***LAVANDULA LATIFOLIA* Medik.**

UÇUCU YAĞININ ANJİYOGENEZ VE

BAZI MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP)

ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yüksek Lisans Tezi

Görkem Şener

Eskişehir, 2016

LAVANDULA LATIFOLIA Medik. UÇUCU YAĞININ ANJİYOGENEZ VE BAZI MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP) ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Görkem ŞENER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos, 2016

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1601S030 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Görkem Şener'in "*Lavandula latifolia* Medik. Uçucu Yağının Anjiyogenez ve Bazı Matriks Metalloproteinaz (MMP) Enzimleri Üzerine Etkileri" başlıklı tezi 06/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek ''Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği''nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı-Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ Anadolu Üniversitesi	.....
Üye	: Prof. Dr. Neşe KIRIMER Anadolu Üniversitesi	.....
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ÇABUK Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	.....

.....

Enstitüsü Müdürü

ÖZET

LAVANDULA LATIFOLIA Medik. UÇUCU YAĞININ ANJİYOGENEZ VE BAZI MATRİKS METALLOPROTEİNAZ (MMP) ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Görkem ŞENER

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos, 2016

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Avrupa Farmakopesinde bulunan lavanta uçucu yağları (*Lavandula angustifolia* Mill. - İngiliz Lavantası; *L. latifolia* Medik. - Sivri Lavanta) aromatik ve biyolojik aktivite özelliklerinden dolayı geniş bir alanda kullanılır. Bu yağların karminatif, sedatif, haricen böcek kovucu vb. özelliklerinden dolayı bitkisel preparatlarda ve kokusundan dolayı da parfüm ve kozmetiklerde kullanılımları mevcuttur.

Matriks metalloproteinaz (MMP) grubu enzimlerin çoğu fizyolojik süreçte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir; ayrıca enflamasyon, yara iyi edici ve kanser hücre invazyonları gibi patolojik süreçlerde dokuların yeniden yapılandırılmasında görev alırlar. Diğer taraftan anjiyogenezin tümör büyümesinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir; malin ve malin olmayan birçok hastalığın tedavisinde anjiyogenezi inhibe eden doğal ve sentetik ilaçların klinik kullanımları ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır.

Bu proje kapsamında çalışma materyali olarak gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisiyle bileşiminin Avrupa Farmakopesi kalitesinde olduğu doğrulanan *L. latifolia* uçucu yağı (Spica aetheroleum) kullanılmıştır. Bu uçucu yağ ile *in vitro* olarak MMP-2 ve 9 enzimleri üzerine spektrofotometrik yöntemle; tavuk embriyosu kullanarak da *in vivo* olarak anjiyogenez ve antienflamatuvar etkisi karşılaştırmalı olarak ilk defa değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 0,4 mg/mL konsantrasyonda MMP enzim inhibisyon etkisi olmadığı ve antianjiyogenik etkisinin ise skorlama sistemine göre zayıf olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Lavandula latifolia* uçucu yağı; MMP; *in vivo* Anjiyogenez; Antienflamatuvar

ABSTRACT

EFFECTS OF *LAVANDULA LATIFOLIA* Medik. ESSENTIAL OIL ON ANGIOGENESIS AND SOME MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP) ENZYMES

Görkem ŞENER

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate Institute of Health Sciences, August, 2016

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Lavender essential oils (*Lavandula angustifolia* Mill., - English Lavander; *L. latifolia* Medik.- Spike Lavender) of the European Pharmacopoeia are widely utilized due to their aromatic and biological activities. Lavender oils are indicated as carminative, sedative and externally as insect repellant in herbal preparations, and are used for their fragrance in perfumes as well as cosmetics.

Matrix metalloproteinases (MMP) play an important role in many physiological processes and also participate in the re-organization of pathological processes such as inflammation, wound healing and cancer cell invasions. Whereas angiogenesis is known to play a key role in tumor growth, thus specific synthetic and natural inhibitory drugs are investigated clinically in the treatment of many malign and non-malign diseases.

In the frame of this project, the Pharmacopeoeia quality of the study material *L. latifolia* essential oil (Spica aetheroleum) was verified by gas chromatography and gas chromatography/mass spectroscopic methods, respectively. Thereafter, the oil was interacted for the first time with MMP-2 and 9 enzymes *in vitro* measured and evaluated spectrophotometrically. For comparison, angiogenic and anti-inflammatory effects of the oil were evaluated by using the *in vivo* chicken embryo assay. As a result, MMP enzyme inhibition at 0,4 mg/mL concentration was not present, whereas weak antiangiogenic effects were observed according to the scoring system.

Keywords: *Lavandula latifolia* essential oil; MMP; *in vivo* Angiogenesis; Anti-inflammatory

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, değerli bilgilerini aktaran, danışman hocam Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye ve Farmakognozi ABD başkanı Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Çalışmam sürecinde analitik yöntemlerde destek olan ve bilgilerini paylaşan Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye,

Enzim çalışmalarıma destek veren Doç. Dr. Halide Edip TEMEL'e,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında verdiği desteklerden ötürü Uzm. Biokim. Nursenem KARACA'ya,

Tüm çalışmalarım esnasında manevi destek gördüğüm değerli Farmakognozi Anabilim Dalı üyelerine,

Yüksek lisans öğrenim dönemim süresince maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

Görkem ŞENER

06/09/2016

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Görkem ŞENER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ……... i

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ……... ii

ÖZET ……..... iii

ABSTRACT …….. iv

ÖNSÖZ …….. v

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ …….. vi

İÇİNDEKİLER ……. vii

TABLOLAR DİZİNİ …… ix

ŞEKİLLER DİZİNİ …….. x

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ ……... xi

1. GİRİŞ VE AMAÇ …….. 1

2. KAYNAK BİLGİLERİ ……. 4

2.1. Botanik Özellikler ……..... 4

2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) familyası ……..... 4

2.1.2. Lavandula cinsi ……..... 4

2.1.3. *Lavandula latifolia* ……..... 5

2.2. Anjiyogenezin Tanımı ……..... 6

2.2.1. Tümör anjiyogenezi ve metastaz ……..... 8

2.2.2. Uçucu yağlar ile yapılan antianjiyogenez çalışmaları ……..... 9

2.2.3. CAM ve HET-CAM modelinin avantajları ve dezavantajları 9

2.3. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri (MMP) ……..... 10

2.3.1. Matriks metalloproteinazların genel özellikleri ……..... 10

2.3.2. MMP enzimlerinin kanser hastalığı mekanizmasındaki rolleri..... 14

2.3.3. Uçucu yağlar ile yapılan MMP enzimleri inhibisyon çalışmaları..... 17

3. GEREÇ VE YÖNTEM …….. 18

3.1. Bitkisel Materyal ……..... 18

3.2. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ……..... 18

3.3. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar ……..... 18

3.4. Kimyasal Analiz Şartları ……..... 18

3.5. Döllenmiş Tavuk Yumurtası ……..... 19

3.6. CAM ve HET-CAM Testi ……..... 19

3.7. CAM ve HET-CAM Sonuçlarının Değerlendirilmesi ……..... 20
3.8. MMP Enzim İnhibisyon Deneyi ……..... 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA ……..... 22
4.1. Uçucu Yağın Bileşimi .....……..... 22
4.2. CAM ve HET-CAM Testi Sonuçları ……..... 24
4.3. MMP Enzim İnhibisyon Deneyi Sonuçları ……..... 26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER ……... 28
KAYNAKÇA ……..... 30
ÖZGEÇMİŞ ……..... 41

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması ……..... 12

Tablo 3.1. CAM üzerindeki antianjiyojenik etkinin hesaplanmasında kullanılan skor sistemi…….. 20

Tablo 3.2. CAM üzerindeki iritasyon etkinin değerlendirilmesinde kullanılan skor sistemi ……. 21

Tablo 4.1. *L. latifolia* uçucu yağının bileşimi……... 23

Tablo 4.2. *L. latifolia* uçucu yağının ve standart maddelerin CAM testi ile belirlenen anti-anjiyojenik ve iritan etkileri ……... 24

Tablo 4.3. *L. latifolia* uçucu yağının antienflamatuvar etki sonuçları ……..... 26

Tablo 4.4. *L. latifolia* uçucu yağının MMP-2 ve -9 enzim inhibisyonu sonuçları ….. 27

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tavuk embriyosunun genel yapısı …… 10

Şekil 2.2. MMP-2 ve -9 enzimlerinin genel yapısı …… 13

Şekil 2.3. MMP enzimlerinin ESM yıkımındaki mekanizması ……... 16

Şekil 4.1. *L. latifolia* uçucu yağının GK kromatogramı ……... 22

Şekil 4.2. Normal embriyo gelişimi-Agar (% 2,5) …… 24

Şekil 4.3. CAM üzerinde kuvvetli anti-anjiyojenik etki-(±)-Talidomit (50 μg/pellet)…… 24

Şekil 4.4. CAM üzerinde kuvvetli anti-anjiyojenik etki-Kortizon (50 μg/pellet) 25

Şekil 4.5. CAM üzerinde zayıf anti-anjiyojenik etki-*L. latifolia* (250 μg/pellet) 25

Şekil 4.6. İritasyon yok (Agar % 2,5) ……..... 25

Şekil 4.7. Hemoraj tipi iritasyon (*L. latifolia* 250 μg/pellet) ……..... 25

Şekil 4.8. SDS ile enflamasyon oluşumu (50 μg/pellet) ……. 26

Şekil 4.9. Zayıf antienflamatuvar etki (*L. latifolia* 250 μg/pellet) …….. 26

Şekil 4.10. Kuvvetli antienflamatuvar etki (Daidzein: 50 μg/pellet) …….. 26

Şekil 4.11. Kuvvetli antienflamatuvar etki (Kortizon 50 μg/pellet) ……... 26

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
AITC	: Allyl isothiocyanate (= Allil izotiyosiyanat)
AİD	: Alev iyonlaşma dedektörü
β	: Beta
bFGF	: Basic fibroblast growth factor (= Temel fibroblast büyüme faktörü)
CAM	: Chorioallantoic membrane (= Koryoallantoik membran)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ESM	: Ekstraselüler matriks
FN	: Fibronektin
γ	: Gama
GK	: Gaz kromatografisi (GC)
GK/KS	: Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS)
HET-CAM	: Hen's Egg Test Chorioallantoic membrane (= Tavuk yumurtası koryoallantoik membran testi)
mg/mL	: Miligram / mililitre
mm^3	: Milimetre küp
nm	: Nanometre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NNGH	: *N*-İzobütil-*N*-(4-metoksifenilsülfonil)glisil hidroksamik asit
O_2	: Oksijen
PG	: Proteoglikan
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TIMP	: Tissue inhibitor of metalloproteinase (= Metalloproteinaz doku inhibitörü)
μ**g**	: Mikrogram
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vascular endothelial growth factor (= Vasküler endotelyal büyüme faktörü)
VN	: Vitronektin
Zn^{++}	: Çinko iyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Uçucu yağlar bileşimlerinde bulunan maddelerin biyolojik ve farmakolojik etkileri sayesinde özellikle tedavi, gıda ve kozmetik amaçlı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Lamiaceae (Labiatae) familyasının önemli cinslerinden biri olan *Lavandula* L.-lavanta bitkisinin farklı tür ve kültür formlarından elde edilen uçucu yağlarının dünyada yaygın bir şekilde üretimi, kullanımı ve ticareti gerçekleştirilmektedir. Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı lavanta (*Lavandula latifolia* flos Medik. ve *L. angustifolia* flos Mill.) uçucu yağları aromatik ve biyolojik aktivite özellikleri ihtiva etmesine sebep olan fitokimyasal bileşimi sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Lavanta uçucu yağlarının sedef, dermatit ve egzama gibi cilt rahatsızlıklarında kullanımları ve topikal uygulamaları yanında antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Cavanagh and Wilkinson, 2002, s. 301; Woronuk vd., 2011, s. 7; Danh vd., 2012, s. 27). Lavanta uçucu yağlarının farklı etkileri ilgi çekmekte ve araştırmalar ile aydınlatılmaya devam edilmektedir.

Farmakope, ilaç hammaddeleri, yardımcı maddeleri ile preparatlarının analizleri için uygun yöntemleri ve kalite standartlarını içeren monograflardan oluşan kaynak kitaplardır. Bitkisel preparatlar kapsamında değerlendirilen belirli uçucu yağlar ile ilaç etken maddelerinin bulunduğu standartlar ve kalite parametreleri de Farmakopelerde belirli aralıklarla güncellenmektedir (Anonim, Ph. Eur. 8.0).

Tez projemiz kapsamında Avrupa Farmakopesi (Ph. Eur. 8.0) esas alınmıştır. Çalışma materyali olarak gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisiyle bileşiminin Avrupa Farmakopesi kalitesinde olduğu doğrulanan *L. latifolia* uçucu yağı (Spica aetheroleum) kullanılmıştır.

