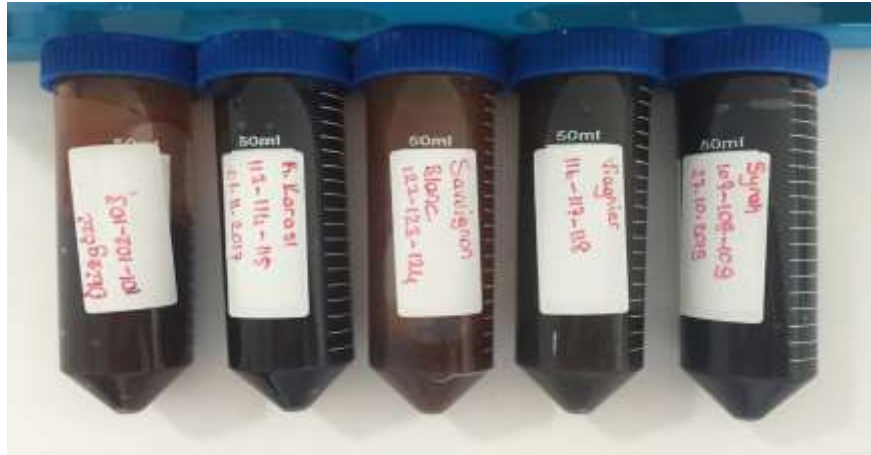
3.9.3. HuH-7 Hücre Hattının Karakteristikleri

HuH-7, epitelyal benzeri tümörijenik hücrelerin ölümsüz bir hücre hattıdır. Bu hücreler, flask veya plakaların yüzeyine yapışır ve tipik olarak 2 boyutlu mono tabaka (yüzeyel) olarak büyümektedir. Birçok mutasyon ve INDELS (delesyon) içermesine rağmen, Huh7 hücrelerinin p53 geninde bir nokta mutasyonuna sahip olduğuna dikkat edilmesi gerekmektedir.

İnsan tarafından oluşturulan karaciğer epitel hücreleri, daha önce in-vitro olarak Sağlık Koruma Ajansı tarafından genişletilmiş olan kurumdan elde edilmiştir. Besiyeri olarak, karaciğer endotel hücre canlılığını ve büyümesini teşvik etmek için uyarlanmış rekombinant büyüme faktörleri içermektedir. Bu hücreler daha yüksek miktarda amino asit ve vitamin konsantrasyonunun yanı sıra ek tamamlayıcı bileşenler içeren bir Basal Medium Eagle (BME) modifikasyonu olan DMEM'de kültüre edilmiştir.

3.9.4. Bitki Özütü Hazırlanması

Daha önce özüte edilerek kuru hale getirilmiş olan bitki özütlerinden PBS içerisinde farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır (1; 10; 100; 1000 ve 10 000 µg/ml). Hücreler, bu çözülmüş özütleri ile muamele edilmiş ve 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücre sitotoksitesi MTT analizi ile ölçülmüştür. Hücre morfolojisi ters-mikroskop ile analiz edilmiştir.



Fotoğraf 3.2. Her numunenin etanol ve distile su ile karışımı

3.9.5. Hücre Kültürü

Bu hücrelerin büyümesi için uygun ortam hazırlanmış; DMEM içerisinde %10 FBS, %1 NEAA; %0,1 penisilin/streptomisin karışımı ile oluşan ortam, hücreler için gerekli besinleri sağlamaktadır. Petri kaplarını dolduran hücreler besin yetersizliği sebebiyle büyümelerinin engellenmemesi için alt kültüre alınmaktadır (pasajlama).

10 000 Huh7 hücre/kuyucuk 96-kuyucuklu mikropalakalara ekilmiş ve üzüm ekstreleri ile 24, 48 ve 72 saat boyunca son konsantrasyon 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/ml olacak şekilde muamele edilmiştir. Morfolojik değişiklikler ters mikroskop ile analiz edilmiştir.

3.9.6. MTT Metodu

Daha sonra, kuyucuklara MTT tampon çözeltisi ilave edilmiş, ardından 4 saat daha inkübasyon yapılmıştır. Kuyucukların içerikleri tamamen boşaltılmış ve seyreltilmiş 10 µL SDS eklenmiş ve 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, 50 µL, 40 mM HCl izopropanol ilave edilmiş ve 15 dakika daha inkübe edilmiştir.

Absorbans değerleri çoklu mikropalaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir.

Deneyleerin tamamlanmasından sonra, tüm sonuçlar düzenli şekilde not edilmiş ve bilgisayara kayıt edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Üzüm İçeriğinin Analizi

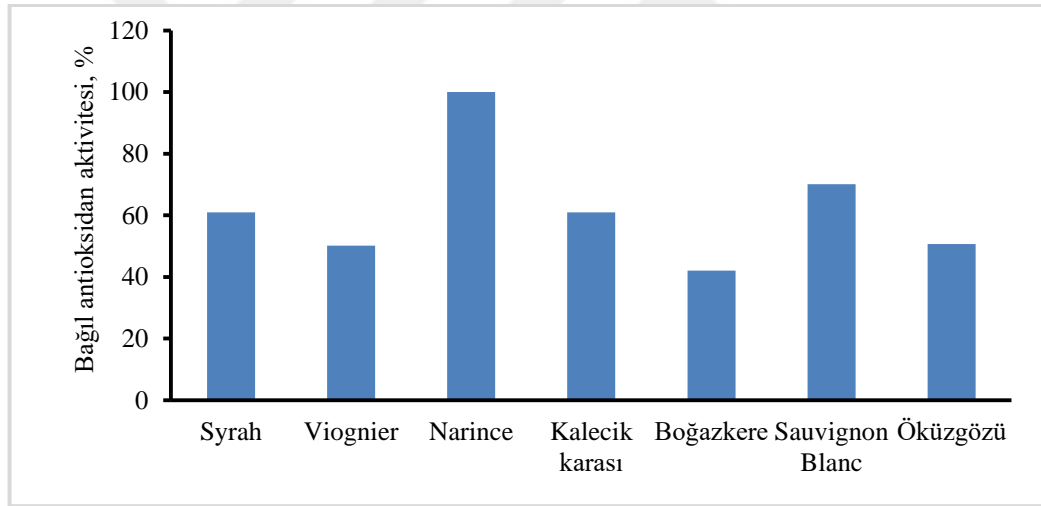
Çalışmanın bu kısmında 8 farklı üzüm çeşidinin GC-EI-MS analizi ile elde edilen biyokimyasal içerikleri ve elde edilen birleşikler Tablo 4.1’de verilmiştir. Çalışma sonuçları her bir üzüm çeşidinin kendine has bir biyokimyasal birleşime sahip olduğunu göstermektedir. Bitkilerin tür bazında farklılığına ek olarak yetiştirme ve ekolojik ortamlardaki farklılık, stres koşulları gibi bir çok etmen bitki içerisindeki sekonder metabolit kompozisyonu ve miktarı üzerinde etkili olabilmektedir. Bu nedenle tıbbi amaçlarla kullanılacak bitkilerin biyokimyasal kompozisyonlarının belirlenmesi gerek bitkinin fayda zarar marjının belirlenmesi gerekse etkin maddelerin tespiti ve maddelerin standardizasyonu açısından önemlidir.

Tablo 4.1. Sekiz üzüm numunesinin GC-EI-MS analizi sonuçları

Üzüm Türü	İçerik
Öküzgözü	2-Furanmetanol (%96), Furfural (%95), 2-Furaldehit (90), Furol (%90), 2-Furankarboksaldehid (%91), 5-metil-2-Furankarboksaldehid (%91), Linoleik asit etil ester (%97) ve (9,12-Oktadecadienoik asit, etil ester (%97),
Narince	2-Furankarboksaldehid, 5-metil-2-Furankarboksaldehid (%91), 2-Furankarboksaldehid- 5- (hidroksimetil) (%93), 4H-Piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi- 6-metil (%91), n-Heksadekenoik asit (%96), Heksadekenoik asit, etil ester (%96), Oktadekanoik asit (%90), 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, etil ester (%97),
Syrah	Furfural (%94), 3-Furaldehit (%91), 2-Furanmetanol (%94), 3-Furanmetanol (%93), 2-Furankarboksaldehid, 5-metil-91 4H-Pyran-4-on, 2,3 -dihidro-3,5-di 19887 028564-83-2 91 hidroksi-6-metil -2- Furankarboksaldehid, 5- (hidroksimetil) (%97), Heksadekenoik asit, etil ester (99), Linoleik asit etil ester (99), 9,12-Oktadecadienoik asit, etil ester (99), Etil Oleat (92), 9-Oktadecenamide, (Z) - (87)
Boğazkere	Furfural (%93), 3-Furaldehit (%90), 2-Furanmetanol (%93) 4H-Piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil (%91) 2-Furankarboksaldehid, 5- (hidroksimetil) (%97), n-Heksadekanoik asit (%96), Heksadekanoik asit, etil ester (%98) Oktadekanoik asit (%90)
Kalecik Karası	4H-Piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil (%97), 2-Furankarboksaldehid, 5- (hidroksimetil) (%95), n-Heksadekanoik asit (%96), Heksadekanoik asit, etil ester (%90), Oktadekanoik asit (%94), 9-Oktadecenamide, (Z) (%95)
Viognier	2-Furanmetanol (%93) 4H-Piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6-metil (%87), n-Heksadekanoik asit (%96) Heksadekanoik asit, etil ester (%99) 9,12-Oktadecadienoik asit (Z, Z) (%93) Linoleik asit etil ester (%99) 9,12-Oktadecadienoik asit, etil ester (%99) 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, etil ester, (Z, Z, Z) (%90), 9-Oktadekenamid, (Z) (%87)
Viognier	Furfural (%95), 2-Furanmetanol (%93) 3-Furanmetanol (%91), 2-Furankarboksaldehit, 5- (hidroksimetil) (%93), Heksadekanoik asit, etil ester (%97) 4-Heksenoik asit, 3-metil-2,6-diokso (%95) 9-Oktadekenamid, (Z) (%90) Heksadekan, 1- (eteniloksi) (%91)
Sauvignon Blanc	Furfural (%94), 3-Furaldehit (%91), 2-Furanmetanol (%95), 4H-Piran-4-on, 2,3-dihidro-3,5-di hidroksi-6-metil (%87), 2-Furankarboksaldehid, 5- (hidroksimetil) (%93), Oktadekanoik asit (%98), 9-Oktadekenamid, (Z) (%91)

