

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROL'ÜN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma TURNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

**RESVERATROL'ÜN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma TURNA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez, 2011.02.0121.024 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2012

**RESVERATROL'ÜN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma TURNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROL'ÜN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma TURNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

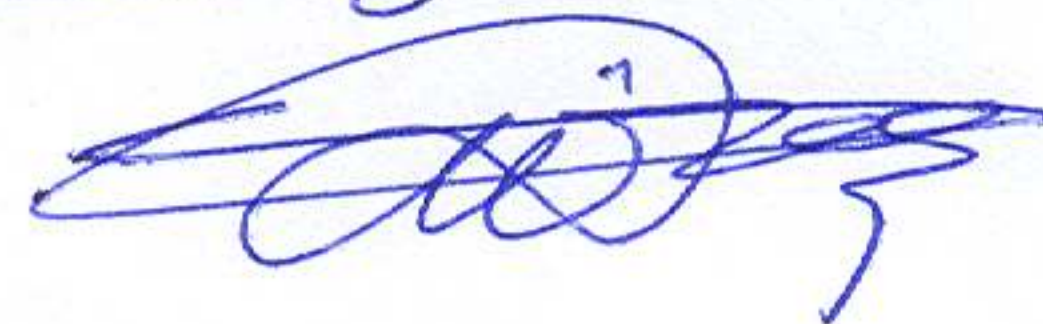
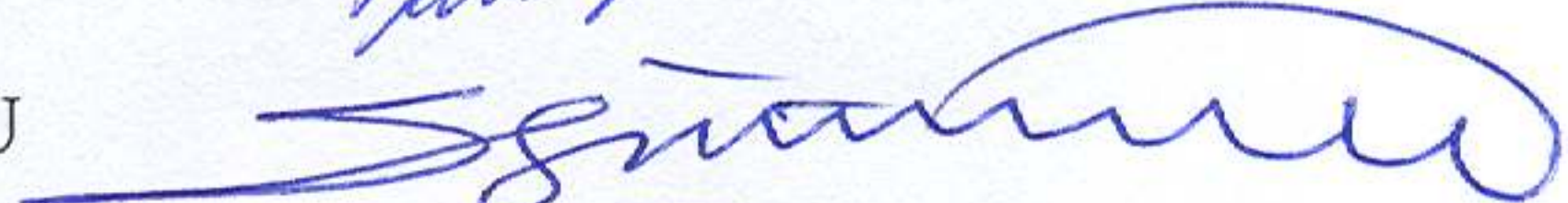
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez, 09/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından100 (yüz)..... not
takdir edilerek oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ



ÖZET

RESVERATROL'ÜN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma TURNA

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA

Haziran 2012, 63 Sayfa

Bu çalışmada, *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılarak farklı mekanizmalar ile hasara neden olan üç mutajene karşı (EMS, 4-NQO ve $K_2Cr_2O_7$) Resveratrol'ün antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. SMART genetik değişimleri geniş bir spektrumda hızlı ve ucuz şekilde belirlemeye yarayan güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada larvalar ön ve eş zamanlı uygulamalara maruz bırakıldılar. Ön uygulama çalışmasında; ikinci evre transheterozigot larvalar Resveratrol (1, 5 ve 10 mM) dozları ile beslendikten 24 saat sonra mutajen kimyasallara maruz bırakılmıştır. Eş zamanlı uygulamalar için ise, üçüncü evre transheterozigot larvalar eş zamanlı olarak hem Resveratrol hem de mutajenlere maruz bırakılmıştır. Bu mutajenlerin genotoksik etkileri, larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerin (nokta mutasyon, parça kopması, ayrılmama ve rekombinasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirildi. Değerlendirme, Graf vd tarafından belirtilen sınıflandırma (küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klonlar) esas alınarak yapıldı.

Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozları *Drosophila*'da eş zamanlı denemelerde $K_2Cr_2O_7$ 'a karşı güçlü bir antigenotoksik aktivite oluşturmuştur. Yine eş zamanlı denemelerde Resveratrol'ün 5 ve 10 mM dozları EMS'ye karşı antigenotoksik etki gösterirken, Resveratrol'ün 1 mM dozu genotoksik aktiviteyi çok az miktarda arttırmıştır. Diğer taraftan Resveratrol'ün 1 ve 5 mM dozları 4-NQO'ın oluşturduğu toplam klon sayılarını azaltırken, 10 mM dozu ise toplam klon sayılarını arttırmıştır.

Ön uygulamalı denemelerde Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozlarının $K_2Cr_2O_7$ 'a ve EMS'ye karşı güçlü antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Resveratrol'ün 1 ve 10 mM dozlarının 4-NQO'ın indüklediği genotoksik hasarı arttırdığı, 5 mM dozunun ise bu hasarı azalttığı gözlenmiştir.

Bu çalışma, Resveratrol'ün ön uygulamalı denemelerinde EMS ve $K_2Cr_2O_7$ 'ın neden olduğu genotoksik hasara karşı Resveratrol'ün koruyucu potansiyelinin eş zamanlı uygulamalara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak Resveratrol, *D. melanogaster*' de EMS ve $K_2Cr_2O_7$ karşı antigenotoksik etki göstermiş ancak 4 NQO'nun genotoksitesine karşı çelişkili sonuçlar görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila melanogaster*, Resveratrol, Antigenotoksikite, Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIGENOTOXIC EFFECTS OF RESVERATROL IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Fatma TURNA

M.Sc. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

June 2012, 63 Pages

In this study, the antigenotoxic effects of Resveratrol was tested using the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* against three mutagens (EMS, 4-NQO and $K_2Cr_2O_7$) which causes genotoxicity with different mechanisms. SMART is a reliable assay to detect a broad range of genetic alterations in a rapid and inexpensive way. In this study, the larvae were treated both pre and simultaneous exposure. For the pre-treatment study; second instar trans-heterozygous larvae were exposed to Resveratrol doses (1, 5 and 10 mM), after 24 hours later they were exposed three different mutagenic chemical (EMS, 4-NQO and $K_2Cr_2O_7$). For simultaneous treatments 3-day old larvae were exposed Resveratrol concentrations and mutagenic chemicals simultaneously. The effects of these mutagens were evaluated according to genetic changes (point mutation, deletion, non-disjunction, and recombination) in wing imaginal disc cells that lead to the formation of mutant trichomes. Evaluation was done according to the classification (small single spot, large single spot, twin spot, total *mwh* and total spot) developed by Graf et al.

Simultaneously given 1, 5 and 10 mM doses of Resveratrol produced a strong antigenotoxic activity against $K_2Cr_2O_7$. Similarly simultaneous treatments 5 and 10 mM doses of Resveratrol showed antigenotoxicity against EMS, while 1 mM dose induced small amount of genotoxic actions in a very small amount. On the one hand, 1 and 5 mM doses of Resveratrol reduced the total spot numbers produced by 4-NQO, 10 mM dose of Resveratrol increased the total spot numbers.