Embriyo gelişimi safhasında damar sisteminin gelişiminde başlıca iki olay söz konusudur: Vaskülogenez ve anjiyogenez. Vaskülogenez, anjiyoblasttaki endotel hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan bir yapıdır (Rajkumar vd., 2002, s. 33). Anjiyogenez ise vaskülogenez sonucunda meydana gelmiş, mevcut kan damarlarından tomurcuklanarak oluşan yeni kan damarı yapısıdır (Pinedo and Slamon, 2000, s. 1; Goodsell, 2002, s. 569). Anjiyogenez süreci birçok etkenin içerisinde yer aldığı mekanizma ile meydana gelir. Ekstraselüler matriks (ESM) ve matriks çevresindeki hücrelerden salgılanan büyüme faktörü, sitokinler ve bu yapıların reseptörleri mekanizma içerisinde işleve sahiptir (Goodsell, 2002, s. 569). Kılcal kan damarları, dokunun büyümesi ve gelişmesi esnasındaki oluşabilecek gelişim ihtiyaçlarını

karşılamak ya da yaralanan dokuların onarımını sağlamak için besin, oksijen, büyüme faktörleri ve hormonları dokuya taşır. Tümör hücresinin hacminin ve sayısının artması için gerekli olan besini sağlama da difüzyon tipi hücre beslenmesi yeterli olamaz. Tümör bu sınırlı ve yetersiz beslenme tipini aşabilmeyi anjiyogenez sonucu oluşan yeni kan damarları ile sağlar ve metastaza giden bir süreç bu dönemde başlatılmış olur (Tobelem, 2007, s. 153; Aktaş ve Akbulut, 2014, s. 68). Anjiyogenez fizyolojik ve patolojik olarak 2 tipte karşımıza çıkar. Fizyolojik anjiyogenez metabolizma sistemi dahilinde kontrol altında ve belli sınırlar dahilinde gerçekleşir. Fizyolojik anjiyogenez tiplerinden birisi embriyogenez olup, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde işleve sahip anjiyogenez tipidir. Patolojik anjiyogenez ise kontrol altında tutulamaz ve ilerleyicidir. Patolojik tip anjiyogeneze enflamatuvar rahatsızlıklar ve kanser gibi hastalıklarda rastlanır (Ferrara and Kerbel, 2005, s. 967; Demirci, 2006, s.1).

Kanser, çevresel ve genetiksel faktörlerin, hücrelerin DNA ve kromozomlarında yer alan fonksiyonel bir yapı olan genlerde oluşturduğu değişiklikler sonucu kontrolsüz bir şekilde hücrelerin bölünmeye başlaması ile oluşan bir hastalıktır. Bu süreçte hücre bölünme fazlarının arasında dinlenme evresi olan G0 evresi pasif hale gelir ve hücre dinlenmeksizin sürekli bir bölünme siklusu içerisine girer. Ayrıca kanserli bir dokunun ortaya çıkabilmesi için kontrolsüz şekilde meydana gelen hücre sayısının artmasının yanında yapışma ve sıçrama gibi malign tipteki özelliklerin de hücresel yapı içerisinde yer alması gerekir. Bu süreçteki önem arzeden kilit moleküllerden biri de ekstrasellüler matriks (ESM) elemanlarıdır (Liotta, Steeg and Stetler-Stevenson, 1991, s. 327). ESM yapı fizyolojik işleyişin düzenlenmesinde ve sürdürülmesinde görevlidir. ESM; hücrelerin farklılaşması, kontrolsüz çoğalması ve göçü ile yapışma, doku farklılaşması gibi birçok biyolojik aktivite olayında etkili olmakla birlikte tümör hücresinin büyümesini ve yayılmasını önlemek amacıyla da öncül bir koruyucu şeklinde işleve sahiptir. Kanser hücreleri, bu duvarı aşabilmek için metalloproteinaz yapıları kullanır (Matrisian, 1990, s. 122; Sethi vd., 2000, s. 656; Apakkan, Bayındır ve Özmen, 2001, s. 333). ESM yıkılımı kanserli dokunun metastaz (sıçrama) ve invazyon (yayılma) gerçekleştirebilmesi için şarttır. Matriks metalloproteinazlar (MMP), 28'den fazla enzimi içerisinde barındıran, doku yıkılımının fizyolojik ve patolojik tiplerinde görev alan ekstrasellüler yapıdaki proteazlardır (Hewitt and Dan, 1996, s. 164; Soydinç, Çamlıca ve Duranyılmaz, 2006, s. 54).

MMP enzimleri, kemik yeniden modellenmesi (remodeling) ve organ gelişimi gibi fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamasının yanısıra, antienflamatuvar, yara iyileştirici ve kanser hücrelerinin adhezyonu gibi patolojik süreçlerde de görev alır. Ayrıca, MMP'ler normal fizyolojik sürecin görüldüğü embriyonik gelişim esnasında; ovülasyon, makrofaj ve nötrofil fonksiyonlarında ve patolojik süreçlerde; damar yapısının yenilenmesinde önemli bir görev alır (Yoon vd., 2003, s. 128; Hu vd., 2007, s. 480).

MMP ile anjiyogenez mekanizmaları birbirleri ile karmaşık bir ilişki içerisindedir. MMP-2 ve -9 enzimleri anjiyogenez süreci dahilinde önemli bir role sahiptir (Arkell and Jackson, 2003, s. 381). MMP'lerin anjiyogenezi aktive etmesi ve inhibitörlerini de üretmesi hem apoptotik hem de anti-apoptotik bir mekanizma barındırır (Coussens and Werb, 2002, s. 865).

Demirci vd.'lerinin (2015, s. 1) bir sunumunda; Avrupa Farmakopesi kalitesindeki *L. angustifolia* (İngiliz lavantası) uçucu yağının MMP-2 ve -9 inhibitörü çalışmasında kayda değer bulgular elde edilmesi ve farmakopeye kayıtlı diğer lavanta türü olan *L. latifolia* (Sivri lavanta) uçucu yağı ile bu konuda araştırma yapılmamış olması, bu çalışmanın araştırılmasını gerektirmiştir.

Bu proje kapsamında, Spica aetheroleum (*L. latifolia* uçucu yağı)'un jelatinaz grubu enzimler (MMP-2 ve -9) üzerinde *in vitro* olarak inhibisyon etkisi belirlenmiş; *in vivo* antianjiyogenez (CAM-Tavuk embriyosu koryoallantoik membran testi) ve HET-CAM deneyleri ile antienflamatuvar ve antikanser ilişkisi ortaya konulmuş; tüm sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda bileşimi belirlenmiş olan uçucu yağın MMP enzim inhibisyonu ve antianjiyogenik etkinliği ile ilgili bilgilerin ilaç potansiyeli olarak değerlendirilmesi yanında bilimsel literatüre de katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bilgimiz dahilinde, *L. latifolia* uçucu yağının jelatinaz grubu MMP enzimlerine karşı inhibe edici etkileri ve antianjiyojenik aktivitesi ilk kez araştırılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİLERİ

Bu bölümde *L. latifolia* türünün yer aldığı familyanın ve cinsin genel özellikleri ile ilgili bilgiler ve yapılan araştırmalar özetlenmektedir. Botanik bilgiler Türkiye Florası temel alınarak, diğer bölümler ise çeşitli veri tabanları ve literatür bilgileri kullanılarak derlenmiştir.

2.1. Botanik Özellikler

2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) familyası

Lamiaceae kozmopolit bir familya olup, yeryüzünde bazı sıra dışı alanlar haricinde hemen her yerde yetişmektedir. Familyaya ait türler Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere Avustralya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da geniş bir yayılış alanına sahiptir (Guenther, 1954, s.166). Türkiye, familyanın önemli bir gen merkezidir. Dünyada yaklaşık 250 cins ve 7000 tür, Türkiye Florası'nda ise 45 cins, 565 tür ve 735 takson ile temsil edilir. Ülkemiz 245 endemik türle, % 44,7 endemizm oranına sahiptir. Türkiye'nin, takson sayısı bakımından en zengin 3. familyası durumundadır. Gövde 4 köşeli, yapraklar basit veya parçalı halde olup dekkusat tipte diziliş gösterir. Çiçekler sık kümeler halinde toplanarak yaprakların koltuğunda bulunur. Mikroskopik incelemelerde uçucu yağ içeren salgı tüylerinin 8 hücreli pul şeklinde yapıya sahip olması familya için teşhiste önemli karakteristik bir özelliktir (Davis, 1982, s. 36).

Lamiaceae familyasına ait bitki türleri halk arasında çeşitli şekillerde yaygın bir kullanım yelpazesine sahiptir. Çay ya da baharat olarak kullanımları mevcuttur. Uçucu yağ ve içerdiği diğer sekonder metabolitler yönünden çeşitliliğe sahip olması sebebiyle; tıp, eczacılık, gıda ve kozmetik gibi alanlarda oldukça önemli bir yer tutar (Başer, 1993, s. 217; Sezik vd., 2001, s. 101; Kahraman, Celep and Doğan, 2009, s. 289). Bu familyaya ait türlerin ülkemizde etnobotanik kullanımı da oldukça fazladır ve yüzyıllar öncesine dayanmaktadır (Baytop, 1999, s. 284; Tuzlacı ve Erol, 1999, s. 599; Kargıoğlu vd., 2008, s. 769).

2.1.2. Lavandula cinsi

Lavandula cinsine ait türler çok yıllık veya otsu yapıya sahiptir. Brakteol yapısına rastlanabilir. Kaliks oval tüpsü şekilde, (8-)13(-15)-damarlı, kısa 5-dişli; dişler ufaktır.

Korolla 2-dudaklı, üst dudak 2, alt dudak 3-lopludur. Stamen sayısı 4 adet olup korolla tüpünün içerisinde yer alır, didinam tiptedir.

Lavandula cinsi Türkiye'de 2 tür ile temsil edilmektedir. Bu türler *L. angustifolia* (İngiliz lavantası) ve *L. stoechas*'(karabaş otu) tır. *L. stoechas* türünün Lavandula cinsinin içerisinde yer alıp almaması üzerine tartışmalar yapılmaktadır. Bunun sebebi *L. stoechas*'ın Lavandula cinsine ait diğer türlere göre kemotaksonomik açıdan farklılığıdır. Lavandula cinsinin 2 türü Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlıdır. Bu türler *L. angustifolia* ve *L. latifolia*'dır. *L. latifolia* (Sivri lavanta) ülkemizde yetişmemektedir (Mill, 1982, s. 76).

2.1.3. *Lavandula latifolia*

L. latifolia türünün sivri lavanta olarak bilinmesinin yanısıra aynı zamanda da Avrupa'da Portekiz lavantası olarak isimlendirilmektedir. Akdeniz florasında ve Avustralya'da doğal yayılışa sahip, uçucu yağ ihtiva eden çiçekli bir bitkidir. Uçucu yağının ticari değeri ve geniş kullanım alanı sebebi ile kültüre alınmıştır. 30-60 cm uzayabilen, her dem yeşil, yaprakları 3-6 cm uzunluğunda ve 5-8 mm genişliğindedir. Çiçeklenme dönemi Haziran-Eylül ayları arasındadır (Chu and Kemper, 2001, s. 11; Salido vd., 2004, s. 206).

L. latifolia uçucu yağının Avrupa Farmakopesi'nde bileşimi limonen % 0,5-3, 1,8-sineol % 16-39, kafur % 8-16, linalol % 34-50, linalil asetat ≤1,6, α-terpineol % 0,2-2 ve (*E*)-α-bisabolen % 0,4-2,5 aralıklarında verilmiştir.

L. latifolia uçucu yağı *L. angustifolia* türüne göre kafurca zengin olmasından ötürü daha keskin bir kokuya sahiptir. *L. angustifolia* uçucu yağı ile benzer kullanım alanlarına sahip olmakla birlikte ve gıda, aromaterapi, parfümeri ve ilaç endüstrilerinde doğal bir ürün olarak yerini almaktadır (Cooke and Ernst, 2000, s. 494).

L. latifolia uçucu yağı ile yapılan kimyasal analiz çalışmalarında ana bileşenler; Munoz-Bertomeu ve arkadaşları tarafından 1,8-sineol % 11-47,9, linalol % 15,1-54,7 ve kafur % 11,4-18,6, Herraiz-Penalver ve çalışma grubu tarafından 1,8-sineol % 6,6-57,1, linalol % 3,7-61,1 ve kafur % 1,1-46,7, Alatrache ve arkadaşları tarafından 1,8-sineol % 11,7, linalol % 32,3 ve kafur % 12,45, Salido ve çalışma grubu tarafından 1,8-sineol % 28,6-34,9, linalol % 27,2-43,1 ve kafur % 10,8-23,2 olarak rapor edilmiştir (Salido vd., 2004, s. 208; Alatrache vd., 2007, s. 448; Munoz-Bertomeu, Arrillaga and Segura, 2007, s. 485; Herraiz-Penalver vd., 2013, s. 62).