4.2. Üzüm Örneklerinin Antioksidan Sonuçları

Çalışma sonucunda en yüksek antioksidan aktivite Narince üzüm çeşidinde (20 mg özüt, 15 dakikada 20 µg DPPH'yi süpürmüştür) saptanırken en düşük antioksidant aktivite Boğazkere çeşidinde saptanmıştır (20 mg özüt, 15 dakikada 8,4 µg DPPH'yi süpürmüştür). Üzüm çeşitlerinin biyokimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında “9, 12, 15-Oktadekatrienoik asit, etil ester” bileşiğinin sadece Narince çeşidinde bulunduğu görülmektedir. Güçlü bir radikal temizleyici olan “9, 12, 15-Oktadekatrienoik asit, etil ester” mevcudiyetinin Narince çeşidinin DPPH temizleme aktivitesine önemli ölçüde katkısı olduğu tahmin edilmektedir. Bunun yanında Narince ve Boğazkere çeşitlerinde saptanan güçlü antioksidan moleküllerin de (yani, 2,3-dihidro-3, 5-dihidroksi-6-metil) katkısı olduğu düşünülmektedir (Grafik 4.1).

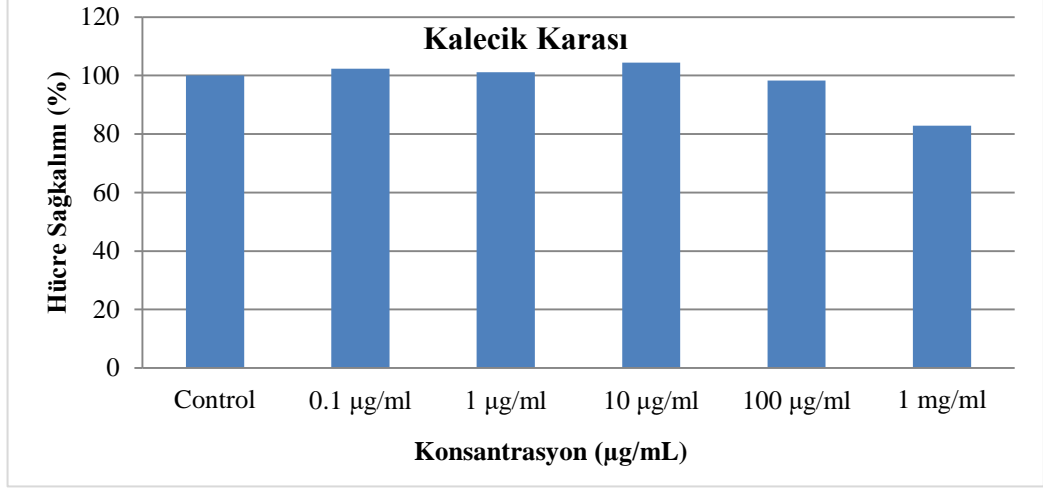


Grafik 4.1. Üzüm örneklerinin DPPH sonuçları

4.3. Antikanser Testlerinin Sonuçları

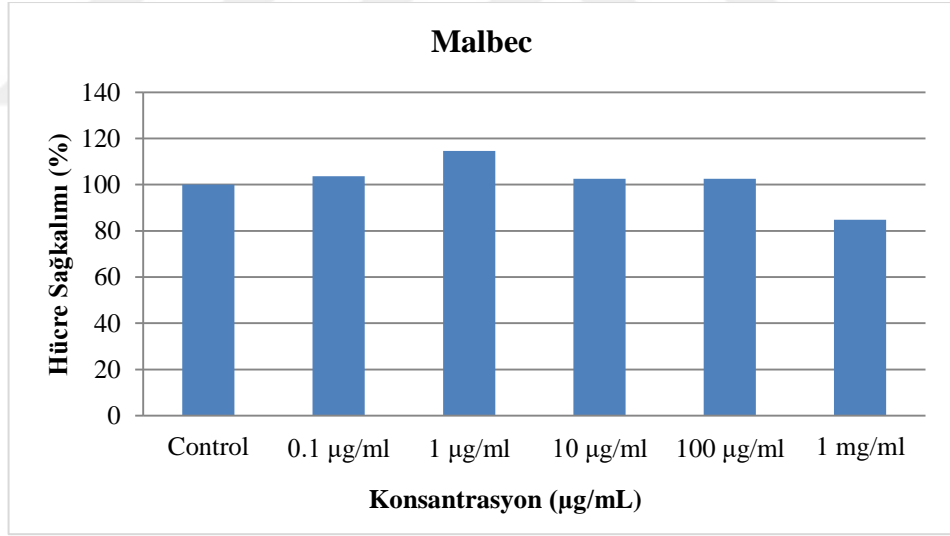
Tüm numuneler 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda kontrol edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası sonuçlar aşağıdaki gibi kaydedilmiştir;

Kalecik karası özütü 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat sonunda kanser hücrelerinin büyümesini %18 inhibe etmek suretiyle en yüksek antikanser etkiyi göstermiştir (Grafik 4.2).



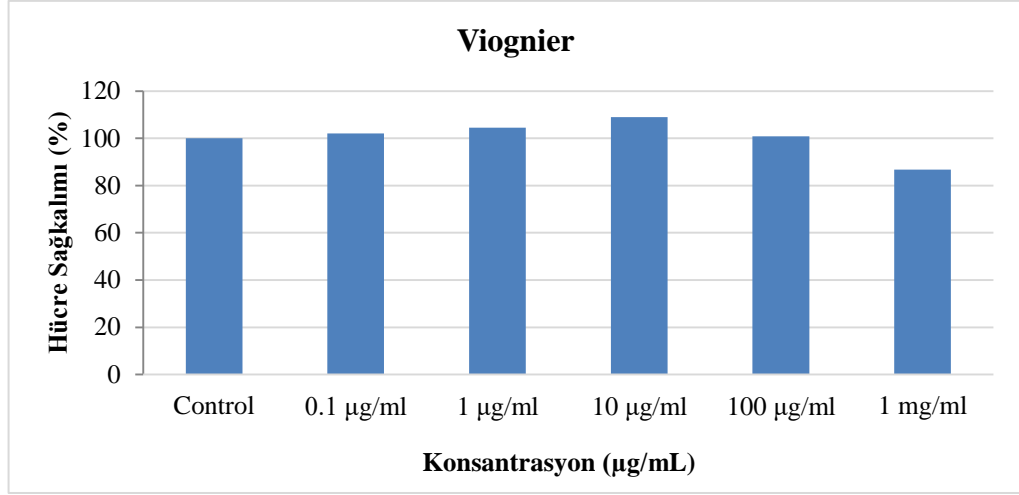
Grafik 4.2. Kalecik karası'nın 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Malbec özütü 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat sonunda kanser hücrelerinin büyümesini %16 oranında inhibe etmek suretiyle ikinci en yüksek antikanser etkiyi göstermiştir (Grafik 4.3).



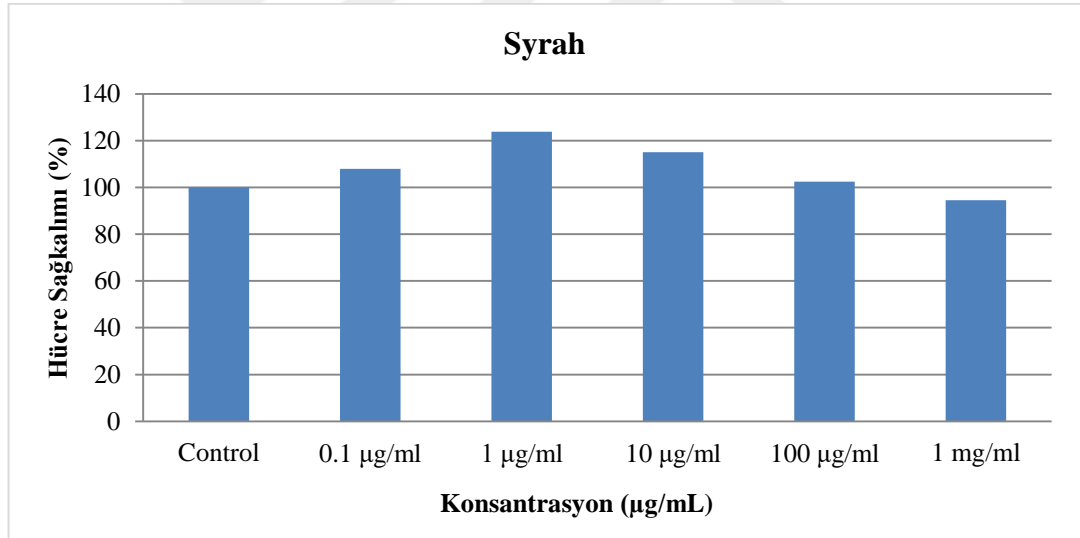
Grafik 4.3. Malbec'in 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Viognier özütü 1 µg/mL konsantrasyonda 24 saat sonunda kanser hücrelerinin büyümesini %14 inhibe etmek suretiyle antikanser etki göstermiştir (Grafik 4.4)