In pre-treatments, while 1, 5 and 10 mM doses of Resveratrol produced a strong antigenotoxic activity against $K_2Cr_2O_7$ and EMS. 1 and 10 mM doses of Resveratrol increased the damage induced by 4-NQO however 5 mM dose of Resveratrol reduced that damage.

Our results indicate that protective effect of Resveratrol against genotoxic damage caused by EMS and $K_2Cr_2O_7$ is higher in pre-treatment compared to simultaneously treated larvae.

Consequently, Resveratrol exerts antigenotoxic activity against to EMS and $K_2Cr_2O_7$ in *D. melanogaster* however it produces conflicting results against 4-NQO genotoxicity.

KEY WORDS: *Drosophila melanogaster*, Resveratrol, Antigenotoxicity, Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent KAYA (Supervisor)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ

ÖNSÖZ

Günlük yaşamımızın bir parçası olan pek çok aktivite, direk veya dolaylı yollar ile hasara maruz kalmamıza neden olur. Organizmanın bu hasarlara karşı pek çok savunma mekanizması olmasına rağmen, bu savunma sistemlerini destekleyecek ve etkilerini arttıracak bazı maddelerin dışarıdan alınması gerekmektedir. Özellikle bazı hastalıkların moleküler temellerini oluşturan hasarların, dışarıdan alınan bazı maddeler ile ortadan kaldırılması organizmanın sağlıklı yaşayabilmesi için gereklidir. Beslenme yolu ile alınan koruyucu maddelere fitokimyasallar dediğimiz sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunan bitkisel kökenli maddeleri ve vitaminleri örnek verebiliriz. Beslenme yolu ile hastalıklardan korunma son yıllarda dikkat çekilen bir olgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda fitokimyasal bir bileşik olan ve üzüm, yer fıstığı gibi besinlerde bulunan Resveratrol, son yıllarda koruyucu etkisine dair pek çalışmanın yapıldığı polifenolik bir bileşiktir.

Bu tez çalışmasının amacı gıdalar ile alınan Resveratrol'ün farklı mekanizmalar ile genotoksik hasara neden olan kimyasalların genotoksitesine karşı koruyucu etkisinin araştırılması ve eğer koruyucu etki varsa bu koruyucu etkinin potansiyel mekanizmasına dair bulguların elde edilmesidir. Bu bağlamda, elde edilecek sonuçların insan sağlığının korunması ve beslenme alışkanlıklarının yeniden düzenlenmesiyle genetik hasarın önlenmesine dair yeni veriler sunacağı düşünüldüğünden bu tez çalışması kapsamında Resveratrol'ün antigenotoksik etkilerini belirlemek için *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Resveratrol'ün farklı mekanizmalar ile hasara neden olan iki kimyasalın (EMS ve $K_2Cr_2O_7$) sebep olduğu genotoksitesiteye karşı açık bir şekilde antigenotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulguların gıdalar ile hastalıklardan ve hastalıkların moleküler temelini oluşturan bazı hasarlara karşı genetik materyalin korunmasına yardımcı olacağı ve bilim dünyasına katkı getireceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmanın gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutmasını dilerim.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesi sırasında her konuda en içten ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm ve bu tezin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren Akademik Danışman Hocam Prof. Dr. Bülent KAYA'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), tez çalışmalarım esnasında içten yardımlarını esirgemeyen ve bana yardımcı olan Dr. Eşref DEMİR'e, genetik laboratuvarlarını kullanma imkânını sunan Biyoloji Bölümü'ne, çalışmam sırasında emeği geçen Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje no: 2011.02.0121.024), ayrıca bursiyer olarak desteğini gördüğüm TÜBİTAK 2228 - Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Burs Programına ve tez çalışmamın başından beri en zor anlarımda her zaman yanımda bulunan kıymetli aileme ve sevgili dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	7
2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü	7
2.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı.....	11
2.3. <i>Drosophila</i> Hatlarının Kültürü.....	14
2.4. Deney Grupları.....	16
2.5. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi	18
2.6. Resveratrol Dozlarının 48 ± 4 ve 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları.....	19
2.7. Etil Metan Sülfonat, 4-Nitrokinolin Oksit, Potasyum Dikromat ve Resveratrol Dozlarının Ön Uygulamaları ve Eş Zamanlı Uygulamaları.....	19
2.8. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması	21
2.9. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi	23
2.10. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması	28
2.11. Verilerin Değerlendirilmesi	28
3. BULGULAR.....	30
3.1. Kontrol Grupları.....	30
3.1.1. 48 ± 4 saatlik Resveratrol dozları, distile su ve etil metan sülfonat (EMS) uygulamaları.....	30
3.1.2. 72 ± 4 saatlik Resveratrol dozları, distile su, % 5 etanol, etil metan Sülfonat (EMS), 4- nitrokinolin oksit (4-NQO) ve potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) uygulamaları.....	33

3.2. Etil Metan Sülfonat (EMS), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ve 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Resveratrol 72 ± 4 Saatlik Eş Zamanlı Uygulamaları.....	36
3.3. Resveratrolün 48 ± 4 Saatte Ön Uygulaması ve 72 ± 4 Saatte Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) Uygulamaları.....	39
4. TARTIŞMA.....	42
5. SONUÇ.....	51
6. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Bd^S	Beaded Serrate
flr	Flare
mwh	Multiple wing hair
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar

EMS	Etil Metan Sülfonat
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
4-NQO	4-Nitrokinolin Oksit
$K_2Cr_2O_7$	Potasyum Dikromat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Res	Resverartrol
AFB1	Aflatoksin B1
MNU	Metil Nitrosourea
MNNG	<i>N</i> - metil- <i>N'</i> - nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
CYP1A1	Sitokrom P-450 1A1
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
BER	DNA hasarı baz kesip-çıkarma tamir yolağı
ADH1B	Alkol Dehidrogenaz 1B
ALDH2	Asetaldehit Dehidrogenaz 2
Bkz	Bakınız

DMBA	7, 12-Dimetilbenz(a)antrasen
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi.....	8
Şekil 2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü.....	10
Şekil 2.3. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki konumları.....	11
Şekil 2.4. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne <i>flr</i> ³ ne de <i>mwh</i> olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) <i>mwh</i> trikomlar d) <i>flr</i> ³ genotipe ait trikomlar.....	12
Şekil 2.5. <i>Flr</i> ³ / <i>TM3</i> , <i>Bd</i> ^S bireylerindeki homozigot letal etkiler.....	13
Şekil 2.6. Dengeleyici kromozom taşımayan normal (A) ve dengeleyici kromozom taşıyan <i>Bd</i> ^S bireylerinin (B) kanat fenotipleri.....	13
Şekil 2.7. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri.....	14
Şekil 2.8. Dengelenmiş heterozigot <i>mwh/Bd</i> ^S ve transheterozigot <i>mwh/flr</i> ³ bireylerin elde edilebilmesi için <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr</i> ³ / <i>TM3</i> , <i>Bd</i> ^S bireyleri arasındaki çaprazlamalar.....	19
Şekil 2.9. Kanat preparatlarının hazırlanması.....	22
Şekil 2.10. Kanat sektörlerinin şematik görünümü.....	23
Şekil 2.11. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü.....	24
Şekil 2.12. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü.....	24
Şekil 2.13. İkiz mutant klonların görünümü.....	25
Şekil 2.14. Büyük tek tip <i>flr</i> ³ mutant klonların görünümü.....	25
Şekil 2.15. <i>mwh/flr</i> ³ genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomaliler.....	27
Şekil 3.1. Resveratrol dozlarının (1, 5, ve 10 mM) 48 ± 4 saatlik uygulamalarına ait klon frekans dağılımı.....	32
Şekil. 3.2. 72 ± 4 saatlik <i>D. melanogaster</i> larvalarına distile su, etanol (%5), Resveratrol dozları (1, 5 ve 10 mM), EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve K ₂ Cr ₂ O ₇ (1 mM) uygulamalarına ait klon frekans dağılımı.....	35