L. latifolia türü ülkemizde doğal olarak yayılış göstermemektedir fakat Isparta ilinde *L. latifolia* ve *L. angustifolia* türlerinden elde edilen hibrit bir tür olan *L* x *intermedia* var. Super A'(lavandin)nın kültürü yapılmaktadır. Lavandini oluşturan 2 türün Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olan lavanta türleri olması dikkat çekmektedir. Uçucu yağ verimi % 1,66 olarak ve ana bileşenleri linalol % 30-45 ve linalil asetat % 20-30 olarak belirlenmiştir. Lavandin uçucu yağında kafur miktarının düşük olması parfümeri ve tıbbi amaçlı kullanımlarda yer bulmasını engellemesine rağmen antimikrobiyal amaçlı kullanımda yerini almaktadır (Guenther, 1954, s. 166; Woronuk vd., 2011, s. 8, Kara and Baydar, 2013, s. 58).

2.2. Anjiyogenezin Tanımı

Anjiyogenez terimi, mevcut damar yapısından yeni damarların meydana gelmesi şeklinde tanımlanmıştır. Anjiyogenez olayı ilk olarak maymun plasentasında anlamlandırılmış olup, Dr. Arthur Hertig tarafından açıklanmıştır (Ribatti, 2009, s. 2). Anjiyogenez mekanizmasının temelini oluşturan endotel hücreleri; ana damarları ve kapiler ağı oluşturan genetik bilgileri ihtiva etmesinin yanında ayrıca perisitler ile birlikte kapiler (kılcal) damarın duvar yapısını oluşturur (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 42). Sağlıklı ve yetişkin bir insanda endotel hücrelerin döngüsü ve anjiyogenezi çok yavaş (3-12 ay) bir şekilde meydana gelirken, yara iyileşmesi, embriyo gelişimi veya korpus luteum yapısının oluşumu gibi yalnızca belli şartlar altında meydana gelen anjiyogenezde ise çok kısa bir sürede gerçekleşir (Paper, 1998, s. 686).

Yeni kapiler damar yapısının meydana gelme süreci 3 aşama ile meydana gelir:

a. Bazal lamina (membran) yapısının proteolitik enzimler tarafından degredasyonu,

b. Endotel hücrelerin aktivitesi, birbirlerine yapışması, migrasyonu ve çoğalması,

c. Tubul oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi

a. *Bazal lamina yapısının proteolitik enzimler tarafından yıkılması:*

Anjiyogenez süreci; kollajen ve laminin gibi damar endotel yapısını oluşturan glikoproteinler ile glikozaminoglikanların (örneğin; kanın pıhtılaşmasını engelleyen heparan sülfat) kovalent bağ sayesinde proteinlere bağlanması ile oluşan proteoglikan yapılarından meydana gelmiş bazal laminanın proteolitik yıkımı ile başlar. Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığı esnada, hücreler ve membran arasında bölünme işlemi meydana gelir. Endotel hücreleri anjiyogenez süreci içerisinde çoğalma

ve yayılma özelliği gösterirler (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 43; McDonald, 2008, s. 17).

Sağlıklı ya da hasarlı dokularda üretilebilen anjiyogenik büyüme faktörleri çevresindeki dokulara difüzyon sistemi ile geçiş yapabilir. Bu büyüme faktörleri, çevresindeki mevcut kapiler damarların yüzeyi üzerinde bulunan endotel hücrelerdeki özgün reseptörlere bağlanır. Böylece büyüme faktörleri aracılığı ile aktifleştirilen proteolitik enzimler, bazal laminanın ve endotel hücrelerinin etrafındaki ESM elemanlarının yıkımına sebep olur. ESM bileşenlerinin yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiler yeni filizlenmeler (anjiyogenez) takip eder (Ausprunk ve Folkman, 1977, s. 54). Endotel hücrelerinin yayılma ve göç süreçlerinin gerçekleşebilmesi için plazminojen aktivatör (PA) ve MMP enzim sisteminin birlikte aktif halde olması gerekir. Doku-tip (tPA) ve ürokinaz-tip (uPA) plazminojen aktivatörleri, serin proteaz grubunun içerisinde kategorilendirilir. Plazminojeni plazmine çevirirler. Plazminin işlevleri arasında; ESM elemanlarının yıkılması ve MMP-1,-3 ve -9 gibi enzimlerin aktivasyonu yer alır (Andreasen vd., 1997, s. 1; Blasi, 1997, s. 415).

b. *Endotel hücrelerin aktivasyonu, adezyonu, migrasyonu ve proliferasyonu:*

Endotel hücreleri anjiyogenik uyarıların etkisi sonucunda proteolitik yıkım ile aktif hale gelerek ESM'e göç eder ve çoğalır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) bu süreçteki anjiyogenik faktörlerden en etkili olanıdır (Ferrara, Gerber and LeCouter, 2003, s. 670).

c. *Tubul oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi:*

ESM elemanlarının depolanması için endotelyal çoğalmanın ardından ekstraselüler yıkılma inhibisyona uğratılmalıdır. Kapiler filizlenmenin başlaması ile ESM yapısında yıkılma ortaya çıkar ve bu şekilde ileri yayılım mümkün hale gelir. Bazal laminanın yıkılması da endotelyal göçe ve kapiler yeni filizlenmelere yol açar. Endotelyal kısmın genişlemesi ve uzaması neticesinde lümen yapıları hücre içi ve hücreler arası boşlukta gelişmeye ve genişlemeye başlar. Bu lümen yapılarından kapiler yeni damarlar meydana gelir. Proteolitik yıkım ve endotel hücrelerinin migrasyonu ile yeni oluşan kapiler damarlar bazal membran yapısını meydana getirirler. Yeni kapiler damarlar olgunlaşıp ve uygun anjiyogeneze maruz kaldıktan sonra antianjiyogenik faktörlerde artış görülürken, anjiyogenik faktörlerde ise azalma görülür. Böylelikle yeni

filizlenen kapiler damarlar kan akışını meydana getirmeye hazır hale gelmiş olur (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 44).

2.2.1. Tümör anjiyogenezi ve metastaz

Anjiyogenez konusu üzerine gelişmeler yaklaşık yüz yıl önce yapılan tümör dokusunda yeni damar yapılarının meydana gelmesi yorumu ile başlamasına ragmen daha sonraki dönemde yeni damarların meydana gelmesi sürecinin tümör metabolitleri ile sağlanan basit bir yeni oluşum olduğu düşüncesine varılarak bu durum tümörün kanlanması şeklinde tanımlandırılmıştır. Bilimdeki gelişmelerin de neticesinde, tümör dokusunun nakillerinde oluştuğu farkedilen yeni damar oluşumlarının konakçı damarlardan köken aldığı yani anjiyogenez kaynaklı bir mekanizmaya sahip olduğu görülmüştür (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 46). Bilimsel çalışmalarının bu konuda yoğunlaşmasının da etkisiyle tümör gelişiminin anjiyogenez ile ilişkili olduğu görüşü bilim adamları tarafından benimsenmeye başlamıştır (Folkman, 1990, s. 5; Ferrara and Kerbel, 2005, s. 970; Ribatti, 2008, s. 4). Anjiyogenezin metastaz sürecini de kolaylaştırıcı bir etkiye sahip olduğu klinik çalışmalarla da gösterilmiştir (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 46). Tümör hücresinin büyümeye başlaması sürecinde; besin, oksijen ve büyüme faktörlerinin söz konusu ihtiyacının artması ile daha fazla meydana gelecek kullanımın sağlanabilmesi amacıyla kapiler damarlar sayıca ve yüzey alanı olarak artış gösterirler. Tümör hücrelerinin çap olarak ve sayıca büyüme göstermesinde anjiyojenik büyüme faktörlerinden birden fazlasının aktif halde olmasının ve anjiyogenez inhibitörlerinin de azalması gerektiği bilinmektedir.

Metastaz süreci, kanser hücrelerinin mevcut doku dışında doğrudan ya da kan-lenf damarları aracılığıyla dolaşım sistemi içerisinde göç etmesi ile başka bölgelere sıçramasıdır. Metastatik hücreler, sistem içerisinde uygun ortamı bulduğu herhangi bir bölgede tekrar yerleşerek çoğalır. Metastaz, tümör gelişim mekanizmasında son ve geri döndürülemez süreç olarak karşımıza çıkmaktadır (Liekens, Clercq De and Neyts, 2001, s. 259). 0.5 mm^3'ten küçük tümör yapıları difüzyon ile O_2 ve besin ihtiyacını sağlayabilir durumda iken, tümör yapısının büyüklüğü 0.5 mm^3 üzerinde olması ile beslenebilmek ve büyüyebilmek için anjiyogeneze bağımlı hale gelir (Konukoğlu ve Turhan, 2005, s. 46).

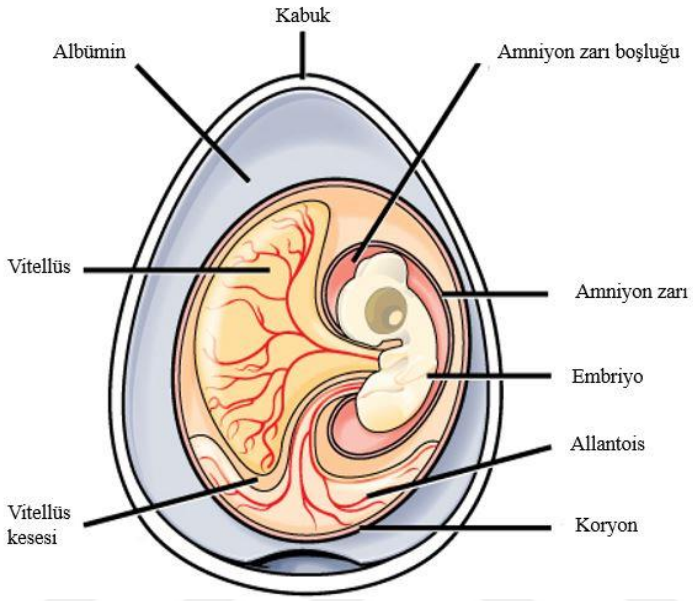
2.2.2. Uçucu yağlar ile yapılan antianjiyogenez çalışmaları

Uçucu yağları kullanarak CAM ve HET-CAM yöntemleri ile antienflamatuvar, antianjiyojenik ve antiirritan etki araştırmaları oldukça az sayıdadır. *Origanum onites* L. uçucu yağının, ana bileşikleri olan karvakrol ve timol ile metil eter türevlerinin CAM testi ile antianjiyojenik etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin 10-250 μg/pellet konsantrasyon aralığında antianjiyojenik etkiye sahip olmadığı fakat timolün CAM yüzeyi üzerinde iritasyon meydana getirdiği bildirilmiştir (Demirci vd., 2004, s. 253). *Salvia huberi* Hedge, *Salvia hedgeana* Dönmez, *Salvia pisidica* Boiss. & Heldr. *ex* Bentham. uçucu yağlarının CAM aktivitesi araştırılmış ve uçucu yağların 100 μg/pellet konsantrasyonda çalışılarak herhangi bir antianjiyojenik, iritan ve toksik etkiye sahip olmadığı raporlanmıştır (Demirci vd., 2005, s. 670). Demirci, Paper ve Franz, (2006, s. 1) *trans*-nerolidol ve *cis*-nerolidol ile yaptıkları antianjiyogenez çalışmasında ise 100 μg/pellet konsantrasyonda zayıf antianjiyojenik etki saptanmıştır. Kumar vd., (2009, s. 82) hardal uçucu yağının içeriğinde bulunan allil izotiyosiyanat (AITC) bileşiğinin proapoptotik ve antianjiyojenik etkilerini araştırmış ve AITC'ın antianjiyojenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Lamiaceae familyasının türü olup ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren *Origanum minutiflorum* ve *Cyclotrichium niveum* uçucu yağları ile yapılan bir çalışmada *C. niveum*'un antianjiyojenik etkili olduğu belirlenmiştir (Goze, Cetin and Goze, 2010, s. 2159).