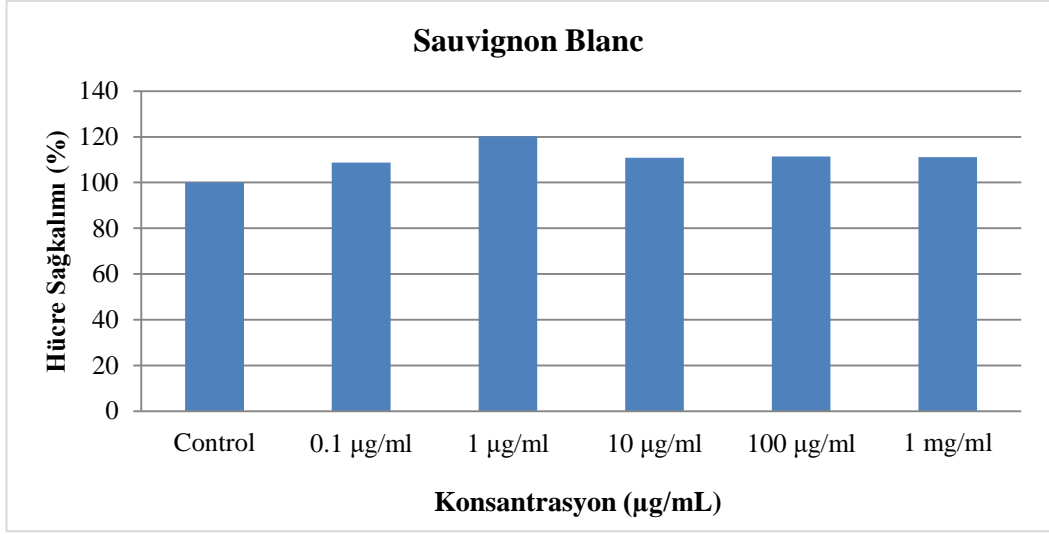


Grafik 4.4. Viognier'in 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

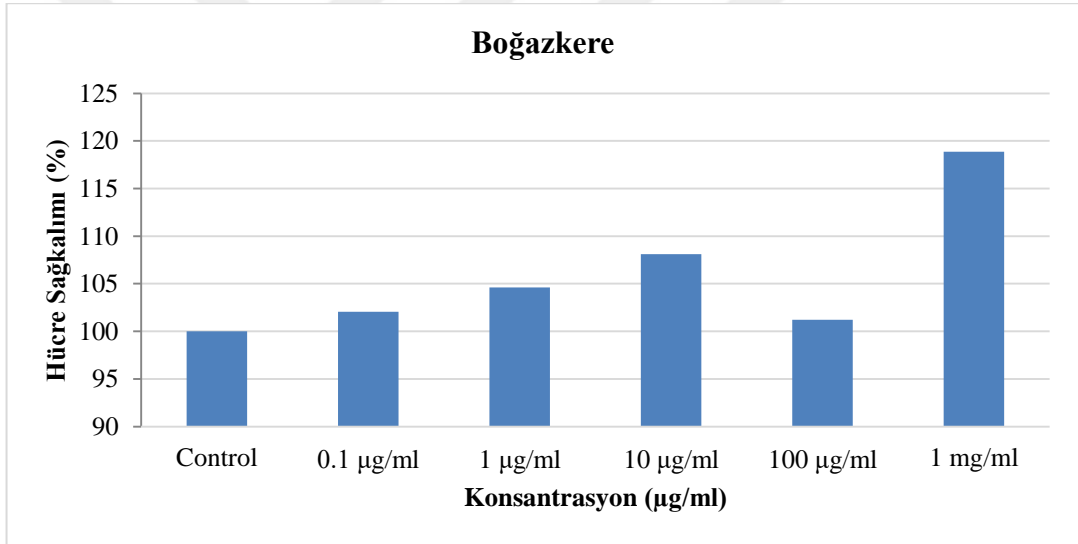
Diğer türlerin kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Grafik 4.5 - Grafik 4.9).



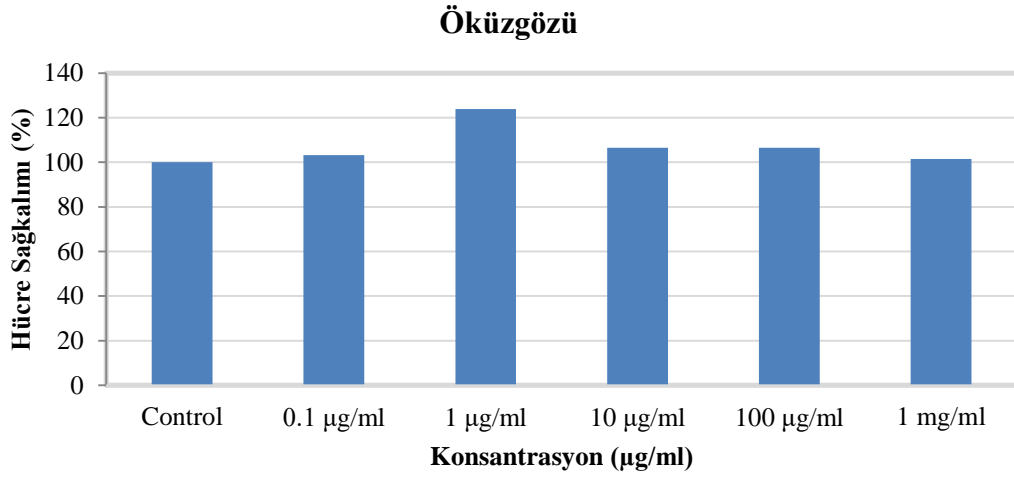
Grafik 4.5. Syrah'ın 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



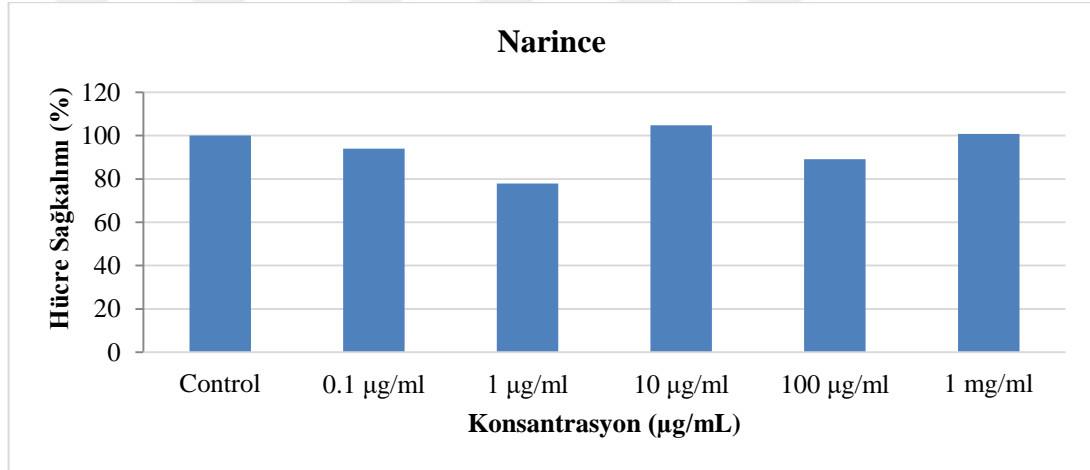
Grafik 4.6. Sauvignon Blanc'ın 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



Grafik 4.7. Boğazkere'nin 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

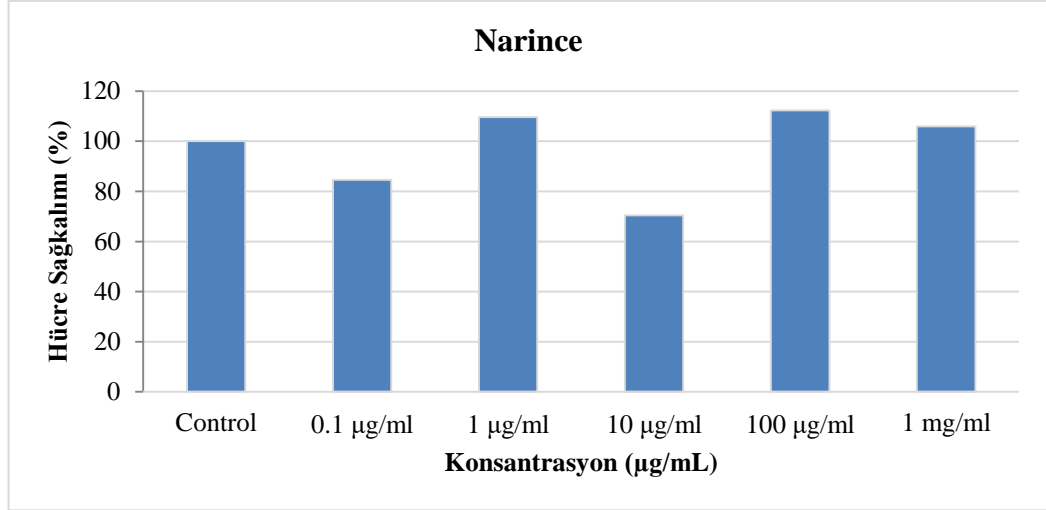


Grafik 4.8. 24 saat sonra Öküzgözü'nün kanser hücreleri üzerindeki etkisi



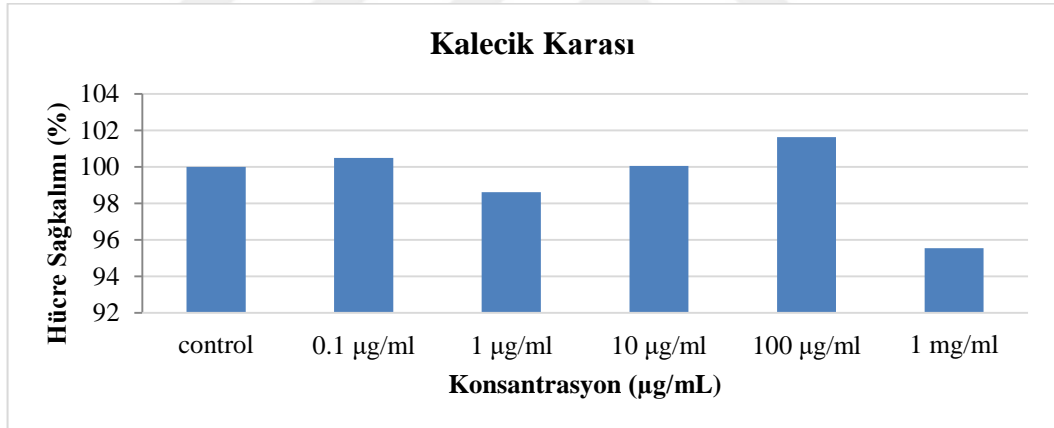
Grafik 4.9. Narince'nin 24 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Sekiz örneğin tümü 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra farklı sonuçlar kaydedilmiştir. Narince, kanser hücrelerinin büyümesini tek etkileyen tür olarak tespit edilmiş; 10 µg/ml konsantrasyonunu %30 inhibisyon sağlarken, 0,1 µg/mL konsantrasyonu %16 inhibisyon sağlamıştır (Grafik 4.10).