Şekil 3.3. 72 ± 4 saatlik <i>D. melanogaster</i> larvalarına eş zamanlı EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM), $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) ve Resveratrol dozlarının (1, 5 ve 10 mM) uygulamalarına ait klon frekans dağılımları.....	38
Şekil 3.4. 48 ± 4 saatlik <i>D. melanogaster</i> larvalarına Resveratrol dozlarının (1, 5 ve 10 mM) ön uygulaması ve 72 ± 4 saatlik EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) uygulamalarına ait klon frekans dağılımları.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	17
Çizelge 2.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	29
Çizelge 3.1. Resveratrol Dozlarının 48 ± 4 saatlik Uygulamaları.....	31
Çizelge 3.2. Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin oksit (4-NQO), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ve Resveratrol (Res) Dozlarının 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları	34
Çizelge 3.3. Resveratrol (Res) ve Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4- NQO), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$)' in 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları.....	37
Çizelge 3.4. Resveratrol (Res) Dozlarının 48 ± 4 Saatlik Ön Uygulaması ve 72 ± 4 Saatlik (EMS), (4- NQO) ve ($K_2Cr_2O_7$) Uygulamaları.....	40

1. GİRİŞ

Organizma yaşadığı çevrede yaşamını olumsuz etkileyen birçok zararlı bileşiğe maruz kalmaktadır. Maruz kalınan zararlı bileşikler, hücre zarı, hücrenel organeller ve en önemlisi de genetik materyalde bazı mutasyonlara sebep olabilmektedir. Genetik materyalde farklı etkilerle ortaya çıkan mutasyonlar hasarın durumuna göre kanserin başlamasını da tetikleyebilmektedir. Toksinlerin zararlı etkilerinin belli bir dereceye kadar organizma tarafından bertaraf edilebilmesi çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla mümkündür. Organizmanın kendi koruma mekanizmalarının yanı sıra doğal kaynaklardan elde edilen bazı koruyucu moleküller de bu koruma sistemine yardımcı olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, yeşil sebze ve taze meyve tüketiminin insanları kansere karşı koruduğunu göstermektedir (Gürbüz 2006).

Organizma sadece dış etkenlerle maruz kaldığı zararlı bileşikler nedeniyle zarar görmez. Aynı zamanda kendi metabolik faaliyetleri sonucunda açığa çıkan bazı zararlı bileşikler de organizma için olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir. Metabolizma yan ürünleri olarak süperoksit anyonları (O_2^- , $O\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi mutajenler meydana gelir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretir. Hücre içi ROS'un % 90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondrinin iç membranında üretilir (Wei ve Pang, 2005). Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşur. Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri deoksiribonükleik asit (DNA), proteinler ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıkları başlatabilmektedir (Kazanç 1997). Oksidatif strese bağlı olarak lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar ve DNA zarar görebilmekte, DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilmekte, enzim ve yapısal proteinlerin zarar görmesi hücrenin ölmesiyle sonlanabileceği gibi bu olgular kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet ve otoimmün bozuklukların gelişiminde moleküler temeli oluşturmaktadır

(Ratnam 2006, Cemeli vd 2009, Pellegrini 2009). Serbest radikaller hücreye değişik şekillerde zarar verebilirler. Genel olarak 3 mekanizma mevcuttur:

1. Membran lipitlerinin peroksidasyonu; Serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hücre ve doku bozulmalarını arttıırırlar.

2. Disülfid bağı oluşumu; Glutasyon, tüm memeli hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu tiyol ve oksijen radikalleri gibi sülfür merkezli radikallerin oluşumuna neden olur (RSH) ve proteinlerdeki homolitik füzyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfid bağı oluşturarak proteinlerin konfigürasyonlarını bozar ve vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.

3. DNA hasarı; DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. Bu yüzden DNA hasarının ROS ile indüklenen hücresel modifikasyonların en ciddi olduğu düşünülmektedir.

Organizmanın gerek endojen gerekse ekzojen kaynaklı mutajenlere karşı kendi koruyucu mekanizmalarının yanı sıra antioksidanların da, hücre koruyucu ve dejeneratif hastalıklardan korunmada önemli olduğu yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki grupta toplanabilir (Gökpınar vd 2006). Antioksidanlar; “İnsanlarda fizyolojik şartlarda oluşan serbest radikallerin birinin ya da bir kaçının olumsuz etkilerini azaltabilen maddelerdir” şeklinde tanımlanabilir. Yani oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge olması hücresel korunma bakımından önemlidir (Cornelli 2009). Organizma maruz kaldığı zararlı bileşiklere karşı kendi savunma sistemlerine sahiptir, organizmada bulunan antioksidanlar da bunlardandır. Organizmanın kendi koruma sistemine yardımcı olan bitkisel kökenli bazı kimyasallar da toksik etkileri farklı yollarla azaltabilmektedir. Beslenme yoluyla alınan fitokimyasallar antioksidan aktiviteleri ve bazı genlerin ekspresyonunu düzenleme yolu ile etki gösterirler. Flavonoidler, izotiyosiyanatlar, indoller ve organosülfürlü bileşikler hem enzimatik olarak karsinojen aktivitesini inhibe eder hem de apoptosisi indüklerler. Flavonoidler, vitamin C ve E ile karotenoidler ayrıca radikal süpürücü etki de gösterirler. Flavonoidler de polifenolik bileşiklerdendir. Üzümde bulunan Resveratrol, çayda bulunan gallik asitler polifenolik bileşiklere örnek

olarak verilebilir. Bu polifenolik bileşiklerden biri olan Resveratrol son yıllarda çok çalışılan bir fitokimyasal maddedir (De Kok vd 2010)

Resveratrol (3, 4', 5-trihidroksi-stilben); üzüm çekirdeğinde bol miktarda bulunan ve son yıllarda farklı mekanizmalardaki yardımcı etkileri üzerinde yoğun çalışılan doğal bir antioksidandır. Resveratrol biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı üzümlerde sentezlenen stilben grubu bir fitoaleksindir. Özellikle renkli üzüm çeşitlerinin kabuk kısmında yüksek miktarda sentezlenmektedir (0.30-14.10 mg/g yaş ağırlık; 9.30-78.50 mg/g kuru ağırlık). Birçok eczacılık ve tıp literatüründe, Resveratrol'un antifungal, antimikrobiyal, antitümör ve antioksidan etkileri olduğu vurgulanmaktadır (Kazanç 1997).

Resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanser üzerine yoğunlaşmış olup, bu bileşiğin, kanserin pek çok aşamasında durdurucu ve engelleyici özelliği olduğu belirlenmiştir (Kundu 2008). Resveratrol, anti-inflamatuar, trombosit kümeleşmesini engelleme ve kolesterolü düşürme gibi etkileriyle aynı zamanda koroner kalp hastalıkları riskini de azaltmaktadır. Fransa'da koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının düşük olması, nispeten yüksek düzeyde şarap tüketimine (Fransız Paradoksu) dayandırılmaktadır (Keskin 2009). Resveratrol'un muhtemel koruyucu etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Chakraborty vd (2004) tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada, Resveratrol'un bir alkilleyici karsinojen olan MNNG tarafından Chinese hamster akciğer fibroblast hücrelerinde (CH V-79) oluşturduğu DNA hasarını önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, Resveratrol'un üç mutajene karşı Ames bakteriyel mutajenite testi ve Mikronukleus testi ile antimutajenik etkisi araştırılmıştır. Ames testinde, Resveratrol'un sadece indirek mutajenler olan AFB1 ve IQ'ya karşı önemli ölçüde antimutajenik etki gösterdiği, direk mutajen olan MNU'a karşı koruyucu etki göstermediği gösterilmiştir. Mikronukleus testinde ise, Resveratrol'un üç mutajenin etkisini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Langova vd 2005).

Pek çok çalışmaya göre Resveratrol antikarsinojenik aktivite göstermektedir. Resveratrol, kimyasal karsinojenlerin tümör başlatıcı, ilerletici ve teşvik edici üç basamağını engellediği için kansere karşı koruyucu ajan olarak kabul edilmektedir (Jang

vd 1997). Benzo(a)pirenin teşvik ettiği karsinogenesis CYP1A1 'nin inhibisyonu ile Resveratrol tarafından azaltılabilir (Chun 1999, Ciolino ve Yeh 1999, El Attar ve Virji 1999). Resveratrol ayrıca bir fare modelinde DMBA'nın (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) teşvik ettiği karsinojeniteyi de inhibe etmiştir (Jang 1997). Yine başka bir çalışmada, genetik olarak eğilimli olan farelerde intestinal tümör genesi azalttığı gözlenmiştir (Schneider 2001). Ayrıca, Resveratrol apoptosis indükleyici olarak bilinmektedir. İlginç olan ise, Resveratrol'un tümör hücrelerinde sınırlı bir pro-apoptotik etkisi olurken, normal hücrelerin zarar görmeden kalmasıdır (Lu vd 2001). Bu sebepten Resveratrol'un bir kanser preventif ajan ve kanser terapötik ajan olarak geliştirilmesine dikkat çekilmektedir (Gusman 2001, Savouret ve Quesne 2002).

Sgambato vd (2001) tarafından yapılan çalışmalarda, Resveratrol'un sigara dumanında bulunan TAR ve H₂O₂ gibi oksidatif ajanlara maruz kalma sonucunda oluşan ROS'un artışını önlediği ve KOMET olarak da bilinen, tek hücre jel elektroforez yöntemi ile saptanan nükleer DNA fragmentasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Resveratrol pek çok karsinojenik etkisi olan genotoksik ajanın etkisiyle oluşan oksidatif DNA hasarını önleyerek, antimutajenik ve antikarsinojenik bir rol oynayabilir. Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise, oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerde, Resveratrol'un doza ve zamana bağlı olarak oksidatif stres sonucu düşen intraselüler GSH-glutasyon ve membran-SH miktarını belirgin şekilde arttırarak, oksidatif hasarı önlediği gözlenmiştir (Pandey ve Rizvi 2010).

Genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarının bir kısmını meyve sineği *Drosophila melanogaster*'in kullanıldığı kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. *Drosophila* ve insan hücre döngülerinin ve düzenleyici yollarının benzerliği tümör genesi esnasında çoğalma süreci çalışmalarında

bir model olarak hizmet eder (Potter vd 2000). *Drosophila* imajinal disklerinin biyolojik özellikleri, kansere hassas birçok memeli hücresi ile benzerdir. İmajinal diskler ergin sineklerde birçok yapıyı oluşturan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Bu diskler tek hücre tabaka yapısındadır. Larval evrede çoğalarak karakteristik morfolojiye sahip olgun diskleri üretirler ve ergin bireylerde farklılaşırlar. Çoğalmaya ve farklılaşmaya giden özelleşmiş epitel hücreleri diploittir ve memeli hücrelerindeki benzer hücre döngüsüne sahiptirler (G_1 , S, G_2 ve M safhalarını içerirler). Sinek ve memeli hücre döngüsündeki benzerlik sadece genel organizasyon seviyesi ile sınırlı değildir. Ayrıca moleküler seviyede de korunma vardır. Gelişimsel siklinler (A-, B- ve E- tip) ve onların siklin bağımlı kinaz partnerleri sinek ve insan arasında oldukça korunmuştur (Potter vd 2000). Bu amaçla *Drosophila* biyolojisi kanser araştırmalarında önemli bir model sağlar. SMART, *D. melanogaster*'in imajinal disklerinden faydalanılarak yapılan bir test sistemidir. Son yıllarda mutajenik etkilerin saptanabilmesi için *in vivo* koşullarda yapılan *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi nokta mutasyon, delesyon, kromozomlarda ayrılmama ve rekombinasyon gibi birçok genetik sonuçun belirlenebildiği bir test sistemidir. Çeşitli grup kimyasal bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisinin çalışılması için kullanışlı bir testtir (Graf 1995). *Drosophila*, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzeyen bir organizma olduğu için çeşitli kimyasalların yanı sıra bu kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılmasında da elverişlidir (Guzman-Rincon ve Graf 1995). Kullanılan özel genetik hatlar sayesinde kimyasalın sadece mutajenik etkisi değil aynı zamanda rekombinojenik etkisi hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir (Kaya vd 2006). Ayrıca meyve sineği *D. melanogaster* çeşitli bileşiklerin antigenotoksik etkilerinin de çalışıldığı önemli bir model organizmadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin genotoksisiteyi geniş bir spektrumda (nokta mutasyon, delesyon, kromozomlarda ayrılmama ve rekombinasyon) incelemesi nedeniyle, tek bir bileşiğin veya karışımların antigenotoksisitenin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Graf vd 1998, Karekar vd, 2000, Takahashi vd 2001, 2002, Kaya vd 2002).