2.2.3. CAM ve HET-CAM modelinin avantajları ve dezavantajları

CAM ve HET-CAM testi, *in vivo* bir çalışma tipi olup deney hayvanı olarak ratların kullanıldığı Draize testine alternatif bir çalışma yöntemidir. CAM'ın Draize testi ile uyum göstermesinin sebebi kapiler yapısının gözdeki vasküler mukozal yapıya gösterdiği benzerliktir. Bu metot dahilinde, içerisinde döllenmiş tavuk yumurtaları kullanılarak antienflamatuvar (D'arcy and Howard, 1967, s. 378), irritan (Luepke, 1985, s. 287) ve antianjiyojenik (Kishore vd., 2008, s. 449) etkileri değerlendirilebilmek mümkündür. Döllenmiş tavuk yumurtalarının temini pratik ve ekonomiktir. Bu sebepten ötürü tekrarlanabilirlik açısından rahatlık sağlamaktadır. CAM'ın yüzeyinde bulunan kapiler damarlarda meydana gelen değişiklikler bir hafta gibi bir süre zarfında gözlemlenebilmektedir (Demirci vd., 2004, s. 252; Kishore vd., 2008, s. 450; Cazedey vd., 2009, s. 764). Embriyo dönemindeki canlının CAM testi sürecinde henüz sinir sisteminin gelişmediği ve herhangi bir ağrı hissetmediği bildirilmiştir. Ayrıca, CAM

testini gerçekleştirebilmemiz için bir etik kurul onay raporu almamız gerekmemektedir (Kishore vd., 2008, s. 450). Deney süreci 1 haftadır. Etik kurul izninin ise 1 haftadan fazla sürecek olan çalışmalar için alınması gereklidir. Bu sebepten ötürü hayvan alternatifi deneyi olarak değerlendirilmektedir. Tavuk embriyosunun genel yapısı Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1. *Tavuk embriyosunun genel yapısı*

Kaynak: *http-1*

Dezavantaj ise; CAM'nın O_2 değişikliklerine hassasiyet göstermesidir. CAM'nın hava ile teması önlenmelidir. Meydana gelen anjiyojenik etkilerin ayırt edilmesi zor bir işlemdir. Metabolik aktivitelerle ilgili ilaç tarama çalışmalarına paralellik göstermez. Kimyasal veya fiziksel travmalar sonucu meydana gelen hücresel hasarların oluşturabileceği iritasyonlar görülebilir (kırık kabuk parçalarının iritasyona neden olabilmesi gibi).

2.3. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri (MMP)

2.3.1. Matriks metalloproteinazların genel özellikleri

MMP enzim ailesi ilk olarak Gross ve Lapiere tarafından 1962'de metamorfoz safhasındaki iribaşın kuyruğunda tanımlanmıştır. MMP enzimleri, ESM'in yıkımına sebep olan, 28'den fazla Zn^{++} bağımlı enzimi içeren proteaz yapılı bir grubu oluşturur.

MMP enzimleri, ESM'in bütün elemanlarını yıkabilme özelliğine sahiptir. MMP enzimleri doğum sonrası doku onarımı ve fetal gelişim süreci gibi fizyolojik durumlar ile ESM yapısının yeniden modellenmesinde önemli rol üstlenirler. Kanser; serum içeriğinde MMP düzeylerinde yükselişe neden olan en önemli patolojik durumlardan birisidir. Kanser hastalarından alınan serum örneklerinde bazı MMP enzim miktarlarının arttığı bazılarının ise miktarlarında azalma görülmüştür (Gohji vd., 1996, s. 2380).

Yapılarına ve substrat özgüllüklerine göre 5 alt grupta incelenebilirler:

1-Kollajenazlar	(MMP-1, 8, 13, 18)
2- Jelatinazlar	(MMP-2, 9)
3- Stromelisinler	(MMP-3, 10, 11)
4-Membran tipi MMP'ler (MT-MMP)	(MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25)
5-Sınıflandırılamayan MMP'ler	(MMP-7, 12, 19, 20, 21, 23, 26, 27, 28)

Kaynak: *Hidalgo ve Eckhardt, 2001, s. 179*

MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre yapılan sınıflandırması Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. *MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması*

Grup adı	Tanımlayısı isim	Temel substrat
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz	Kollajen 1, 2, 3, 7, 10, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	Kollajen 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz-3	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz-4	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
Jelatinazlar	Jelatinaz A	Jelatin, kollajen 4, 5, 7, 10, 11, elastin
	Jelatinaz B	Jelatin, kollajen 4, 5, 14, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1 Stromelisin	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
	2 Stromelisin 3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
		PG, laminin, elastin, entaktin, tenaksin, versikan,
		jelatin, kollajen 3, 4, 9, 10
Membran tipi	MT1-MMP	Kollajen 1, 2, 3, FN, laminin, VN
MMP'ler	MT2-MMP	Agrekan, FN, laminin, tenaksin
(MT-MMP'ler)	MT3-MMP	Kollajen 3, FN, jelatin
	MT4-MMP	Jelatin
	MT5-MMP	PG
	MT6-MMP	Kolllajen 4, fibrin, fibronektin, jelatin
Diğer MMP'ler	Matrilisin 1	Serin proteaz inhibitörleri
	RASI-I	Kollajen 4, FN, jelatin, lamini, tenaksin
	Enamalisin	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	Tanımlanmamıştır
	CA-MMP	Tanımlanmamıştır
	Matrilisin 2	Kollajen 4, FN, Jelatin, VN
	CMMP	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	Tanımlanmamıştır
	Metaloelastaz	Kollajen 1, 4, elastin, FN, jelatin, laminin, VN

FN:Fibronektin PG:Proteoglikan VN:Vitronektin

Kaynak: *Reel, 2006, s. 529*

Yapısal olarak incelendiğinde MMP-2 ve-9 enzimlerinin 5 temel kısımdan meydana geldiği görülür:

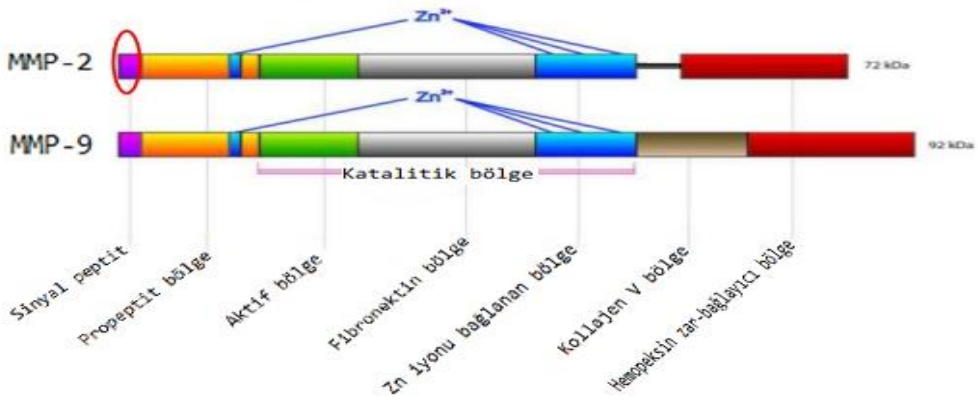
1- Sinyal peptit

2- Propeptit

3- Katalizör kısım (Zn bağlayıcı bölge içerir)

4- Hemopeksin benzeri kısım (substrat spesifitesini belirler)

5- Katalizör kısmı hemopeksin benzeri kısma bağlayan prolin bakımından zengin bölge (Bourboulia ve Stevenson, 2010, s. 164).



Şekil 2.2. *MMP-2 ve -9 enzimlerinin genel yapısı*

Kaynak: *http-2*

MMP enzimleri farklı kategorilere ayrılsa da yapısal olarak benzerliklere sahiptirler. Sinyal peptit endoplazmik retikulum organelinden sentezi gerçekleştirilen ilk protein yapıdır. Propeptit bölge, katalitik Zn bağlayan bölge ile etkileşimde olarak enzimin pasif formda kalmasını, yani aktifleşmesine engel olunmasını sağlayan kısımdır. Katalizör bölge propeptit bölgenin ayrılması ile içeriğinde bulunan Zn^{++} sayesinde enzimin aktivitesini sağlayan bölgedir. MMP-7 ve -26 dışında kalan diğer MMP enzim tipleri C terminalinde hemopeksin/fibronektin bölgeye sahiptirler. Bu bölge peptit yapıdadır ve TIMP'lerin jelatinaz grubu MMP enzimlerine (MMP-2 ve -9) ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir (Reel 2006, s. 530).

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri hem spesifik olmayan (α-2 makroglobilin, α-1 antiproteaz gibi) hem de spesifik olan inhibitörler (TIMP) ile engellenebilir. TIMP (metalloproteinaz doku inhibitörü)'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde görevli olmakla birlikte pek çok dokuda ve vücut sıvılarının içeriğinde de bulunurlar. MMP doku inhibitörleri, MMP enzimlerine kovalent olmayan biçimde geri ayrılamaz şekilde bağlanarak pasif haldeki enzim formunun aktif olmasını ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini inhibe ederler. Böylelikle MMP enzim aktivitesi ile MMP/TIMP dengesi kontrol altında tutulmuş olur. Bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP tipi

bulunmaktadır. Bunlar; TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4'tür. MMP'ler gibi vasküler düz kas, endotel, kan, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler. TIMP'ler; MMP inhibisyonu açısından birbirleri ile benzerlik göstermelerine rağmen matriks içerisindeki konumlanmaları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi bakımından aralarında farklılıklara sahiptirler. Ayrıca farklı MMP tiplerine göre spesifiklik gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP–2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilir (Woessner, 1991, s. 2149; Hidalgo and Eckhardt, 2001, s. 179; Reel, 2006, s. 532).

MMP enzim ailesinin hastalıklarla ilişkilerine bakıldığında önemli olmasının sebebi kolaylıkla anlaşılmaktadır. Kollajenaz (MMP-1, -8, -13) enzimlerinin göğüs kanseri, ateroskleroz ve romatoid artrit, jelatinazların ise (MMP-2, -9) göğüs, kolon, akciğer ve yumurtalık kanseri ile kötü huylu beyin tümörü, bronş genişlemesi, kronik astım, kronik obstriktif akciğer hastalıkları, kistik fibrosiz, hipertansiyon gibi rahatsızlıklarla ilişkileri görülmüştür (Öztürk, 2013, s. 217).

2.3.2. MMP enzimlerinin kanser hastalığı mekanizmasındaki rolleri

Kanser hastalığı üzerine yapılan çalışmalarda MMP enzimlerinin işlevleri uzun yıllardır araştırılan bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu enzimlerin; anjiyogenez, invazyon-metastaz, apoptoz mekanizmasının (programlı hücre ölümü) engellenmesi ve anti-tümör savunma mekanizmaları yoluyla kanser oluşum sürecindeki rollerinin önemi sebebiyle kanser üzerine yapılan araştırmalarda hedef konumunda bulunmaktadır (Kessenbrock, Plaks and Werb, 2010, s. 58; Amelinei vd., 2010, s. 217).

Hücre adhezyonu (yapışma, tutunma), dokunun hücresel organizasyonu için önem arzetmektedir. Adhezyon, hücre bölünmesi sayısının sınırlı tutulması için hücrenin diğer komşu hücrelerle temasında meydana gelen kontakt hali ile hücre bölünmesinin inhibisyonu için gerekli bir mekanizmadır. Kanser hastalığının gelişim sürecine bakacak olursak, hücrelerin organizasyonu ve kontakt inhibisyonun pasif hale gelmesi ana mekanizmalar olarak görülür (Kessenbrock, Plaks and Werb, 2010, s. 54). Matriks metalloproteinaz enzimlerinin, hücrelerin hem komşu hücrelere, hem de ESM elemanlarına kontakt mekanizmalarını etkilediği bilinmektedir (Amelinei vd., 2010, s. 217).

MMP enzimleri invazyon ve metastaz olaylarında epitelyal ve mezenkimal değişim süreçlerinde görevlidir. MMP enzimleri aktivitelerinin artmasına ilave olarak

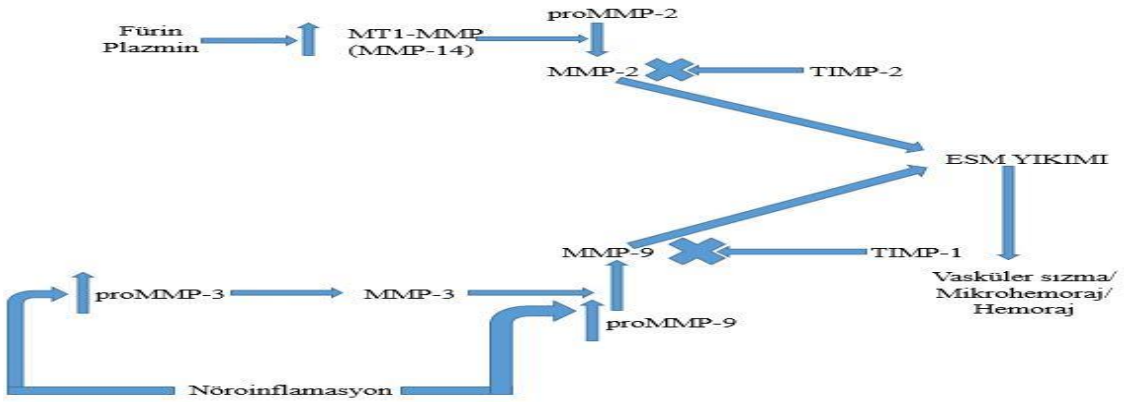
invazyon süreci içerisinde belli bir bölgede odaklanırlar. MMP-2, -9 ve -14 enzimleri ESM parçalanması için birlikte görev almaktadırlar. MMP aktivitesi hücre göçünü (migrasyon) arttırır (Lochter, Galosy and Muschler, 1997, s. 1863; Noe, Fingleton and Jacobs, 2001, s. 111).