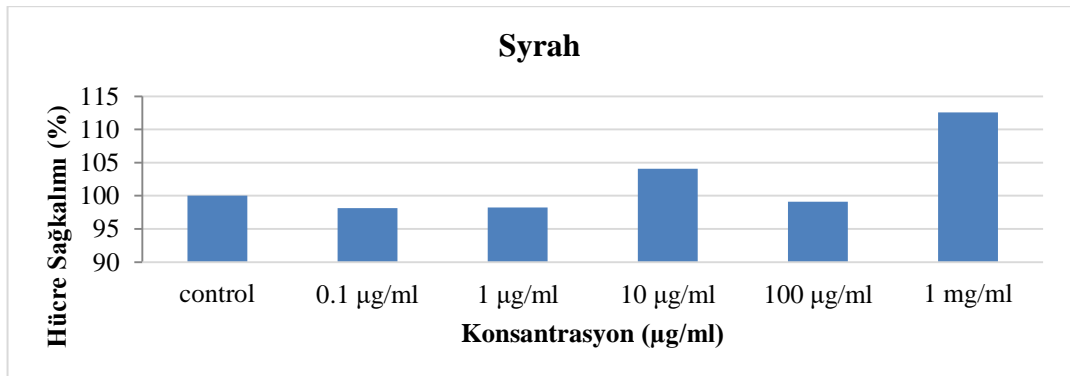


Grafik 4.10. Narince'nin 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

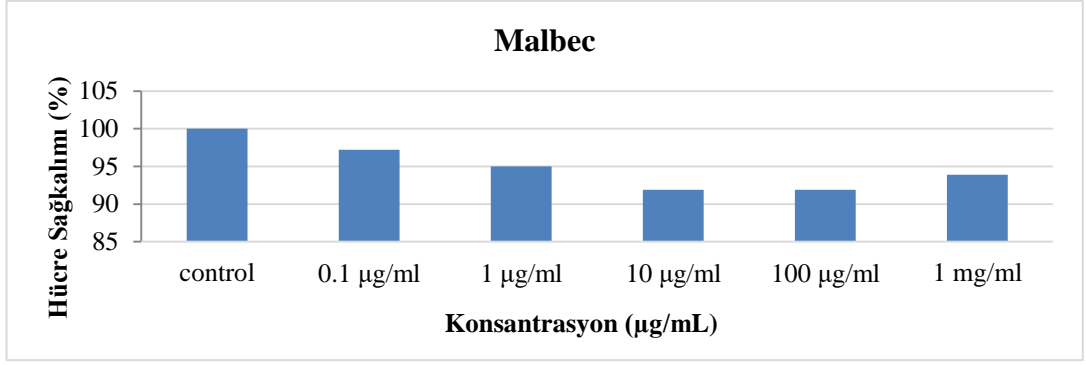
Öte yandan, diğer 7 üzüm çeşidi 48 saatlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde önemli bir etki göstermemiştir (Grafik 4.11- Grafik 4.17).



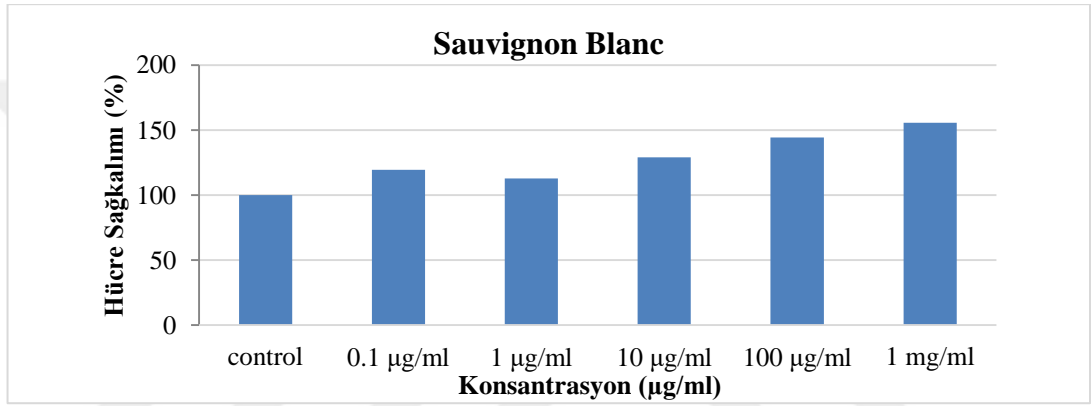
Grafik 4.11. 48 saat sonra Kalecik karası'nın kanser hücreleri üzerindeki etkisi



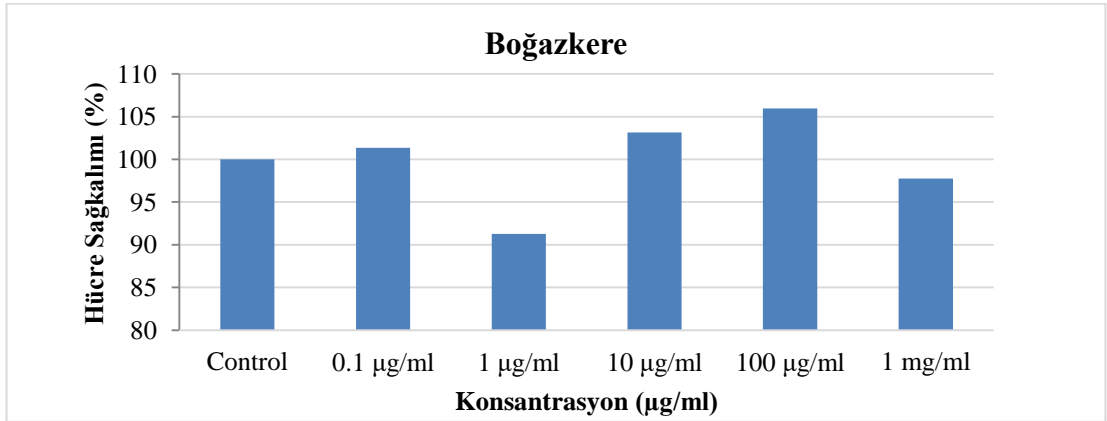
Grafik 4.12. Syrah'ın 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



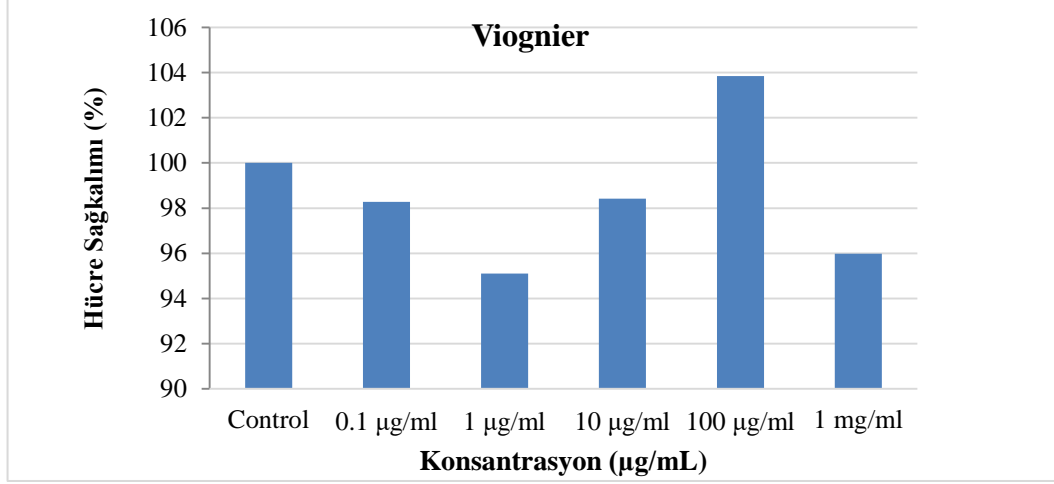
Grafik 4.13. Malbec'in 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



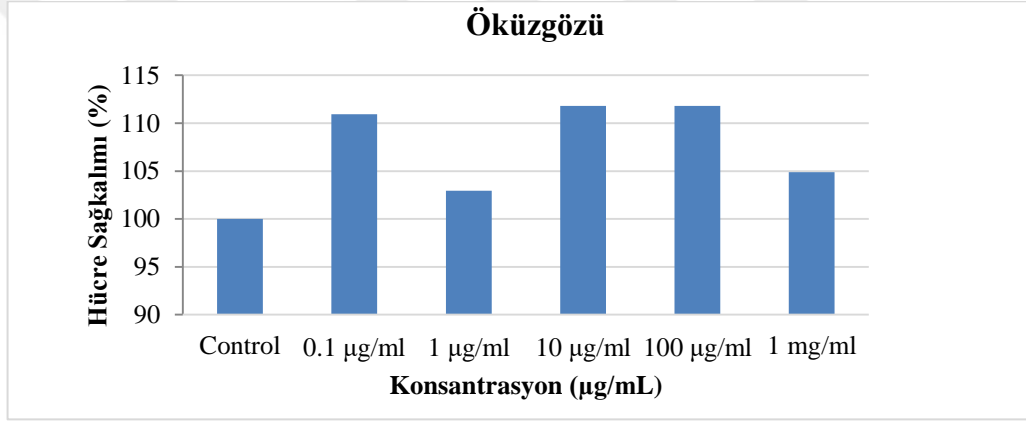
Grafik 4.14. Sauvignon Blanc'in 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