Yapılan bu çalışmada, *D. melanogaster*'de farklı mekanizmalarla genotoksik etki gösteren üç maddeye karşı Resveratrol'ün antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde, farklı araştırmacılar tarafından farklı çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda farklı test sistemleri (*in vivo* ve *in vitro*) ve bu test sistemlerinde farklı model organizmalar kullanılmıştır. Literatür taramasında göze çarpan ise, Resveratrol ile ilgili *in vivo* genotoksisite çalışmalarının eksikliğidir.

Bu çalışma kapsamında farklı mekanizmalarla genotoksik etkiye sahip olduğu bilinen üç kimyasala karşı Resveratrol'un farklı mutasyon mekanizmalarına karşı da koruma etkisine sahip olup olmadığı *Drosophila* SMART yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma kapsamında mutajenlerin etkili bir dozuna karşı Resveratrol'un toksik olmadığı ön çalışmayla belirlenmiş olan üç farklı dozu, bir ön uygulama ve bir de eş zamanlı uygulama ile değerlendirilmiştir.

Genotoksik etkisi yapılan çalışmalarla kanıtlanmış olan Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Potasyum Dikromat'ın ($K_2Cr_2O_7$) birer dozu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kimyasallardan biri olan EMS alkilleyici bir ajandır. Alkilleyici ajanlar, alkil grupları ekleyerek veya yanlış baz eşleşmesi ile DNA'da guaninle beraber etki gösterirler (Bronstein vd 1991). Kromium (VI) bileşikleri, DNA hasarına neden olan radikal oksijen türleri üreterek genotoksik etki gösterirler (Kasprzak 1995, Shi vd 1999). Kullanılan bir diğer genotoksik ajan ise 4-NQO'dur. 4-NQO'nin DNA'da UV benzeri, kompleks lezyonlar oluşturmalarının yanı sıra (Synderwine ve Bohr 1992, Olive ve Johnston 1997) OH-radikal benzeri türlerle oksidatif DNA hasarını da indükleyebilme etkisi vardır (Nunoshiba vd 1993, Yano vd 1995). 4-NQO UV etkisini taklit eden, direk mutajenik bir ajandır (Le Curiex vd 1993). Farklı yollarla genotoksik hasara sebep olan bu maddelere karşı Resveratrol'un antigenotoksik etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada farklı mekanizmalarla genotoksisiteye sebep olduğu bilinen üç kimyasala karşı Resveratrol'un antigenotoksik etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır.

Bu test; flare (*flr*³) ve multiple wing hair (*mwh*) belirleyici genleri taşıyan bireylerin çaprazlanması sonucu elde edilen transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin fenotipte gözlenmesi esasına dayanır (Graf vd 1984, 1989). Fenotipik bu değişimlerin gözlemi farklı genetik sonuçların (delesyon, kromozomlarda ayrılmama ve nokta mutasyon) etkisi ile heterozigotluğun kaybolması sonucu ortaya çıkmaktadır.

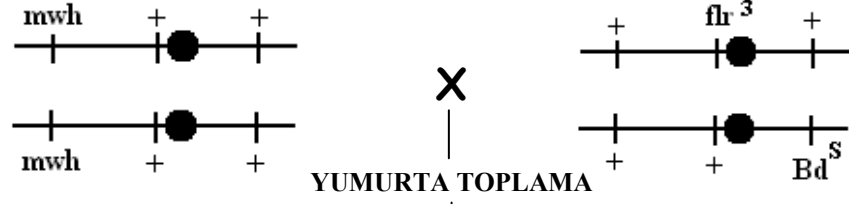
D. melanogaster kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin basamakları şematik olarak şekil 2.1'de gösterilmektedir. *D. melanogaster*'in üçüncü kromozomu üzerinde bulunan belirleyici genlerdeki değişimler hazırlanan kanat preparatlarının ışık mikroskobu yardımıyla 40X10 büyütmede incelenmesi ile mutant klonlar olarak saptanabilmektedir.

2.1. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

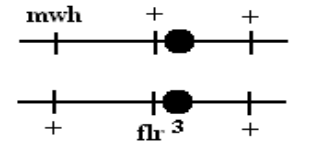
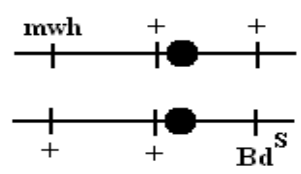
Diptera ordosundan tam başkalaşım gösteren (holometabol) bir böcek olan *Drosophila* diploid kromozom sayısına sahiptir ve dört çift kromozom taşımaktadır (Rothwell 1993).

Laboratuar çalışmalarında kullanılan *D. melanogaster* genetik araştırmalar için iyi bir model organizmadır. *Drosophila*, ökaryotik bir sistem olması, çalışmaların *in vivo* ortamlarda gerçekleştirilmesi, kısa hayat döngüsü ve yüksek üreme kabiliyetinden dolayı tercih edilen bir model organizma haline gelmiştir. *D. melanogaster*'in genetik çalışmalar için model organizma olarak kullanılması ilk defa 1909 yılında Morgan tarafından önerilmiştir (Falakalı 1990).

DROSOPHİLA KANAT SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ



- A) 48±4 SAATLİK TRANSHETEROZİGOT LARVALARA RESVERATROL ÖN UYGULAMASININ ARDINDAN 72±4 SAATLİK OLDUKLARINDA KİMYASAL UYGULAMALARI
- B) 72±4 SAATLİK TRANSHETEROZİGOT LARVALARA RESVERATROL VE KİMYASAL EŞ ZAMANLI UYGULAMALARI



MİKROSKOBİK ANALİZ

NOKTA MUTASYON,
DELESYON ve SOMATİK
REKOMBİNASYON

SOMATİK
REKOMBİNASYON

Küçük Tek Tip
Klonlar
mwh (1-2 hücre)

Büyük Tek Tip
Klonlar
mwh (>2 hücre)

Büyük Tek
Tip Klonlar
flr³

İkiz Klonlar

Şekil 2.1. *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi (Kaya 2000)