Apoptozis (apoptoz mekanizması), organizma içerisinde hasar gördüğü tespit edilen veya tehlikeli olabilecek potansiyele sahip hücrelerin programlı bir mekanizma içerisinde yok edilmesinde görev alan bir mekanizmadır. Hücrelerin virüs ile enfekte olması sonucunda apoptozis mekanizma ile ortadan kaldırılması da örnek olarak verilebilir. Apoptoz mekanizması ile ortadan kaldırılan bir diğer yapı da hasar görmüş DNA yapısıdır. DNA zincirinin mutasyon etkenlerine maruz kalması sonucunda meydana gelen kırılmalar yüzünden genetik kodda meydana gelen hasar sebebiyle kanser gelişimine neden olabileceği için hasarlı olarak nitelendirilen bu hücrelerin apoptozis mekanizması ile öldürülerek sistemden uzaklaştırılması büyük önem arzetmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Vücut sistemi içerisinde oldukça önemli bir yer tutan apoptoz mekanizmasında, MMP'lerin rolü ise TIMP'lerin apoptozda rolü ile ilgili araştırmalarla desteklenmektedir. Genellikle TIMP-3'ün apoptozu arttırıcı veya baskılayıcı etkisi mevcutken, TIMP-1, -2 ve -4'ün antiapoptotik etkileri rapor edilmiştir (Alexander vd., 1996, s. 1669; Wu, Mari and Wang, 2001, s. 552; Fata, Leco and Voura, 2001, s. 839).

Tümör vaskülarizasyonu (damarlanma), anjiyogenez ya da vaskülojenezden (kemik iliğinden kana yayılan vasküler öncül hücreler) kaynaklanır. Damarlanma doku içerisinde meydana gelebilecek invazyon ve metastaz mekanizmaları içerisinde kritik bir önem ihtiva eder. Vaskülarizasyon mekanizması üzerinde MMP'ler de önemli bir rol oynamaktadır. MMP-2, -9, ve -14 enzimleri tümörün damarlanması üzerinde başlıca rol üstlenirken; MMP-1 ve -7 daha az oranda etkiye sahiptir (Bond, 1998, s. 29; Alexander vd., 2001, s. 701). VEGF ve bFGF (Temel fibroblast büyüme faktörü) gibi anjiyogenik mutajenler, kılcal damarlarda bulunan endotel hücreler aracılığıyla MMP enzimlerinin salgılanmasını harekete geçirir (Unemori, Ferrara and Bauer, 1992, s. 557; Littlepage, Sternlicht and Rougier, 2010, s. 2225). MMP enzimlerinin aktivitesinin anjiyogenezin negatif düzenleniminde de yani antianjiyogenez mekanizmasında da görev alıyor olabileceği düşünülmektedir (Lamoreaux, Fitzgerald and Reiner, 1998, s. 30; O'Reilly, Wiederschain and Stetler-Stevenson, 1999, s. 29568). Anjiyogenez inhibitörleri ile ESM elemanları ve diğer ekstrasellüler molekül yapıları parçalanabilmektedir (Dong,

Kumar and Yang, 1997, s. 801). MMP-2, -9 ve -12 enzimleri tarafından plazminojenin (kandaki pıhtı yapısının çözülmesinde görevli alan plazminin inaktif hali) parçalanması anjiyogenez inhibitörü olan yani antianjiyojenik etkiye sahip olan anjiostatin üretiminin önemli bir miktarda artmasına sebep olur. MMP enzimleri; damar yapısında geçirgenlik ve yapısal dengenin kontrolünün sağlanmasında da görev almaktadır (Cornelius, Nehring and Harding, 1998, s. 6845; Heljasvaara, Nyberg and Luostarinen, 2005, s. 293).

Kanser hastalığı sebepli meydana gelen ölüm vakalarının ana sebebi olarak metastaz olayı gösterilmektedir. Metastaz sürecinin başlangıcı, kanser hücrelerinin kan damarları veya lenf sistemi aracılığı ile çevre dokulara ilerlemesi ile görülür. MMP enzimlerinin aracılığı ile meydana gelen sinyal üretiminin metastaz sürecinde meydana gelen artışta önemli rol oynadığı bilinmektedir. MMP enzim inhibisyonu kanser araştırmalarında önem arzeden bir konu olmuştur. MMP enzimleri kanser hastalığı sürecinde çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. ESM yıkımının sebebi olmaları bu duruma örnektir. MMP-1, -2 ve -12 gibi proteolitik yapıdaki enzimler ESM parçalanmasında görev alırlar. MMP-14 enzimi ise süreç yavaşlatıcı etki göstermektedir (Lu, Wang and Hu, 2009, s. 1883). Bu yıkım mekanizması, immün yapı hücrelerinin inflamatuvar süreçte damar dışına sızımı ile alakalıdır. MMP-2 ve -9 enzimleri immün hücrelerin beyin dokusuna göçünde önemli mediatörler olarak görev almaktadır. Tümör sebepli makrofajlardan meydana gelen MMP enzimlerinin, kanser hücrelerinin kan dolaşımına katılmasında ve bu suretle kanserin metastaz mekanizmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Friedl and Wolf, 2008, s. 7247). MMP enzimlerinin ESM yıkımındaki mekanizması Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. *MMP enzimlerinin ESM yıkımındaki mekanizması*

Kaynak: *Wilcock vd., 2011. s. 3*

Çeşitli kanser türlerinde MMP enzimlerinden, kanserin erken süreçte tanısı, hastalığın ilerleyişinin takibi ve metastazın tespit edilmesi gibi önemli durumlarda belirteç olarak yararlanılabilir (Roy, Yang and Moses, 2009, s. 5287).

2.3.3. Uçucu yağlar ile yapılan MMP enzimleri inhibisyon çalışmaları

Literatürde MMP inhibitörü olarak uçucu yağların değerlendirilmesi ile ilgili yapılan çalışma sayısı azdır. *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis*, *Juniperus communis* ve *Salvia fruticosa* uçucu yağlarının MMP-2 ve -9'a karşı inhibitör etkisi çalışılarak ve 5 μL/mL konsantrasyonda toksisite içermeyen konsantrasyonda inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chulia vd., 2012, s. 681). Bu yayında uçucu yağların MMP-2 ve -9 üzerine inhibitör etkisini yorumlarken, antioksidan aktivite göstermeleri ile ilişkisi üzerinde bağlantı kurulmuştur. Chulia vd.,'lerinin (2013, s. 517) bir diğer çalışmasında ise Akdeniz Bölgesi'nden topladıkları Çibriska adı ile de bilinen *Satureja hortensis* yaprak uçucu yağının MMP-2 ve -9 enzimlerine karşı inhibitör etkisi raporlanmıştır.

Kapsamlı literatür taraması sonucunda sentetik MMP inhibitörlerinin toksik olduğu bilgisine ulaşılmıştır ve uçucu yağ ile yapılan çalışma sayısının yetersiz olduğu görülmüştür. Bu inhibitor maddelerinin toksisiteye sahip olması sebebiyle klinik deneme sonuçlarının daha etkili doğal bileşiklere ihtiyaç duyduğu gösterilmektedir (Whang vd., 2012, s. 4164).

MMP ile anjiyogenez mekanizmalarının açık bir şekilde ilişki içerisinde olduğuna dair bilgiler çeşitli çalışmalarda desteklenmektedir (Anand-Apte vd., 1997, s. 817). Bu mekanizmalar arası ilişki durumuna en belirgin yanıt olarak hem sentetik hem de endojen tiplerdeki *in vitro* MMP inhibitörlerinin *in vivo* olarak da anjiyojenik yanıtları da inhibe ettiği gösterilmektedir (Murphy, Unsworth and Stevenson, 1993, s. 352; Benelli vd., 1994, s. 252; Hiraoka vd., 1998, s. 365). Ayrıca Stevenson (1999, s. 1241) yayınladığı bir çalışmada anjiyogenez mekanizmasında proteazların rolünü incelemenin çalışmalarda ilerleyebilmek adına fayda sağlayabileceğini söylemiştir. Bu bağlamda proteaz yapılı bir enzim grubu olan MMP enzimleri ile anjiyogenezin ilişkisi merak konusudur. Örneğin Moses (1997, s. 186), anjiyogenezin önlenmesinde MMP inhibitörlerinin kullanılabileceği üzerine bir çalışma yapmıştır. Sentetik MMP ve anjiyogenez inhibitörlerinin yan etkileri ve zararlarının rapor edilmiş olması sebebiyle doğal bir ürün olan uçucu yağ ile araştırmalar yapmak önem arz etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Projemiz kapsamında St. Wolfgang Apotheke, Kümmersbruck, Almanya firmasının Avrupa Farmakopesi kalitesindeki *L. latifolia* uçucu yağı (Spicae aetheroleum) ile çalışılmıştır.

3.2. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agar (Fluka)
- Kortizon (Sigma-Aldrich)
- (±)-Talidomit (Sigma-Aldrich)
- Daidzein (Tokyo Chemical Endustry)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich)
- % 70'lik Etanol (Etil alkol) (Sentez Lab.)

3.3. Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

- Gaz Kromatografisi (Agilent 6890N GC)
- Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (Agilent 5975 GC-MSD)
- Su banyosu (Nüve BM 302)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı-Vorteks (Ika Genius 3)
- Stereomikroskop (Leica EC3)
- İklimlendirme kabini (Ing. Climas CIR / HR 1300)
- Spektrofotometre cihazı (BioTek PowerWave XS)

3.4. Kimyasal Analiz Şartları

Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) sistemleri ile uçucu yağ analizi gerçekleştirilmiştir. GK analizi Agilent 6890N GC sistemi kullanılarak yapılmıştır. Alev iyonlaşma dedektörü (AİD) sıcaklığı 300°C olarak kaydedilmiştir. GK/KS analizi Agilent 5975 GC/MSD sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bileşenlerin ayrımı için Innowax FSC kolon (60 m x 0,25 mm, film kalınlığı 0,25 μm), taşıyıcı gaz olarak Helyum (0,8 ml/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı ise 250 °C'dir. 70 eV elektron enerjisi ile 35-450 m/z kütle aralığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplam 80 dk süresince; 10 dk 60 °C'de, 4

°C/dk artışla 220 °C'ye, 10 dk 220 °C'de, 1 °C/dk artışla 240 °C'ye yükselen sıcaklık programı uygulanmıştır.

GK sistemi aracılığı ile kolon içerisinde birbirinden ayrılan her bir bileşiğin AİD yardımı ile bağıl yüzdeleri (%) belirlenmiştir. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemlerinde "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi" ve Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 3.1 Kütüphanelerindeki ve MS literatürlerindeki maddelerin kütle spektrumlarına benzerliğinin ve aynı tip kolondaki tutunma indekslerinin karşılaştırılmasından yararlanılarak yapılmıştır (Jennings vd., 1980; ESO 2000, 1999; Koenig, Joulain and Hochmuth, 2004).

3.5. Döllenmiş Tavuk Yumurtası

Döllenmiş tavuk yumurtaları 1. gününde Hastavuk® Gıda-Tarım-Hayvancılık Sanayi Ticaret A.Ş. (Sivrihisar/Eskişehir)'den temin edilmiştir.

3.6. CAM ve HET-CAM Testi

Döllenmiş tavuk yumurtaları dezenfeksiyon işlemi için % 70'lik etanol ile muamele edilerek peçete yardımıyla yüzeyinin silinmesi işlemi uygulandıktan sonra 36,5 °C'de % 80 rölatif nem değerlerine sahip inkübatörde (iklimlendirme kabini) yatay pozisyonda konumlandırılarak 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde yumurtalar belirli aralıklarla dikkatlice çevrilmiştir. İnkübasyon süresi neticesinde yumurtaların alt kısmından bir delik açılarak steril enjektörler yardımıyla dikkatli ve yavaş bir şekilde embriyoya zarar vermeden yaklaşık 10 ml albümin (yumurta akı) uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin uygulanmasının ardından yumurtaların üst kısmı (nispeten diğer tarafına göre dik-sivri olan kısım) pens yardımı ile yumurtaya zarar vermeyecek şekilde özenle açılmış ve bu bölgedeki kabuk ile zar kısımları atılmıştır. Açılan yumurtaların üzeri streç film ile kapatılmıştır, çünkü embriyonik yapının O_2 ile temas etmesi sonucunda zarar gördüğü bilinmektedir. Yumurtalar bu kez dik olarak konumlandırılıp, 36,5 °C'de ve % 80 rölatif nem değerlerine sahip iklimlendirme kabininde 72 saat bekletilmiştir. CAM yüzeyinin çapı yaklaşık olarak 2 cm'ye ulaştığında (yaklaşık 3 gün) % 2,5 konsantrasyonda agarda hazırlanmış numune pelleti her yumurtaya bir adet olmak üzere CAM yüzeyindeki kapilerlere özenle yerleştirilmiştir. Her bir madde grubu için 10-15 adet yumurta kullanılmıştır. Pellet

yerleştirilmiş yumurtalar dik şekilde konumlandırılarak 24 saat daha inkübasyon işlemine bırakılmıştır. Bu süre sonunda madde içeren pelletin kılcal damarlar üzerinde meydana gelen etkileri kalitatif olarak stereomikroskop yardımıyla değerlendirilmiştir. Standart pozitif kontrol maddeleri olarak kortizon ve (±)-talidomit, negatif kontrol maddeleri olarak SDS ve agar kullanılmıştır.