Grafik 4.15. Boğazkere'nin 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

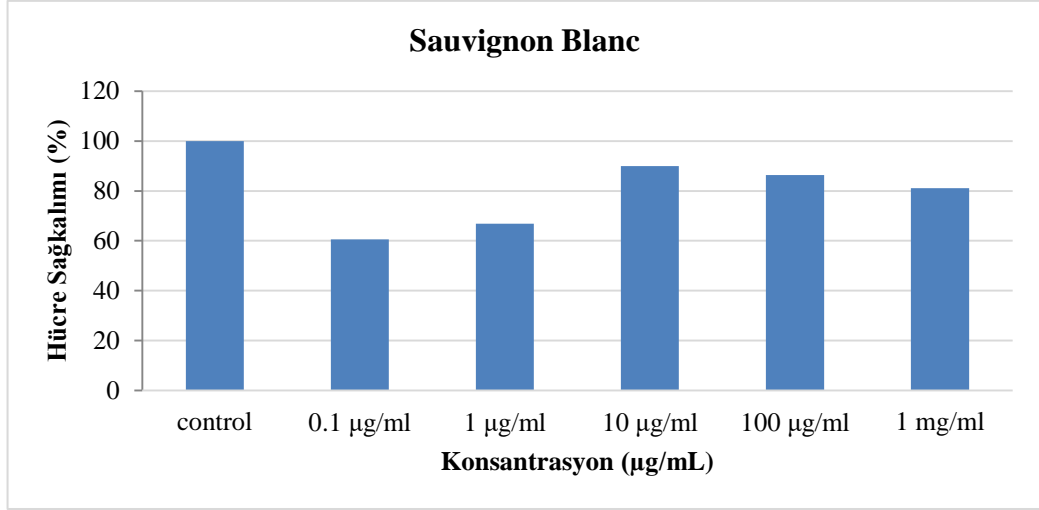


Grafik 4.16. Viognier'in 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi



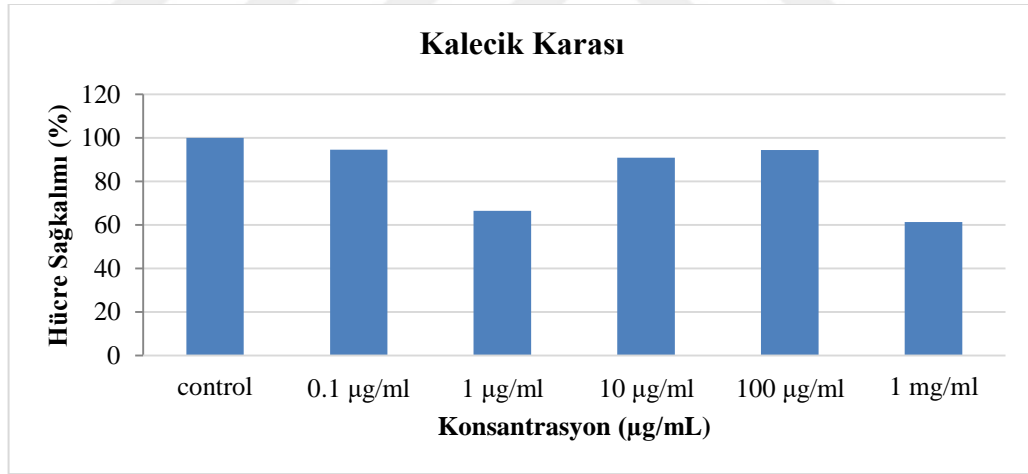
Grafik 4.17. Öküzgözü'nün 48 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Antikanser etki araştırmasının 72 saat'lik inkübasyon sonucunda en yüksek inhibisyon Sauvignon blanc, 0,1 µg/mL konsantrasyonunda saptanmıştır (%40). Ayrıca 1 µg/mL S. blanc konsantrasyonu %34 inhibisyon gösterirken, 100 µg/mL %14 ve 1 µg/mL S. blanc konsantrasyonu %19 inhibisyona neden olmuştur (Grafik 4.18).



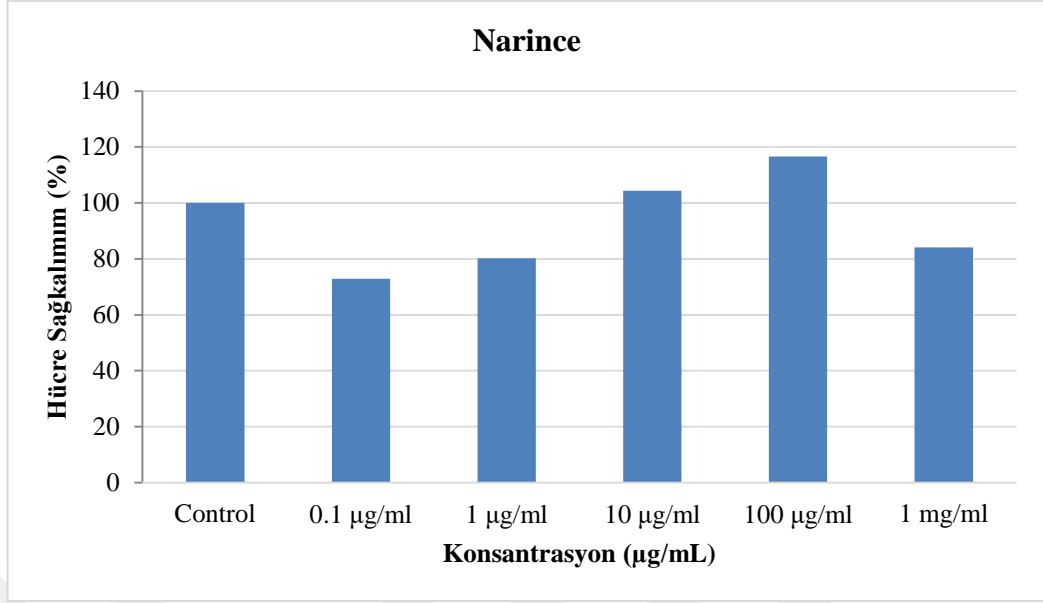
Grafik 4.18. Sauvignon Blanc'ın 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Kalecik karası özütü 1 mg/mL konsantrasyonda kanser hücrelerinin büyümesini %39 oranında inhibe ederken, özütün 1 µg/ml konsantrasyonu %34 oranında inhibisyon göstermiştir (Grafik 4.19).



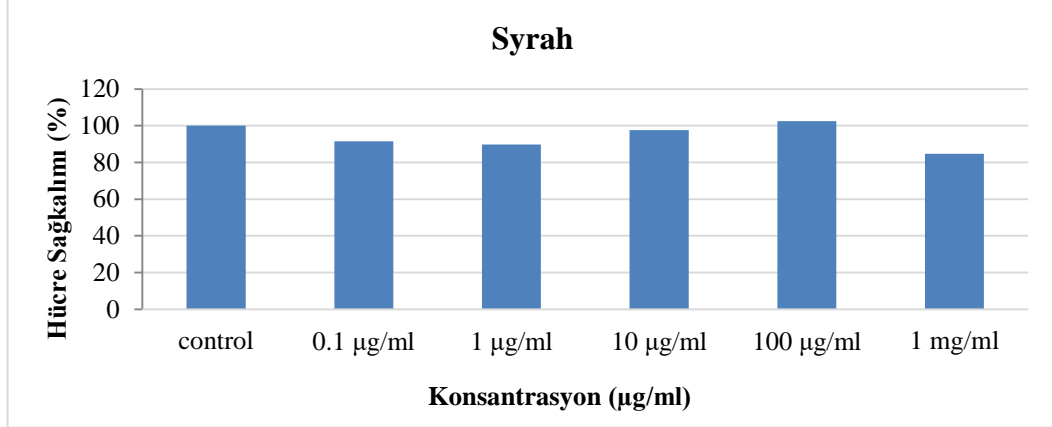
Grafik 4.19. Kalecik Karası'nın 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Narince özütü 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla %28, %20 ve %16 oranında inhibisyon göstermiştir (Grafik 4.20).



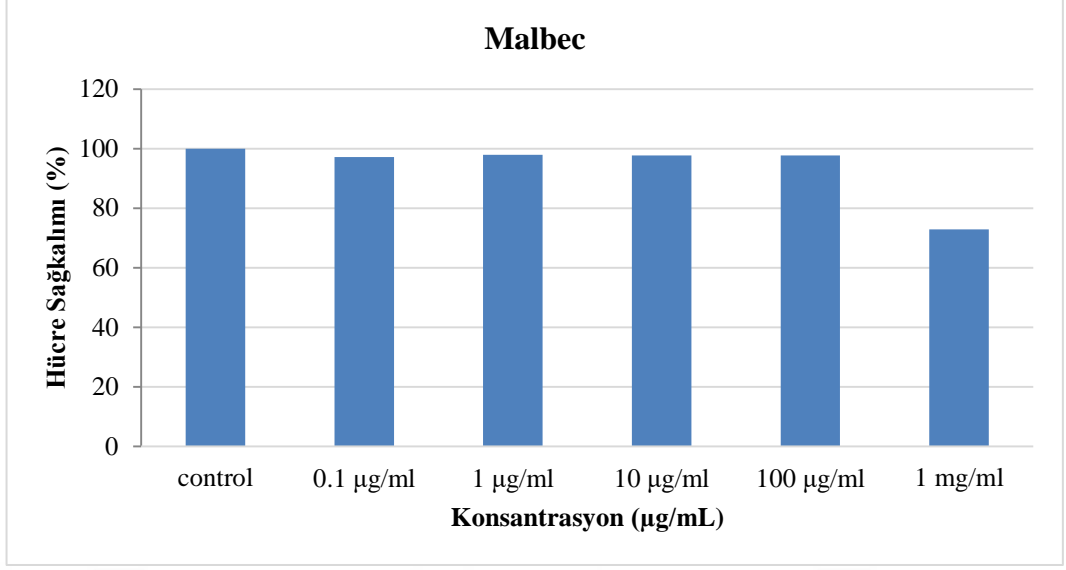
Grafik 4.20. Narince'nin 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Syrah özütünün 1 mg/mL konsantrasyonu 72 satlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde %16 oranında inhibisyon göstermiştir (Grafik 4.21).