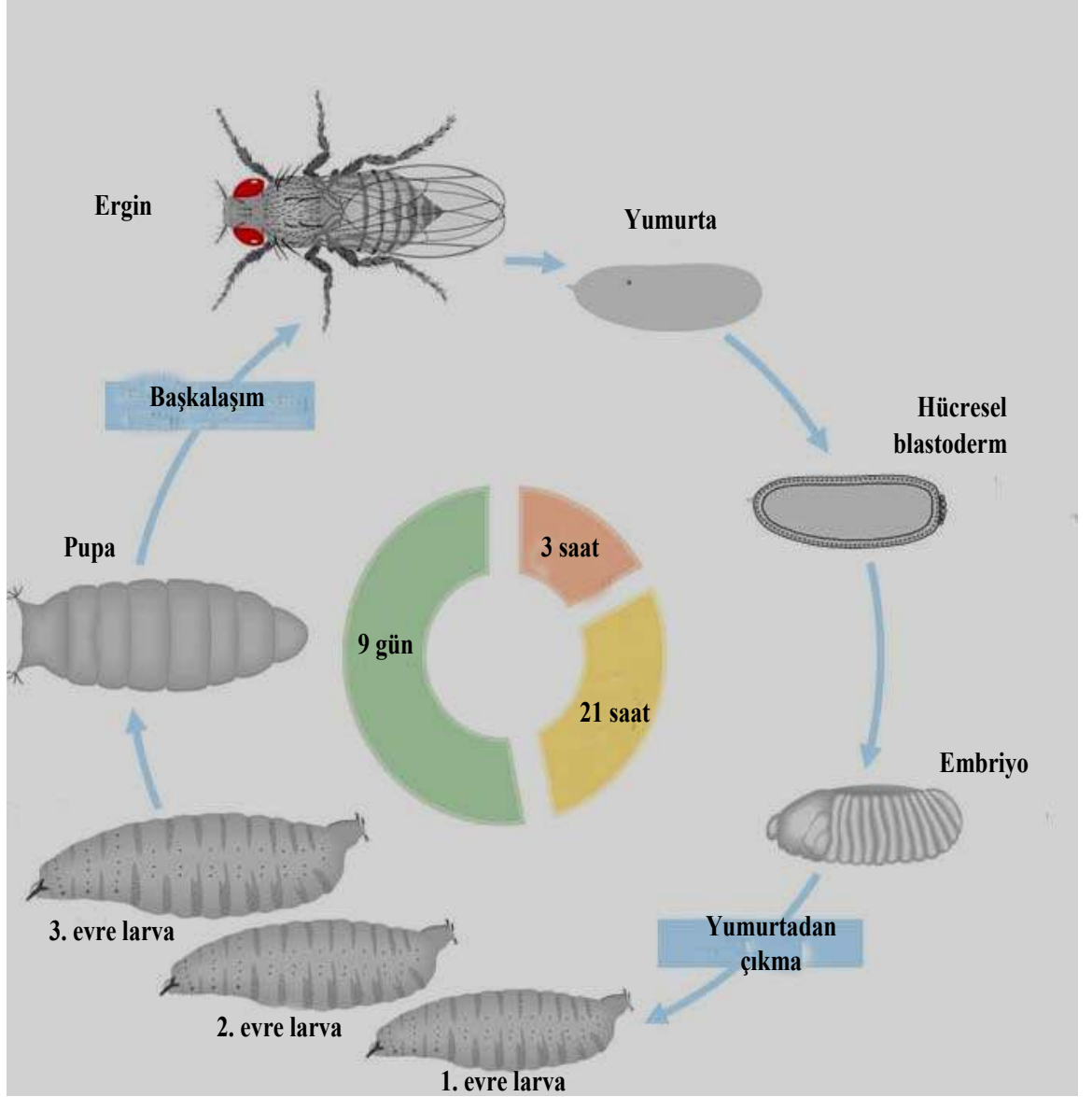
İdeal yaşam koşulları olan 25 °C ve % 60 bağıl nem ortamında olgunlaşma süreci 9 ile 11 gün olan *Drosophila*'nın yaşam döngüsü şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Drosophila'nın gösterdiği başkalaşım evreleri ve bu evrelerin süreleri 25 °C'de aşağıdaki gibidir.

Embriyonik gelişim	: 1 gün
Birinci larval evre (L1)	: 1 gün
İkinci larval evre (L2)	: 1 gün
Üçüncü larval evre (L3)	: 2 gün
Prepupa evresi	: 4 saat
Pupa evresi	: 4.5 gün
Yetişkin evresi	: 40-50 gün

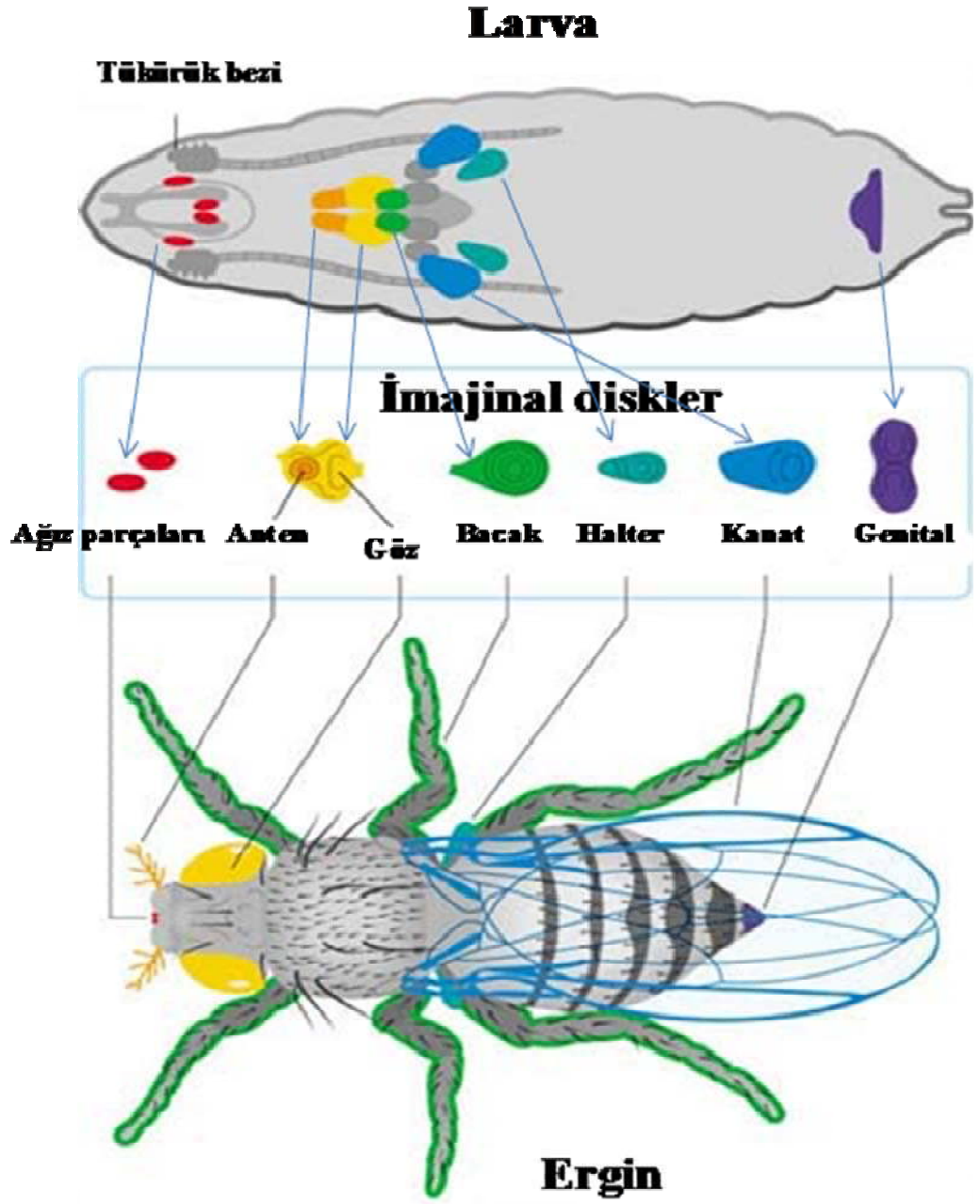
Pupadan ilk çıktıklarında vücut uzun ve açık renkte, kanatlar kısa ve kıvrık görünümlü bir durumdadır, ilerleyen bir kaç saat içinde yeni çıkan bireyler normal görünümlü ergin bireyler halini almaktadır. Ergin bireylerin ortalama yaşam süreleri 40-50 gün arasında olmasına karşın 80-90 gün yaşayan bireyler de gözlenmiştir (Graf ve Vanschaik 1992).