HET-CAM deneyinde (Marchesan vd., 1998, s. 33) ise 5 mg/mL SDS içeren % 2,5 konsantrasyonda agara 50 μg/pellet konsantrasyonundaki standart kontrol maddeleri (kortizon, daidzein) ve 250-500 μg/pellet konsantrasyonlardaki test maddesi ilave edilmiştir. Pelletler CAM yüzeyi üzerine konularak 24 saat 37°C'de % 80 neme sahip ortamda inkübe edilerek stereomikroskop aracılığıyla skorlama sisteminden yararlanılarak meydana gelen enflamasyon ve antienflamatuvar etki değerleri belirlenmiştir. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. CAM ve HET-CAM Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bileşiklerin CAM üzerindeki antianjiyojenik etkisi Tablo 3.1 ve iritan etkileri Tablo 3.2'de gösterilen skorlama sistemine göre yapılmıştır. HET-CAM ile antienflamatuvar etkinin değerlendirilmesinde ise kontrol maddesi olarak SDS'nin etkileri baz alınarak uçucu yağın bulunduğu pelletlerde meydana gelen değişimlere göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. *CAM üzerindeki antianjiyojenik etkinin hesaplanmasında kullanılan skor sistemi*

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0,5	Yok	Embriyo yapısının normal gelişimi
0,5-0,75	Zayıf	Kapiller damarsız alan mevcut değildir. Kapillerlerin yoğunluğu azalmıştır fakat pellet genişliğinden azdır.
> 0,75-1	Kuvvetli	Kapiller yoğunluğu belirli bir bölgede azalmış ya da kapillersiz alan az. Etki pellet alanının iki katını geçmemektedir.
> 1	Çok kuvvetli	Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut. Antianjiyojenik etki.

Değerlendirmede kullanılan ortalama skor hesaplama formülü:

$$\frac{\text{Yumurta sayısı (Skor 2) x 2} + \text{Yumurta sayısı (Skor 1) x 1} + \text{Yumurta sayısı (Skor 0,5) x 0.5}}{\text{Toplam Yumurta sayısı (Skor 0, 0,5, 1, 2)}}$$

Tablo 3.2. *CAM üzerindeki iritasyon etkinin değerlendirilmesinde kullanılan skor sistemi*

Skor	Etki	Açıklama
1	İritasyon	Granuloma kuvvetlice damarlanmıştır ve granulomanın çevresinde kapilerler yıldız biçiminde ağ oluşturmuştur.
2	Zayıf iritasyon	Granuloma zayıf bir damarlanma şekli göstermiştir.
3	Zayıf-normal	Kapiler damar ağı, granulomanın etrafında yıldız biçiminde olup zayıf gelişmiştir ve granulomanın boyutu skor 1 ve 2'ye göre daha küçük ve zayıf bir damarlanma yapısı mevcuttur.
4	Normal damar oluşumu	Yıldız biçimindeki damar ağının ayırt edilmesi zordur. Granuloma veya iz yoktur. Damarlanma normal olarak gerçekleşmiştir.

3.8. MMP Enzim İnhibisyon Deneyi

MMP-2 ve -9 kolorimetrik ilaç keşif kitleri Enzo Life Sciences firmasından tedarik edilmiştir. Kit prosedürüne göre substrat olarak Ac-PLG-(2-merkapto-4-metil-pentanoil)-LG-OC_2H_5 kromojenik tiyopeptid kullanılarak uçucu yağın MMP enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi çalışılmıştır.

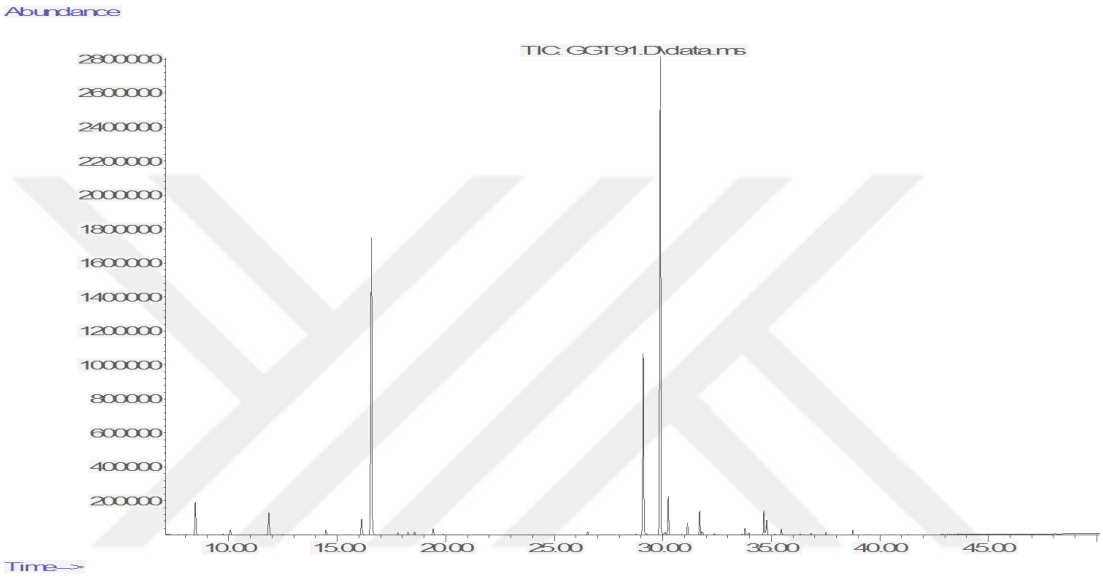
MMP enzimi tarafından tiyopeptidin peptid bağının yıkılması sonucunda bir sülfidril grubu açığa çıkar. Sülfidril grubu Ellman reaktifi ile tepkimeye girerek 412 nm'de belirlenebilen sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asidi oluşturur.

Renk değişimi nedeni ile artan absorbans değerleri 10 dakika süresince ölçülmüştür (Bio-Tek, Powerwave XS, GEN-5 program) ve bu değerler kullanılarak dakikadaki absorbans değişimi hesaplanmıştır. İnhibitör kullanılan ve kullanılmayan test kuyucuğuna ait dakikadaki absorbans değişimi verileri kullanılarak test maddelerinin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Kontrol inhibitör olarak N-İzobütil-N-(4-metoksifenilsülfonil)glisil hidroksamik asit (NNGH) kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Uçucu Yağın Bileşimi

Farmakope kalitesine uygun değerlere sahip olan ve ticari olarak temin edilen *L. latifolia* uçucu yağının GK/AİD ve GK/KS sistemleri ile yapılan analizi neticesinde 33 adet uçucu bileşen içerdiği belirlenmiştir (Tablo 4.1). *L. latifolia* uçucu yağının GK kromatogramı Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *L. latifolia uçucu yağının GK kromatogramı*

Tablo 4.1. *L. latifolia uçucu yağının bileşimi*

No	RRI	Bileşikler	Relatif %
1	1032	*α*-Pinen	2,4
2	1072	*α*-Fenkon	0,1
3	1076	Kamfen	0,4
4	1118	*β*-Pinen	2,1
5	1132	Sabinen	e
6	1174	Mirsen	0,5
7	1203	Limonen	1,4
8	1213	1,8-Sineol	25
9	1246	(*Z*)-*β*-Osimen	0,2
10	1255	*γ*-Terpinen	0,2
11	1266	(*E*)-*β*-Osimen	0,2
12	1280	*p*-Simen	0,4
13	1290	Terpinolen	e
14	1439	*γ*-Kamfolen aldehit	e
15	1532	Kafur	13
16	1553	Linalol	45,8
17	1565	Linalil asetat	1,9
18	1611	Terpinen-4-ol	0,2
19	1612	*β*-Karyofillen	1,1
20	1617	Lavandulil asetat	0,1
21	1684	İzoborneol	0,1
22	1687	*α*-Humulen	0,2
23	1690	*trans*-*β*-Terpineol	e
24	1706	*α*-Terpineol	1,3
25	1719	Borneol	1
26	1726	Germakren D	e
27	1733	Neril asetat	0,3
28	1741	*β*-Bisabolen	e
29	1784	(*E*)-*α*-Bisabolen	e
30	1808	Nerol	0,2
31	1857	Geraniol	0,3
32	1864	*p*-Simen-8-ol	e
33	2008	Karyofillen oksit	e
		Toplam	**98,4**

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: AİD verilerine göre hesaplanmıştır; e:eser miktar < 0,1

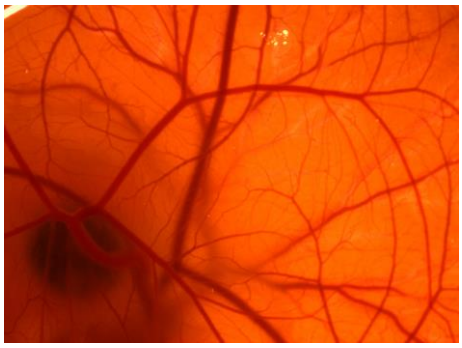
4.2. CAM ve HET-CAM Testi Sonuçları

Uçucu yağ ve standart maddeler, agar yardımı ile pellet şeklinde hazırlanarak CAM yüzeyi üzerine uygulama yöntemi ile sonuçlar kalitatif olarak değerlendirilmiş ve iritasyon etkiye sahip olup olmadığı SDS'ye göre değerlendirilerek Tablo 4.2'de verilmiştir. Değerlendirme neticesinde SDS'nin çok kuvvetli iritasyona yol açtığı görülmüştür. Deneyde kullanılan uçucu yağın 250 μg/pellet ve 500 μg/pellet konsantrasyonlarında zayıf antianjiyojenik etki gösterdiği (Şekil 4.5) ve hemoraj tipinde iritasyon oluşumuna yol açtığı (Şekil 4.7) ve agarın negatif kontrol olarak kullanıldığı deneyde herhangi bir iritasyonun oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Kontrol maddeleri olarak kullanılan (±)-Talidomit (Şekil 4.3) ve kortizon (Şekil 4.4) kuvvetli antianjiyojenik etki göstermiştir. Agarda ise herhangi bir antianjiyojenik etki meydana gelmemiştir (Şekil 4.2).

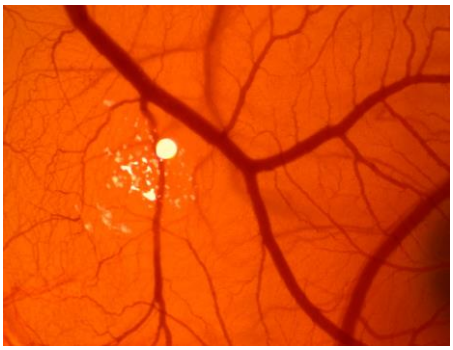
Tablo 4.2. *L. latifolia uçucu yağının ve standart maddelerin CAM testi ile belirlenen anti-anjiyojenik ve iritan etkileri*

Test maddeleri	**Konsantrasyon (μg/pellet)**	**Skor**	**İritasyon**
L. latifolia uçucu yağı	500	0,39	Var (Hemoraj)
L. latifolia uçucu yağı	250	0,5	Var (Hemoraj)
(±)-Talidomit (kontrol)	50	0,75	Yok
Kortizon (kontrol)	50	0,93	Yok
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (kontrol)	50	0	Var
Agar (kontrol)	% 2,5, a/h	0	Yok

Her bir maddenin test edilen konsantrasyonları için üç hafta süresince, haftada 15'er olmak üzere toplam 45 yumurta kullanılmıştır.