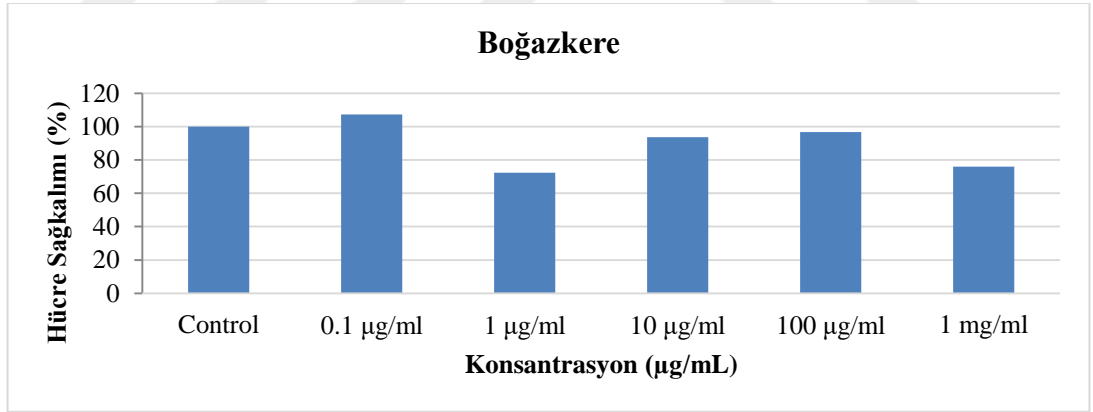
Grafik 4.21. Syrah'ın 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Malbec özütünün 1 mg/mL konsantrasyonu 72 satlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde %28 oranında inhibisyon göstermiştir (Grafik 4.22).



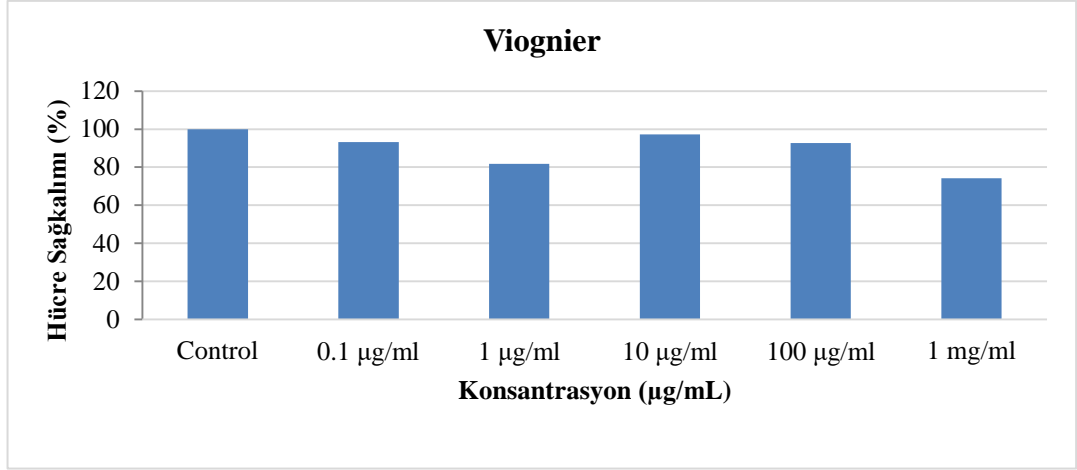
Grafik 4.22. Malbec'in 72 saat sonra kanser hücreleri üzerindeki etkisi

Boğazkere özütünün 1 mg /mL konsantrasyonu 72 satlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde %28 oranında inhibisyon gösterirken, 1 µg/mL konsantrasyonu %24 oranında inhibisyon sağlamıştır (Grafik 4.23).



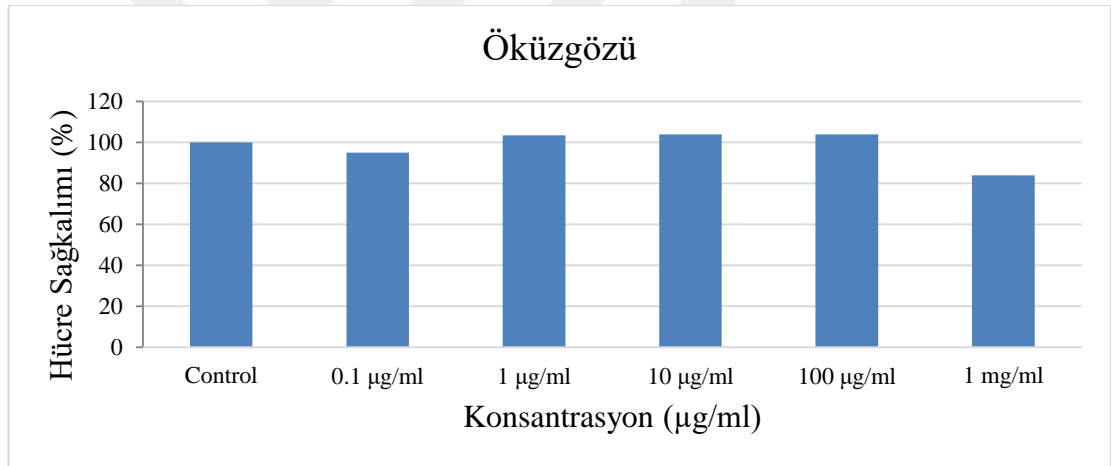
Grafik 4.23. Boğazkere kanser hücrelerinin 72 saat sonra etkisi

Viognier özütünün 1 mg /mL konsantrasyonu 72 satlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde %26 oranında inhibisyon gösterirken, 1 µg/mL konsantrasyonu %19 oranında inhibisyon sağlamıştır (Grafik 4.24).



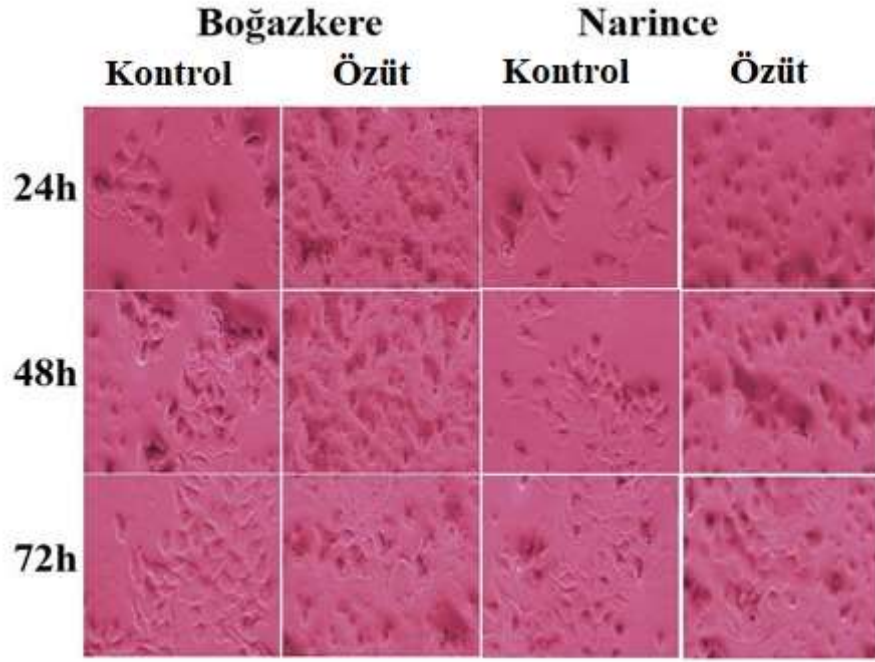
Grafik 4.24. Viognier'in 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

Syrach özütünün 1 mg/mL konsantrasyonu 72 satlik inkübasyon sonunda kanser hücreleri üzerinde %16 oranında inhibisyon göstermiştir (Grafik 4.25).