Drosophila'nın erkek bireyleri pupadan çıktıklarında eşeyssel olgunluğa erişmiş durumdadır. Ancak dişi bireylerin eşeyssel olgunluğa erişmesi için 6-12 saat gibi bir zamanın geçmesi gerekmektedir. Bu dönemdeki dişi bireyler henüz döllenme yeteneğinde değildirler. Bu nedenle, çalışmamızda çaprazlamaların kontrollü olabilmesi için pupadan çıkıştan itibaren en fazla 4 saatlik olan döllenmemiş (virjin) olan dişi *flr*³ bireyler kullanılmıştır.



Şekil 2.2. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü (Morgan 1999-2007)

Genellikle 2.1-2.2 mg ağırlığında olan üçüncü larva evresinde olan bireyler yaşama ortamlarında kuru bir yer bularak pupa evresine geçerler (Würgler ve Vogel 1986, Ashburner 1989). Pupa içerisinde imajinal disk hücrelerinin bölünerek çoğalmasından sonra başkalaşım geçirerek oluşan ergin bireyler pupa kılıfını üst kısmından yırtarak çıkmaktadırlar. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki pozisyonları şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki konumları (Morgan 1999-2007)

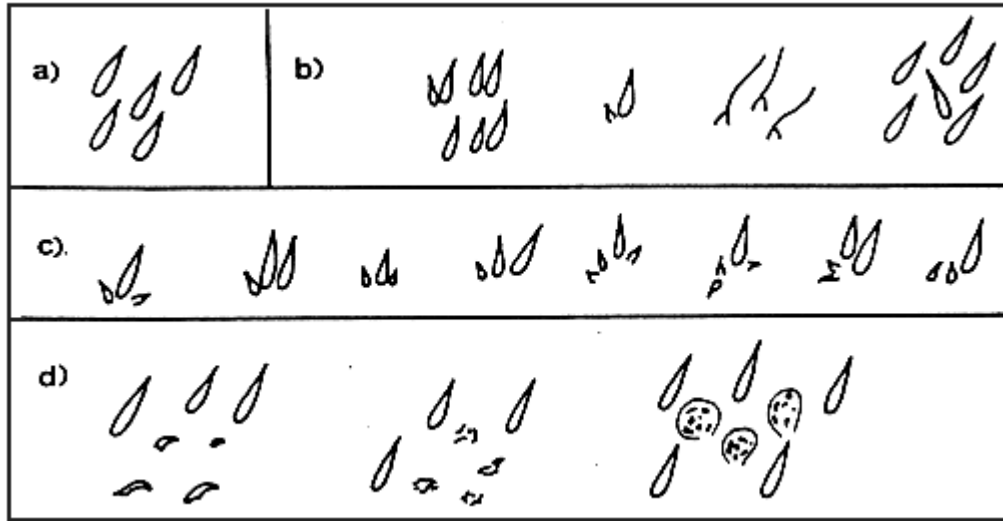
2.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Drosophila SMART yönteminde kullanılan hatlar, üçüncü kromozomları üzerinde iki belirleyici gen taşımaktadırlar. Çalışmada kullanılan bireylerin genetik yapısı aşağıdaki

gibidir (Lindsley ve Grell 1968, Lindsley ve Zimm 1992, Garcia-Bellido ve Dapena 1974).

- *mwh* / *mwh* (erkek)
 - *flr³* / *ln (3LR) TM3, ri p^P sep bx^{34e} e^S Bd^S*
- kısaca;
- *flr³* / *TM3, Bd^S* (dişi) olarak gösterilmektedir.

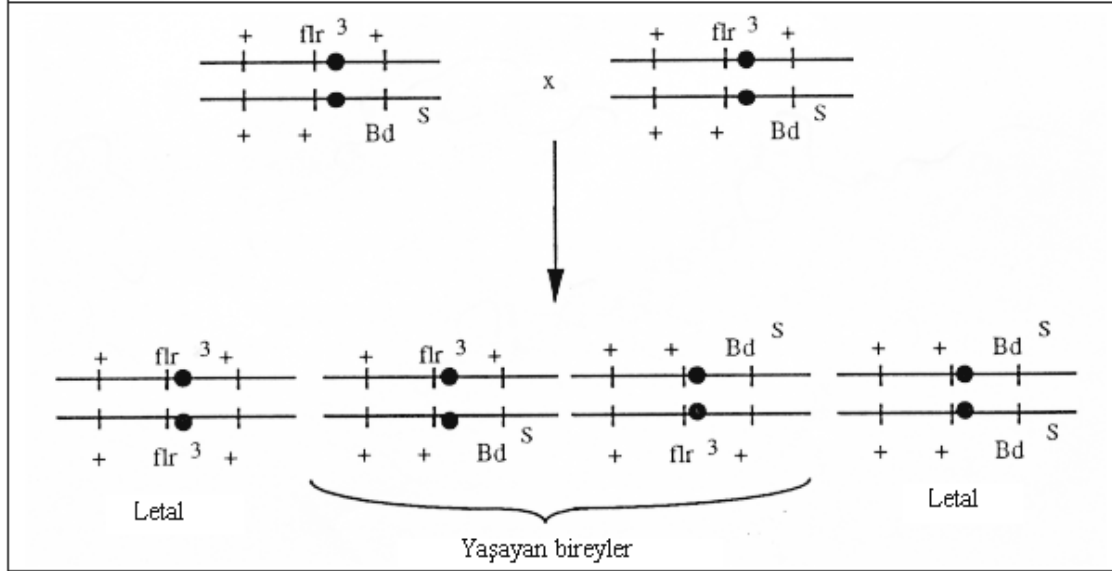
Normal kanatlarda kıllar düz ve uzun bir yapı gösterirken *flr³* (3-38.8) geninde kanat kılları kısa, kalın ve şekilsizdir (Şekil 2.4). *mwh* (3-0.3) geni ise aynı hücreden tek bir kıl yerine üç veya daha fazla sayıda kanat kılının çıkmasıyla kendini göstermektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne *flr³* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) *mwh* trikomlar d) *flr³* genotipe ait trikomlar (Graf vd 1984, Graf vd 1992)