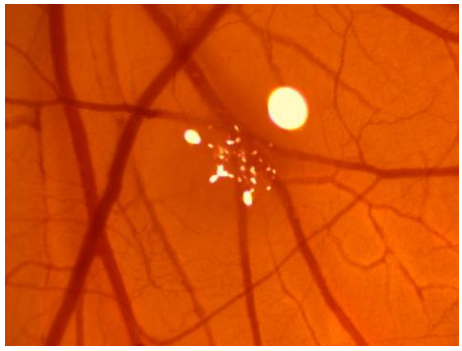
Şekil 4.2. *Normal embriyo gelişimi -Agar (%2,5)*



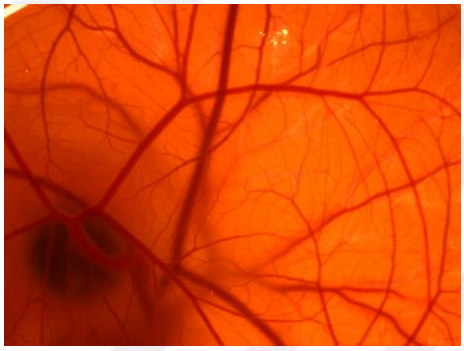
Şekil 4.3. *CAM üzerinde kuvvetli anti-anjiyojenik etki-(±)-Talidomit (50 µg/pellet)*



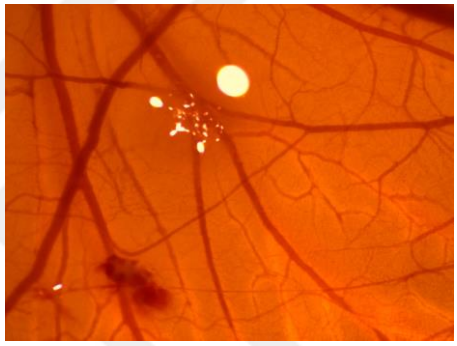
Şekil 4.4. *CAM üzerinde kuvvetli anti-anjiyojenik etki-Kortizon (50 µg/pellet)*



Şekil 4.5. *CAM üzerinde zayıf anti-anjiyojenik etki-L. latifolia (250 µg/pellet)*



Şekil 4.6. *İritasyon yok (Agar % 2,5)*

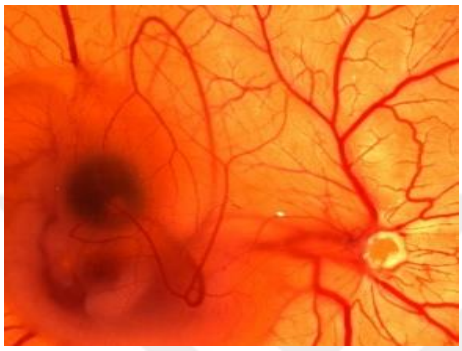


Şekil 4.7. *Hemoraj tipi iritasyon (L. latifolia 250 µg/pellet)*

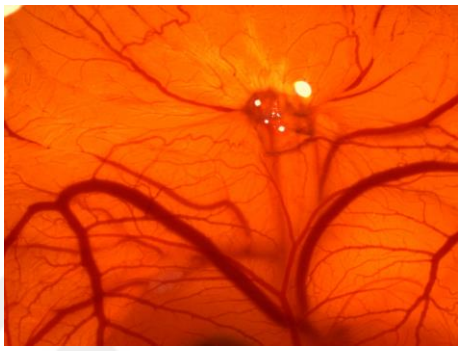
HET-CAM deneyinde, 5 mg/mL SDS konsantrasyonuna sahip agar (%2,5) içerisine, ayrıca uçucu yağın veya standart maddelerin eklenmesi ile, meydana getirilmiş olan enflamasyonun inhibe edilme derecesi incelenmiştir. Sonuçlar SDS'nin enflamasyon etkisinin azalması dikkate alınarak Tablo 4.3'te verilmiştir. SDS'nin yalnızca kendisinin meydana getirdiği, iritasyon içeren CAM görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir. *L. latifolia* uçucu yağının hem 250 μg/pellet hem de 500 μg/pellet konsantrasyonda zayıf antienflamatuvar etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Daidzein kuvvetli antienflamatuvar etki göstermiştir (Şekil 4.10). Bunun yanında kortizonun da kuvvetli antienflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.11).

Tablo 4.3. *L. latifolia uçucu yağının antienflamatuvar etki sonuçları*

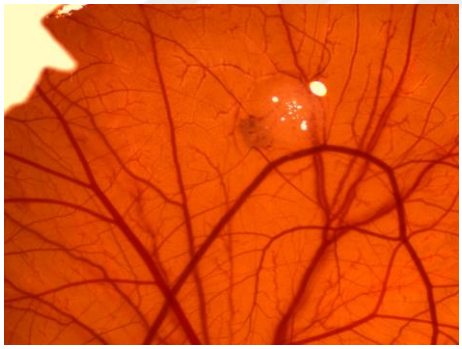
Test maddeleri	**Konsantrasyon (µg/pellet)**	**Antienflamatuvar etki**
L. latifolia uçucu yağı	500	Zayıf
L. latifolia uçucu yağı	250	Zayıf
Kortizon (pozitif kontrol)	50	Kuvvetli
Daidzein (pozitif kontrol)	50	Kuvvetli
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (negatif kontrol)	50	Enflamasyon oluşumu
Agar (negatif kontrol)	% 2,5, a/h	Etkisiz



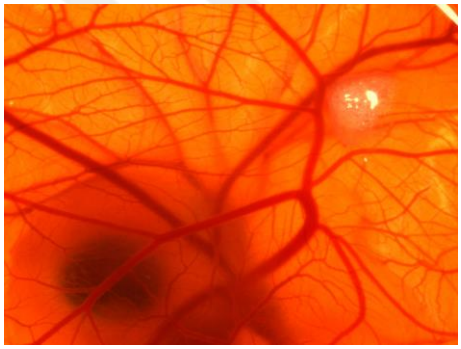
Şekil 4.8. *SDS ile enflamasyon oluşumu (50 µg/pellet)*



Şekil 4.9. *Zayıf antienflamatuvar etki (L. latifolia 250 µg/pellet)*



Şekil 4.10. *Kuvvetli antienflamatuvar etki (Daidzein: 50 µg/pellet)*



Şekil 4.11. *Kuvvetli antienflamatuvar etki (Kortizon 50 µg/pellet)*

4.3. MMP Enzim İnhibisyon Deneyi Sonuçları

L. latifolia uçucu yağı ile yapılan MMP-2 ve -9 enzim inhibitörü çalışmasında NNGH pozitif kontrol maddesi olarak kullanılmıştır. UV absorbans değerleri spektrofotometre cihazı (Bio-Tek, Powerwave XS, GEN-5 program) yardımı ile 412 nm'de oda sıcaklığında okunmuştur. Deney üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. *L. latifolia uçucu yağının MMP-2 ve -9 enzim inhibisyonu sonuçları*

Konsantrasyon (0,4 mg/mL)	**MMP-2**	**MMP-9**
L. latifolia uçucu yağı	-	-
NNGH (Pozitif kontrol)	100	85,35 ± 4,17

NNGH: N-İzobütil-N-(4-metoksifenilsülfonil)glisil hidroksamik asit
- : İnhibisyon yok

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Uçucu yağların içerikleri aynı türde bitkilere ait olsalar dahi ciddi farklılıklar gösterebilir. Bunun sebepleri ise bitkinin kullanılan kısmının hangi mevsimde toplandığına ve ne şekilde elde edildiğine, distilasyon prosesine, yetiştiği bölgenin iklimine, toplandığı lokasyona ve bölgenin coğrafik yapısına bağlı olarak meydana gelebilecek değişkenlere dayandırılabilir. Tıbbi amaçlı kullanılacak olan uçucu yağların belli standartlar çerçevesinde olması gerekir. Bu nedenle materyal olarak kullanılan *L. latifolia* uçucu yağının GK ve GK/KS analizleri yapılarak Avrupa Farmakopesi'ne uygun olduğu belirlenmiştir.

CAM aktivite çalışmasında pozitif standart maddesi olarak (±)-talidomit, kortizon, negatif kontrol olarak SDS ve agar kullanılmıştır. HET-CAM deneyinde ise pozitif kontrol maddeleri olarak (±)-talidomit, kortizon, daidzein, negatif kontrol olarak SDS ve agar kullanılmıştır. Kontrol maddeleri 50 μg/pellet, uçucu yağ ise 500 μg/pellet ve 250 μg/pellet olmak üzere iki farklı konsantrasyonda çalışılmıştır.

CAM ve HET-CAM deneyleri ile MMP-2 ve -9 enzim inhibisyon çalışmaları *L. latifolia* uçucu yağı ile ilk kez yapılmıştır. Sonuç olarak, uçucu yağın hem 250 μg/pellet hem de 500 μg/pellet konsantrasyonunda CAM yapısı üzerinde hemoraj tipinde bir iritasyon etki meydana getirdiği ve zayıf antianjiyojenik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrol maddesi olarak kullanılan kortizon kuvvetli ve (±)-talidomit ise zayıf antianjiyojenik etkiye sahip bulunmuştur. Standart antienflamatuvar maddelerden kortizon ve daidzeinin HET-CAM denemesinde kuvvetli ve çok kuvvetli antienflamatuvar etkili bulunurken 250-500 μg/pellet konsantrasyonlarında uçucu yağın zayıf etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada (Demirci vd., 2015, s. 1); Avrupa Farmakopesi kalitesindeki *L. angustifolia* uçucu yağının 0,4 mg/mL konsantrasyonda MMP-2 inhibitör etkisi 13,21 ± 2,67, MMP-9 inhibitör etkisi ise 66,25 ± 5,30 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu önemli bulgulardan yola çıkarak farmakopede kayıtlı diğer lavanta türü olan, *L. latifolia* uçucu yağı ile yaptığımız araştırma neticesinde 0,4 mg/mL konsantrasyonda MMP-2 ve -9 enzim inhibisyon çalışmasında herhangi bir inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Kontrol maddesi olarak kullanılan NNGH ise MMP-2 enzimi için % 100, MMP-9 enzimi için ise 85,35 ± 4,17 olarak hesaplanmıştır. Proje çalışmamız neticesinde farmakopeye kayıtlı lavanta

türlerinin, birbirleri ile ilişkili olan mekanizmalara sahip MMP enzim inhibisyon etkileri ve CAM çalışmaları yapılarak literatürdeki eksiklikler tamamlanmıştır.

KAYNAKÇA

Aktaş, S.H. ve Akbulut, H. (2014). Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Türk Onkoloji Dergisi*, 29 (2), 67-79.

Akşit, H. ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 55-63.

Alatrache, A., Jamoussi, B., Tarhouni, R., Abdrabba, M. (2007). Analysis of the essential oil of *Lavandula latifolia* from Tunisia. *J. Essent. Oil. Bear Pl*., 10 (6), 446 – 452.

Alexander, C.M., Howard, E.W., Bissell, M.J., Werb, Z. (1996). Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. *J. Cell Biol.*, 135, 1669–1677.

Alexander, C.M., Selvarajan, S., Mudgett, J., Werb, Z. (2001). Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J. Cell Biol.*, 152, 693–703.

Amelinei, C., Caruntu, I.D., Gıuşca S.E., Balan R.A. (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 51 (2), 215–228.

Anand-Apte, B., Pepper, M.S., Voest, E., Montesano, R., Olsen, B., Murphy, G., Apte, S.S., Zatter, B. (1997). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38 (5), 817-823.

Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int. J. Cancer*, 72, 1-22.

Apakkan, A.S., Bayındır, O. ve Özmen, D. (2001). Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 21, 332–342.

Arkell, J. and Jackson, J.C. (2003). Constitutive secretion of MMP9 by early-passage cultured human endothelial cells. *Cell Biochem. Funct.*, 21, 381-386.

Ausprunk, D.H. and Folkman, J. (1977). Migration and proiferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.*, 14, 53–65.

Başer, K.H.C. (1993). Essential oils of Anatolian Labiateae: A Profile. *Acta Hortic.*, 333, 217-237.

Baytop, T. (1999). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi: Geçmişte ve bugün*. İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevi.

Benelli, R., Adatia, R., Ensoli, B., Stevenson, W.G.S., Santi, L., Albini, A. (1994). Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell induced endothelial cell invasion by TIMP-2 and a synthetic peptide from the metalloproteinase propeptide: Implications for an anti-angiogenic therapy. *Oncol. Res.*, 6, 251–257.

Blasi, F. (1997). uPA, uPAR, PAI- 1: Key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol. Today*, 18, 415- 417.

Bond, M., Fabunmi, R.P., Baker, A.H., Newby, A.C. (1998). Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: An absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.*, 435, 29–34.

Bourboulia, D. and Stetler-Stevenson, W.G. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.*, 20 (3), 161–168.

Cavanagh, H.M.A. and Wilkinson, J.M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytother. Res.*, 16, 301–308.

Cazedey, E.C.L., Carvalho, F.C., Fiorentino, F.A.M., Gremião, M.P.D., Salgado, H.R.N. (2009). Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 45 (4), 759-766.

Chu, C.J. and Kemper, K.J. (2001). Lavender (*Lavandula* spp.). *LHTF*, 1-32.

Chulia, F.Z., Filho, J.L.R., Gursoy, M., Könönen, E., Uitto, V.J., Gursoy, O.V., Cakmakci, L., Moreira, J.C.F., Gursoy, U.K. (2012). Bioinformatical and *in vitro* approaches to essential oil-induced matrix metalloproteinase inhibition. *Pharm. Biol.*, 50 (6), 675–686.

Chulia, F.Z., Oliveira, B.N., Gursoy, M., Könönen, E., Moreira, J.C.F., Gursoy, U.K., Uitto, V.J. (2013). MMP-REDOX/NO interplay in periodontitis and its inhibition with *Satureja hortensis* L. essential oil. *Chem. Biodivers.*, 10, 507-523.

Cooke, B. and Ernst, E. (2000). Aromatherapy: A systematic review. *Brit. J. Gen. Pract.*, 50 (455), 493-496.