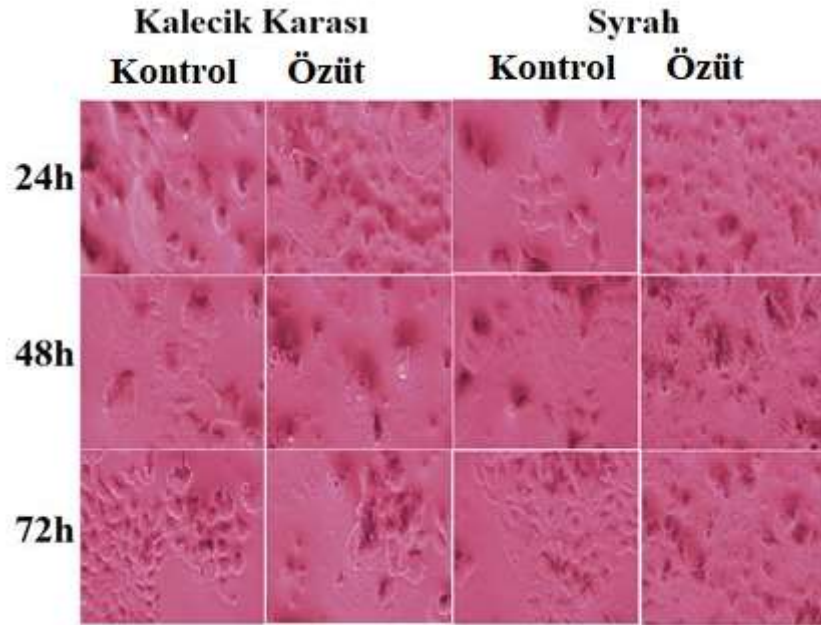


Grafik 4.25. Öküzgözü'nün 72 saat sonra kanser hücrelerine etkisi

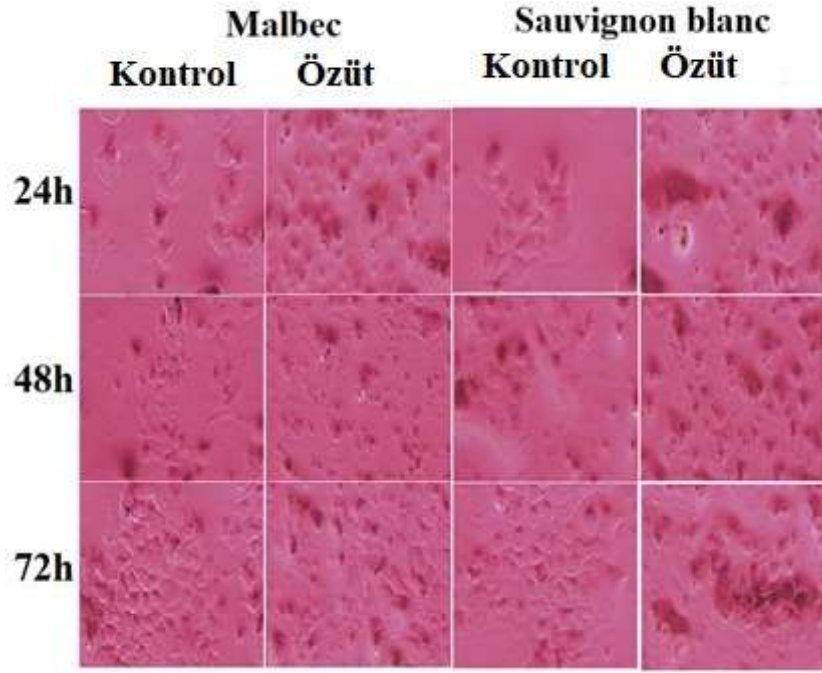
Huh7 hücre hattının üzüm özütleri ile muamelesinden sonra hücre hattındaki morfolojik değişimleri göstermek amacıyla örneklerin farklı zamanlarda (24 saat, 48 saat ve 72 saat) mikroskop görüntüleri alınmıştır (Fotoğraf 4.1- Fotoğraf 4.4).



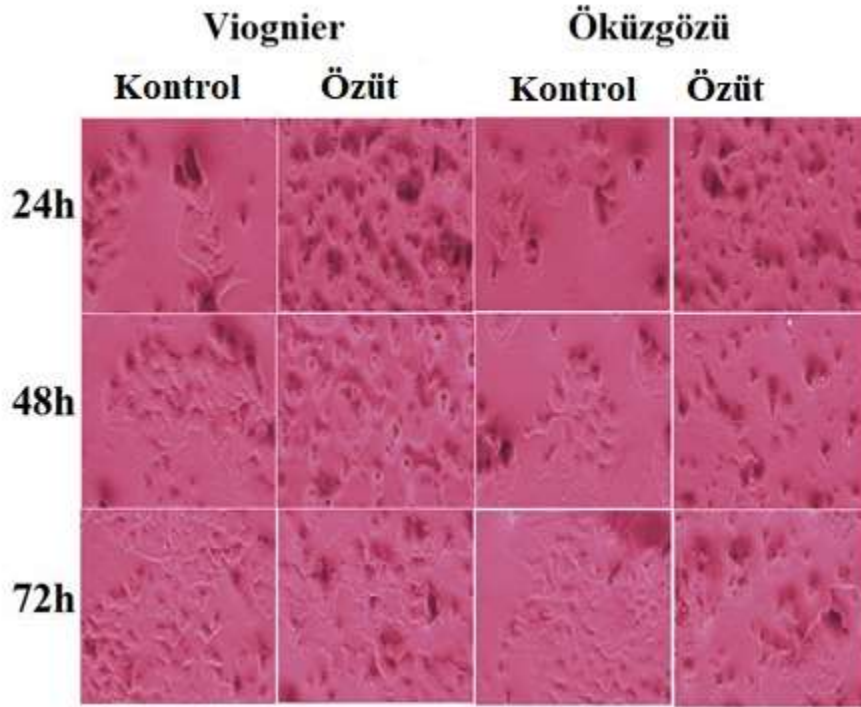
Fotoğraf 4.1. Boğazkere ve Narince özütü ile muamele sonrası Huh7 hücrelerinin morfolojik değişimleri



Fotoğraf 4.2. Kalecik Karası ve Syrah özütü ile muamele sonra Huh7 hücrelerinin morfolojik değişiklikleri



Fotoğraf 4.3. Malbec ve Sauvignon Blanc özütü ile muamele sonra Huh7 hücrelerinin morfolojik değişiklikleri



Fotoğraf 4.4. Viognier ve Öküzgözü özütü ile muamele sonrası Huh7 hücrelerinin morfolojik değişiklikleri

5. TARTIŞMA

Üzümün kültüre alınması ve farklı amaçlarla insanlar tarafından kullanılması insanlık tarihi kadar eskidir. Asma bitkisinin geçmişten günümüze meyve, sürgün ve yaprakları bir çok alanda kullanılmıştır. Üzüm meyvesi taze tüketilmesinin yanında, pekmez, marmelat, şarap, ve daha br çok şekilde kullanılmaktadır. Üzümün farklı kısımlarından elde edilen drog veya kimyasal bileşikler, kozmetik sanayi ve ilaç sanayinde geniş bir kullanıma sahiptir. Ayrıca geleneksel tıpta da önemli bir kullanıma sahiptir. Bu nedenle üzüm üzerinde en çok çalışma yapılan bitkilerin başında gelmektedir. Modern teknoloji ve laboratuvar imkanlarının gelişmesiyle birlikte üzüm üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bileşikler, cilt hastalıkları, enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavisi gibi bir çok hastalığın tedavisinde önemli katkılar sağlamaktadır. Dünya çapında çok sayıda çeşide sahip olması nedeniyle üzüm üzerine yapılan çalışmalar hız kesmeden devam edilmektedir.

Bu tur çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla ülkemizde yetiştirilen 8 farklı üzüm çeşidinin biyokimyasal içeriği, antioksidan ve antikanser özellikleri ayrıntılı olarak çalışılmıştır.

Üzüm çeşitleinin biyokimyasal içerik analizi sonucunda her çeşit için çok sayıda bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin önemli bölümü çeşitler arasında ortak iken miktarlarında farklılıklar tespit edilmiştir. Ayrıca üzüm çeşitleri arasında kimyasal kompozisyon bakımından da önemli farklılıklar olduğu kaydedilmiştir. Biyokimyasal kompozisyon bakımından en zengin çeşidin Narince olduğu tespit edilmiş, bu çeşidin antioksidan özelliğinin de en yüksek olmasının bu içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar üzümün içeriğindeki fenolik bileşikler ve flavonoidlere bağlı olarak antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerinin arttığı belirtilmiştir [19,20]. çalışmamızda da en yüksek antioksidan etki içerik bakımından en zengin olan narince çeşidi tarafından sergilenmiştir.

Çalışmamızda Narince, Boğazkere, Viognier, Kalecik karası, Malbec, Sauvignon blanc, Öküzgözü ve Syrah olmak üzere 8 farklı çeşiten etanol ve su kullanılarak elde edilen özütlerin antikanser aktivitesi kanser Huh7 karaciğer hücre hattı üzerinde test edilmiştir. Özütlerir farklı konsantrasyonlarda farklı sürelerle Huh7 hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Çalışma sonucunda üzüm özütlerinin kanser hücrelerinin büyümesi, % 14 ile %40 arasında değişen oranlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Dinicola vd. [19] üzüm tohum özütlerinin kolon kanseri hücre hatları üzerinde önemli oranda inhibisyon gösterdiklerini belirtmiştir. Popescu vd. [20] üzüm tohum özütlerinin doza bağımlı olarak hücre koruyucu etkisinin arttığını belirtmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar üzüm çekirdeğinden izole edilen Resveratrol bileşiğinin kanser tedavisinde önemli bir terapötik ajan olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır.

Postescu vd. [20], çalışmalarında üzüm özütlerinin etkisinin doza bağımlı olduğunu belirtmişlerdir ve benzer durumun çalışmamızda da geçerli olduğu görülmektedir. Düşük üzüm özütleri, kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonunda önemli bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, doz arttıkça daha iyi bir etki gözlenmiştir. Postescu vd. [20] düşük konsantrasyonları 10 μ M ile 30 μ M arasında kullanılmış, ancak çalışmamızda üzüm özütlerinin etkisini daha iyi görebilmek için 1 mg/ml kadar yüksek konsantrasyonları kullanılması tercih edilmiştir.

Zhang vd. [30] kanser hücrelerinin tedavisinde üzüm özütleri kullanarak, üzümün kanser apoptozu konusunda da umut verici sonuçlar doğurabileceğini göstermiştir ve bu durumun, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla yine aynı olduğu görülmektedir. Zhang vd. [30], üzüm özütleri kullanılarak kanser hücrelerinin inhibisyonunun, iki farklı hücre hattında %50 olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, Sauvignon blanc türü kullanılarak kanser hücrelerinin büyüme oranı %40 oranında azaltılmıştır. Bu üzüm çeşidinin apoptoz üzerine etkisi ile ilgili ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışma ülkemizde yetiştirilen 8 farklı üzüm çeşidinin biyokimyasal kompozisyonu, antioksidan özellikleri ve antikanser özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları her bir üzüm çeşidinin farklı miktar ve kompozisyonda kimyasal bileşiklere sahip olduğunu, en zengin kimyasal içeriğe sahip çeşidin Narince çeşidi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu kompozisyona paralel olarak tüm çeşitler antioksidant etkinlik göstermekle beraber en yüksek antioksidan etkinlik Narince çeşidi tarafından sergilenmiştir.

Üzüm özütlerinin kanser hücre hatları üzerindeki antikanser etkileri farklı konsantrasyonlar için farklı sürelerle test edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en iyi antikanser etkisi gösteren ekstraktların Narince, Kalecik karası, Malbec, Viognier ve Sauvignon blanc olduğu tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Narince, Kalecik karası Malbec ve Viognier çeşitleri sırasıyla %30, %18, %16 ve %14 oranlarında inhibisyon sergilemişlerdir.

72 saat inkübasyon sonunda Sauvignon blanc %40 'lık inhibisyon oranı ile en yüksek antikanser aktiviteyi sergilerken, Kalecik karası %39, Boğazkere, Narince ve Malbec %28, Viognier %26 ve Syrah %17 oranında inhibisyon sergilemişlerdir.