Cornelius, L.A., Nehring, L.C. and Harding, E. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunol.*, 161, 6845–6852.

Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.

Danh, L.T., Triet, N.D.A., Han, L.T.N., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N. (2012). Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO_2. *J. Supercrit. Fluids*, 70, 27–34.

D'arcy, P.D. and Howard, E.M. (1967). A new anti-inflammatory test, utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Br. J. Pharmacol.*, 29, 378-387.

Davis, P.H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 7, 1-947, University Press, Edinburgh.

Demirci, B., Demirci, F., Dönmez, A.A., Franz, G., Paper, D.H., Başer, K.H.C. (2005). Effects of Salvia essential oils on the chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Pharm. Biol.*, 43 (8), 666–671.

Demirci, F., Paper, D.H., Franz, G. and Baser, K.H.C. (2004). Investigation of the *Origanum onites* L. essential oil using the chorioallantoic membrane (CAM) assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 251-254.

Demirci, F., Paper, D. H. ve Franz, G. (2006). Nerolidol'ün koryon allantoik membran (CAM) üzerine etkileri. *15. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT)*, Erzurum: Atatürk Üniversitesi.

Demirci, F., Temel, H.E., Akalin, G., Sener, G., Goger, G., Iscan, G., Baser, K.H.C. (2015). Inhibitory effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil on Selected Metalloproteinases, *8th Brazilian Symposium on Essential Oils (SBOE)*'de sunulan poster. Brezilya: Universidade Federal Do Rio De Janeiro.

Demirci, U. (2006). Karaciğer hastalıklarında vasküler endotel büyüme faktörü düzeyleri. Uzmanlık tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul Üniversitesi.

Dong, Z., Kumar, R. and Yang, X. (1997). Macrophagederived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 88, 801-810.

ESO 2000. (1999). The complete database of essential oils. *Boelens Aroma Chemical Information Service*, The Netherlands.

Fata, J.E., Leco, K.J. and Voura, E.B. (2001). Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J. Clin. Invest.*, 108, 831–841.

Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *J. Nat. Med.*, 9, 669- 676.

Ferrara, N. and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438, 967-974.

Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6.

Friedl, P. and Wolf, K. (2008). Tube travel: The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res.*, 68, 7247–7249.

Gohji, K., Fujimoto, N., Komiyama, T., Fujii, A., Ohkawa, J., Kamidono, S., Nakajima, M. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer*, 1996, 78 (11), 2379-2387.

Goodsell, D.S. (2002). The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*, 21, 118-119.

Goze, I., Cetin, A. and Goze, A. (2010). Investigation of effects of essential oils of *Origanum minutiflorum* O Schwarz PH Davis and *Cyclotrichium niveum* (Labiatae) plants on angiogenesis in shell-less chick embryo culture. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (14), 2156-2160.

Gross, J. and Lapiere, C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Physiology: Gross and Lapiere*, 48, 1014-1022.

Guenther, E. (1954). The French lavender and lavandin industry. *Econ. Bot.*, 8 (2), 166-173.

Heljasvaara, R., Nyberg, P. and Luostarinen, J. (2005). Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp. Cell Res.*, 307, 292–304.

Herraiz-Peñalver, D., Ángeles Cases, M., Varela, F., Navarrete, P., Sánchez-Vioque, R., Usano-Alemany, J. (2013). Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. *Biochem. Syst. Ecol.*, 46, 59–68.

Hewitt, R. and Dan, K. (1996). Stromal cell expression of components of matrix degrading protease systems in human cancer. *Enzyme Protein*, 49, 163–73.

Hidalgo, M. and Eckhardt, S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93 (3), 178–184.

Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R., Weiss, S.J. (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 95, 365–377.

[1]https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biologytextbook/vertebrates-29/reptiles-174/characteristics-of-amniotes-670-11892/ (Erişim tarihi: 02.08.2016).

[2]http://www.slideshare.net/ahmadusama88/matrix-metalloproteinase-2-attenuates-brain-tumour-growth (Erişim tarihi: 02.08.2016).

Hu, J., Van Den Steen, P.E., Sang, Q.X.A., Opdenakker, G. (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature*, 6, 1-6.

Jennings, W. G. and Shibamoto, T. (1980). Quantitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary GC. *Academic Press*, New York.

Kahraman, A., Celep, F. and Doğan, M. (2009). Morphology, anatomy and palynology of *Salvia indica* L. (Labiatae). *World Appl. Sci. J.*, 6 (2), 289-296.

Kara, N. and Baydar, H. (2013). Determination of Lavender and Lavandin cultivars (*Lavandula* sp.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *Turk. J. Field Crops*, 18(1), 58-65.

Kargıoğlu, M., Cenkci, S., Serteser, A., Evliyaoğlu, N., Konuk, M., Kök, M.Ş., Bağcı, Y. (2008). An Ethnobotanical Survey of Inner-West Anatolia, Turkey. *Hum. Ecol.*, 36, 763-777.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *NIH Public Access*, 141 (1), 52–67.

Kishore, A.S., Surekha, P.A., Sekhar, P.V., Srinivas, A., Murthy, P.B. (2008). Hen egg chorioallantoic membrane bioassay: An *in vitro* alternative to draize eye irritation test for pesticide screening. *Int. J. Toxicol.*, 27 (6), 449-453.

Koenig, W.A., Joulain, D. and Hochmuth, D.H. (2004). Terpenoids and related constituents of essential oils, MassFinder 3, D.H. Hochmuth (ed.), Hamburg, Germany.

Konukoğlu, D. ve Turhan, S.M. (2005). Anjiyogenezin temel mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36, 42-48.

Kumar, A., D'Souza, S.S., Tickoo, S., Salimath, B.P., Singh, H.B. (2009). Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth *in vivo*. *Integr. Cancer. Ther.*, 8 (1), 75-87.

Lamoreaux, W.J., Fitzgerald, M.E. and Reiner, A. (1998). Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*. *Microvasc. Res.*, 55, 29-42.

Liekens, S., Clercq De, E. and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 253-270.

Liotta, L.A., Steeg, P.A. and Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 64, 327-336.

Littlepage, L.E., Sternlicht, M.D. and Rougier, N. (2010). Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res.*, 70, 2224–2234.

Lochter, A., Galosy, S. and Muschler, J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 139, 1861– 1872.

Lu, X., Wang, Q. and Hu, G. (2009). ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes and Dev.*, 23, 1882–1894.

Luepke, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potantial. *Food Chem. Toxicol.*, 23, 287-291.

Marchesan, M., Paper, D.H., Hose, S., Franz, G. (1998). Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L.. *Phytother. Res.*, 12, 33–34.

Matrisian, L.M. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, 6 (4), 121–125.

McDonald, D.M. (2008). *Angiogenesis and vascular remodeling in inflammation and cancer: Biology and architecture of the vasculature, in: Angiogenesis: An integrative approach from science to medicine*. W. D. Figg, J. Folkman (Eds.), Springer, USA, 17-34.

McLafferty, F.W. and Stauffer, D.B. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*. John Wiley and Sons, New York.

Mill, R.R. (1982). *Lavandula Medik., Flora of Turkey and the East Aegean Island*. P. H. Davis (Ed.), 7, 1-947, University Press, Edinburgh.

Moses, M.A. (1997). The regulation of neovascularization by matrix Metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*, 15, 180-189.

Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I. and Segura, J. (2007). Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochem. Syst. Ecol.*, 35, 479-488.

Murphy, A.N., Unsworth, E. and Stevenson W.G.S. (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) inhibits b-FGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.*, 157, 351-358.

Noe, V., Fingleton, B. and Jacobs, K. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J. Cell Sci.*, 114, 111–118.

O'Reilly, M.S., Wiederschain, D. and Stetler-Stevenson, W.G. (1999). Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J. Biol. Chem.*, 274, 29568-29571.

Öztürk, Ö.G. (2013). Matriks Metalloproteinaz Enzim Ailesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22 (2), 209-220.

Paper, D. (1998). Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med.*, 64, 686-695.

Pinedo, H.M. and Slamon, D.J. (2000). Translational research: The role of VEGF in tumorangiogenesis. *Oncologist*, 5, 1-2.

Rajkumar, S.V. (2002). Review of angiogenesis and anti-angiogenic therapy in hematologic malignancies. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 11, 33-47.

Reel, B. (2006). Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 26, 527–537.

Ribatti, D. (2008). Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis*, 11, 3-10.

Ribatti, D. (2009). History of research on tumor angiogenesis. *Springer,* Italy, 1-17.

Roy, R., Yang, J. and Moses, M.A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.,* 27 (31), 5287-5297.

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Adolfo Sánchez, A. Luque, P. (2004). Chemical composition and seasonal variations of spike lavender oil from Southern Spain. *J. Essent. Oil Res.*, 16, 206-210.

Sethi, C.S., Bailey, T.A., Luthert, P.J., Chong, N.H.V. (2000). Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br. J. Ophthalmol.*, 8, 654–664.

Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.*, 75, 95–115.

Stevenson, W.G.S. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.*, 103 (9), 1237-1241.

Soydinç, H.O., Çamlıca, H. ve Duranyılmaz, D. (2006). Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 21 (2), 53–56.

Tobelem, G. (2007). VEGF: A key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Target. Oncol.*, 2(3), 153-164.

Tuzlacı, E. ve Erol, M.K. (1999). Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir, (Isparta). *Fitoterapia*, 70, 593-610.

Unemori, E.N., Ferrara, N. and Bauer, E.A. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physio.*, 153, 557-562.

Wang, L., Li, X., Zhang, S., Lu, W., Liao, S., Liu, X., Shan, L., Shen, X., Jiang, H., Zhang, W., Huang, J., Li, H. (2012). Natural products as a gold mine for selective matrix metalloproteinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 4164–4171.

Wilcock, D.M., Morgan, D., Gordon, M.N., Taylor, T.L., Ridnour, L.A., Wink, D.A., Colton, C.A. (2011). Activation of matrix metalloproteinases following anti-A*β* immunotherapy; implications for microhemorrhage occurrence. *J. Neuroinflammation*, 8 (115), 1-13.

Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S. (2011). Biosynthesis and therapeutic properties of lavandula essential oil constituents. *Planta Med.*, 77, 7–15.

Woessner, J.F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*, 5, 2145–2154.

Wu, E., Mari, B.P. and Wang, F. (2001). Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. *J. Cell Biochem.*, 82, 549–555.

Yoon, S.O., Park, S.J., Yun, C.H., Chung, A.S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36 (1), 128-137.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Görkem Şener

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : İzmit/1990

E-Posta : g_sener@anadolu.edu.tr

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2012, Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2008, İzmit Atılım Anadolu Lisesi
- 2004, Yahyakaptan İlköğretim Okulu

Yayınları ve Bilimsel Faaliyetleri:

Katılınan kurs ve eğitim programları:

- Eppendorf biyoproses semineri, İncekaralar/Eppendorf, 2016.
- Stereo, inverted ve ışık mikroskobu eğitimi, Carl Zeiss, 2015.
- Biomek 4000 otomatik pipetleme sistemi cihazı kullanım sertifikası, Aka Biyoteknoloji, 2014.

Poster bildiriler:

- Demirci, F., Şener, G., Temel, H.E., Demirci, B. (2016). *Lavandula latifolia* Medik. uçucu yağının anjiyogenez ve bazı matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri üzerine etkileri. *XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*. Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Küçük, S. ve Şener, G. (2016). Safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin botanik özelliklerinin incelenmesi ve genel kullanım alanlarının araştırılması. *XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*. Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Demirci, F., Temel, H.E., Akalın, G., Şener, G., Göger, G., İşcan, G., Başer, K.H.C. (2015). Inhibitory effects of *Lavandula angustifolia* essential oil on selected metalloproteinases. *8th Brazilian Symposium on Essential Oils (SBOE)*. Brezilya: Federal Do Rio De Janeiro Üniversitesi.
- Demirci, F., Şener, G., Bueno, J., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2015). Antimicrobial and antibiofilm activity of *Coreopsis tinctoria* Nutt. essential oil

against upper respiratory human pathogenic microorganisms. *11. International Symposium on Pharmaceutical Sciences*. Ankara Üniversitesi.

- Alan, S., Kürkçüoğlu, M., and Şener, G. (2015). Composition of the essential oils of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* growing in Eskişehir. *11. International Symposium on Pharmaceutical Sciences*. Ankara Üniversitesi.
- Kıyan, H.T., Dündar, E., Şener, G., Demirci, B., Demirci, F. (2014). Chemical characterization and biological evaluation of the Myrtle Oil from Turkey. *45th International Symposium on Essential Oils*. İstanbul Üniversitesi.
- Duymuş, H.G., Şener, G., Dündar, E., Demirci, F., Büyükkılıç, B., Altıntaş, A., Demirci, B. (2014). Biological evaluation of grape seeds from wine processing industry wastes and chemical characterization. *3. International Molecular Biology and Biotechnology Congress*. Bosna Hersek: IUS Üniversitesi.