Gerek antioksidan özellikleri bakımından gerekse antikanser özellikleri bakımından Narince, Sauvignon blanc, Kalecik karası, Boğazkere ve Malbec çeşitleri önem arz etmektedir. Bu nedenle bu çeşitler üzerine daha ileri testlerin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Yadav, M., Jain, S., Bhardwaj, bir., Nagpal, R., Puniya, M., Tomar, R., Singh, V., Parkash, O., Prasad, T. R., Marotta, F. & Yadav, H. (2009). Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *Journal of Medicinal Food*, 12(3): 473–484.
- [2] Ryan, E. P. (2011). Bioactive food components and health properties of rice bran. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(5): 593–600.
- [3] Vouillamoz, J. F. & Grando, M. S. (2006). Genealogy of wine grape cultivars: ‘Pinot’ is related to ‘Syrah,’. *Heredity (Edinb)*, 97(2): 102.
- [4] Calò, A. Costacurta, A., Maraš, V., Meneghetti, S. & Crespan, M. (2008). Molecular correlation of Zinfandel (Primitivo) with Austrian, Croatian, and Hungarian cultivars and Kratošija, an additional synonym. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2): 205–209.
- [5] Eckhardt, K. & Arnold, J. G. (2001). Automatic calibration of a distributed catchment model. *Journal of Hydrology*, 251(1-2): 103–109.
- [6] Galet, P. (1998). *Grape varieties and rootstock varieties*. Oenoplurimédia.
- [7] Hakimuddin, F., Paliyath, G. & Meckling, K. (2004). Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85(1): 65–79.
- [8] Wang, C. Z., Fishbein, A., Aung, H. H., Mehendale, S. R., Chang, W. T., Xie, J. T., Li, J. & Yuan C. S. (2005). Polyphenol contents in grape-seed extracts correlate with antipica effects in cisplatin-treated rats. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine: Paradigm, Practice, and Policy* 11(6): 1059–1065.
- [9] Tang Y. & Chan, S. (2014). A review of the pharmacological effects of piceatannol on cardiovascular diseases. *Phytotherapy Research*, 28(11): 1581–1588.
- [10] Amico, V., Barresi, V., Chillemi, R., Condorelli, D. F., Sciuto, D., Spatafora, C. & Tringali, C. (2009). Bioassay-guided isolation of antiproliferative compounds from grape (*Vitis vinifera*) stems. *Natural Product Communications*, 4(1): 27–34.
- [11] Weidner, S., Rybarczyk, A., Karamać, M., Król, A., Mostek, A., Grębosz, J. & Amarowicz, R. (2013). Differences in the phenolic composition and antioxidant properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* seeds extracts. *Molecules*, 18(3): 3410–3426.

- [12] Chiou, A., Panagopoulou, E. A., Gatzali, F., De Marchi, S. & Karathanos, V. T. (2014). Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). *Food Chemistry*, 146: 157–165.
- [13] Antonioli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P. & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry* vol. 178, pp. 172–178, 2015.
- [14] de la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á. & Obreque-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7): 1521–1527.
- [15] Nassiri-Asl, M. & Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive constituents: an update. *Phytotherapy Research*, 30(9): 1392–1403.
- [16] Orange, D. M. (2000). *Deutung,*” in *Wörterbuch der Psychotherapie*. Springer, pp. 127–128.
- [17] URL-1 Türkiye bağcılığı ve bazı üzüm çeşitlerimiz. Available: <http://www.tarimkutuphanesi.com>. 22.05.2018 tarihinde elde edilmiştir.
- [18] Sahpazidoua, D., Geromichalosa, G. D., Stagos, D., Apostolou, A., Haroutounian, S. A., Tsatsakis, A. M., Tzanakakis, G. N., Hayes, A. W. & Kouretas, D. (2014). Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicology Letters*, 230(2): 218–224.
- [19] Dinicola, S., Cucina, A., Pasqualato, A., D'Anselmi, F., Proietti, S., Lisi, E., Pasqua, G., Antonacci, D. & Bizzarri, M. (2012). Antiproliferative and apoptotic effects triggered by grape seed extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1): 651–664.
- [20] Postescu, I. D., Chereches, G., Tatomir, C., Daicovicu, D. & Filip, G. A. (2012). Modulation of doxorubicin-induced oxidative stress by a grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract in normal and tumor cells. *Journal of Medicinal Food*, 15(7): 639–645.
- [21] Aires, V., Limagne, E. Cotte, A. K., Latruffe, N., Ghiringhelli, F. & Delmas, D. (2013). Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(7): 1170–1181.
- [22] Kaliora, A. C., Kountouri, A. M., Karathanos, V. T., Koumbi, L., Papadopoulos, N. G. & Andrikopoulos, N. K. (2008). Effect of Greek raisins (*Vitis vinifera* L.) from different origins on gastric cancer cell growth. *Nutrition and Cancer*, 60(6): 792–799.

- [23] Kountouri, A. M., Gioxari, A., Karvela, E., Kaliora, A. C., Karvelas, M. & Karathanos, V. T. (2013). Chemopreventive properties of raisins originating from Greece in colon cancer cells. *Food Funct.*, 4(3): 66–372.
- [24] Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N., Trizoglou I., Wallace, H. A., Tsatsakis A. M. & Kouretas D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 61: 60–68.
- [25] Aghbali, A., Hosseini, S. V., Delazar, A., Gharavi, N. K., Shahneh, F. Z., Orangi, M., Bandehagh, A. & Baradaran, B. (2013). Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(3): 186.
- [26] Shrotriya, S., Deep, G., Gu, M., Kaur, M., Jain, A. K., Inturi, S., Agarwal, R. & Agarwal, C. (2012). Generation of reactive oxygen species by grape seed extract causes irreparable DNA damage leading to G 2/M arrest and apoptosis selectively in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 33(4): 848–858.
- [27] Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M. & Sun, X. J. (2012). Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10):3462–3467.
- [28] Parekh, P., Motiwale, L., Naik, N. & Rao, K. V. K. (2011). Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(1-2): 167–173.
- [29] Kang, J-W., Kim, S-J., Kim, H-Y., Cho, S. H., Kim, K. N., Lee S. G. & Lee S-M. (2012). Protective effects of HV-P411 complex against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(3): 467–480.
- [30] Zhang, P., Li, H., Yang, B., Yang, F., Zhang, L. L., Kong, Q. Y. , Chen, X. Y., Wu, M. L. & Liu, J. (2014). Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. *Genes Cancer*, 5(5-6): 154.
- [31] Yi, W., Fischer, J. & Akoh, C. C. (2005). Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22): 8804–8812.
- [32] Jang, M. & Pezzuto, J. M. (1999). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(2-3): 65–77.

- [33] Cantos, E., Espin, J. C. & Tomás-Barberán, F. A. (2002). Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC–DAD–MS–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20): 5691–5696.
- [34] Llobera, A. & Cañellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry*, 101(2): 659–666.
- [35] Liang, Z., Cheng, L., Zhong, G-Y. & Liu, R. H. (2014). Antioxidant and antiproliferative activities of twenty-four *Vitis vinifera* grapes. *PLOS ONE*, 9(8): e105146.
- [36] Shanmuganayagam, D., Beahm, M. R., Kuhns, M. A., Krueger, C. G., Reed, J. D. & Folts, J. D. (2012). Differential effects of grape (*Vitis vinifera*) skin polyphenolics on human platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23): 5787–5794.
- [37] Resende, A. C., Emiliano, A. F., Cordeiro, V. S., de Bem, G. F., de Cavalho, L. C., de Oliveira, P. R., Neto, M. L., Costa, C. A., Boaventura, G. T. & de Moura, R. S. (2013). Grape skin extract protects against programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal high-fat diet during lactation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12): 2119–2126.
- [38] Tiwari, R., Mohan, M., Kasture, S., Maxia, A. & Ballero, M. (2009). Cardioprotective potential of myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Phytotherapy Research: an International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(10): 1361–1366.
- [39] Godse, S. Mohan, M. Kasture, V. & Kasture, S. (2010). Effect of myricetin on blood pressure and metabolic alterations in fructose hypertensive rats. *Pharmaceutical Biology*, 48(5): 494–498.
- [40] Borde, P., Mohan, M. & Kasture, S. (2011). Effect of myricetin on deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-hypertensive rats. *Natural Product Research*, 25(16): 1549–1559.
- [41] Yanni, A. E., Efthymiou, V., Lelovas, P., Agrogiannis, G., Kostomitsopoulos, N. & Karathanos, V. T. (2015). Effects of dietary Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits. *Food Funct.*, 6(3): 963–971.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Laila Radwan Abdalla ELFOGOHI
Doğum Yeri ve Yılı : Libya / 1986
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : lailaabdalla03@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Almarkazeya (2003-2004)
Lisans : Sirt Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2007-2008)

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Sirt Üniversitesi (Asistan)

Yayınları

- Uğurlu, A., Alfogohi, L. R. A., Çiçek, S., Salihoğlu, K., & Çeter, T. (2018). Cytotoxic activity screening of *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* extracts. *Ecology 2018*, 19-23 June 2018, Kastamonu, Turkey.
- Uğurlu, A., Alfogohi, L. R. A., Çiçek, S., Salihoğlu, K., & Çeter, T. (2018). The effect of some *Vitis vinifera* ssp. *vinifera* Extracts on Huh7 hepatocarcinoma cells. *International Congress On Engineering and Life Science (ICELIS 2018)*. 26-29 April 2018, Kastamonu, Turkey
- Elfogohi, L. R. A., Tepe, H. D., Yazgan, I., & Çeter, T. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of 8 grape extracts. *2nd. Aerobiology and Palynology Symposium (APAS2018)*. 7-10 October 2018, Yasmin Bodrum Resort, Bodrum, Muğla, Turkey
- Elfogohi, L. R. A., Tepe, H. D., Yazgan, İ., & Çeter, T. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of seven different grape extracts. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series C; Biology*, 27(2); 47-54