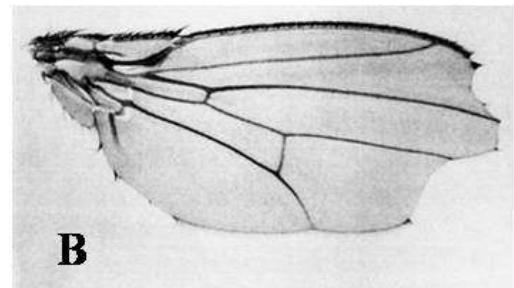
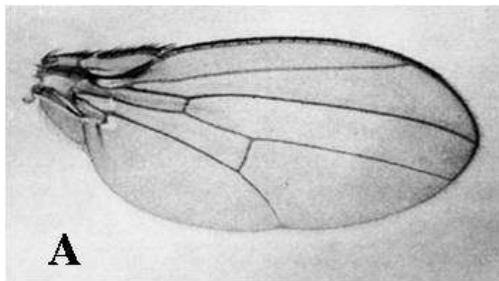
flr³ geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir (Şekil 2.5). Bireyleri, bu letal etkiden korumak için TM3 dengeleyici kromozomu kullanılmaktadır. Dengeleyici kromozom, letal etkisinden korunmak istenen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde bulunur. Ayrıca dengeleyici kromozom

rekombinasyonu baskılayarak mutasyon ve rekombinasyonun birbirinden ayrılmasını da sağlamaktadır (Graf vd 1984, Graf vd 1992)



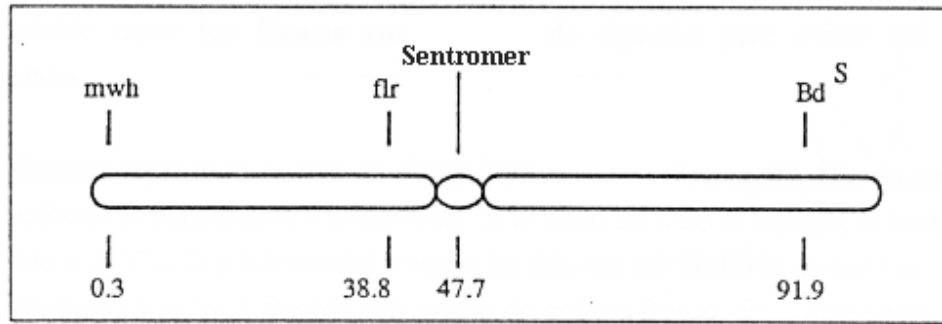
Şekil 2.5. $flr^3 / TM3$, Bd^S bireylerindeki homozigot letal etkiler (Graf vd 1984)

Normal fenotipteki kanatların kenarları düzgün bir yapı gösterirken (Şekil 2.6-A), Bd^S (Beaded Serrat) genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün değildir (Şekil 2.6-B). Homozigot halde letal etki gösteren dominant Bd^S geni, TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle TM3 dengeleyici kromozomuna sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer bireylerden kolaylıkla ayrılabilir (Graf vd 1984, Graf vd 1992).



Şekil 2.6. Dengeleyici kromozom taşımayan normal (A) ve dengeleyici kromozom taşıyan Bd^S bireylerinin (B) kanat fenotipleri (Orijinal)

Üçüncü kromozomun en büyük kromozom olması ve belirleyici genler arasındaki mesafenin de oldukça uzak olması gerek rekombinasyonun ve gerekse mutasyonların büyük bir aralıkta incelenmesi açısından bir avantaj oluşturmaktadır. SMART için kullanılan genetik hatların taşıdığı TM3 dengeleyici kromozomu çalışmada belirleyici olarak kullanılan *flr*, *mwh* ve *Bd^S* genleri ile birlikte *Drosophila*'nın üçüncü kromozom üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.7) ve bu kromozom üzerindeki rekombinasyonların baskılanması açısından önemlidir (Graf vd 1984, Graf vd 1992).



Şekil 2.7. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri (Graf vd 1984, Graf vd 1992)

2.3. *Drosophila* Hatlarının Kültürü

D. melanogaster'ler, ideal yaşam koşullarına (25 °C ve % 60 bağıl nemde) sahip özel iklim odasında standart Lewis besin ortamında (Lewis ve Bacher 1968) kültüre alınmaktadır. Ayrıca iklim odasının aydınlatması 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Standart Lewis besin içeriği aşağıdaki gibidir;

✓ Mısır unu	: 104 g
✓ Şeker	: 94 g
✓ Maya	: 19 g
✓ Agar	: 5 g
✓ Asit karışımı	: 6 ml
✓ Distile su	: 1020 ml

Besin ortamındaki asit karışımında propionik asit, ortofosforik asit ve distile su bulunmaktadır. Asit karışımı besinin kontamine olmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Besinin fungus ile kontaminasyonu yumurta verimini ve bireylerin gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Asit hariç diğer maddelerin karıştırılmasıyla oluşan çözeltinin ateş üzerinde karıştırılarak kaynaması sağlandı. Karışım kaynamaya başladıktan sonra kısık ateş üzerinde 1-2 dakika daha kaynatıldı ve ateşten indirilerek asit karışımı eklenerek asidin eşit olarak dağılması için iyice karıştırıldı. Hazırlanan bu standart *Drosophila* besini şişelere yaklaşık olarak 1-1.5 cm kalınlığında döküldü ve şişelerin ağızları kurutma kağıtlarıyla kapatılarak kurumaya bırakıldı. Hazırlanmış olan besinler yeterince kuruduktan sonra (yaklaşık 1-2 gün) yeterli sayıda döllememiş dişi toplayabilmek için kültür zenginleştirildi. Kültür iklimlendirilmiş kültür ortamında 25 ± 0.5 ° C de % 60 bağıl nem ortamında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olan ortamda yetiştirildi.

Kültüre alınan bireyler kuru olan besin üzerine yumurta bırakırlar (Graf vd 1984). Bir gün sonra yumurtalar açılır ve larvalar besin içerisinde beslenmeye başlarlar. Yumurtadan çıkıp pupa oluşturuncaya kadar larvalarda gözle görülür bir büyüme gözlenirse de, imajinal disk hücreleri hariç diğer larval hücrelerde bölünme gözlenmez. Hücreler sadece boyut olarak büyüme yoluna gitmektedirler. Larvalar üçüncü evreye ulaştıklarında yaşama ortamlarında kuru bir yer bularak pupa evresine geçerler (Ashburner 1989, Würglar ve Vogel 1986). Pupa içerisinde imajinal disk hücrelerinin bölünerek çoğalmasından sonra metamorfoz geçiren bireyler ergin bireyler hale gelerek pupadan dışarı çıkmaktadırlar.

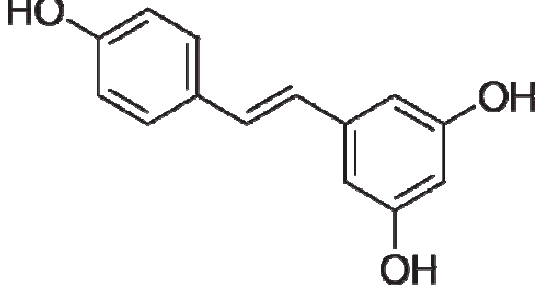
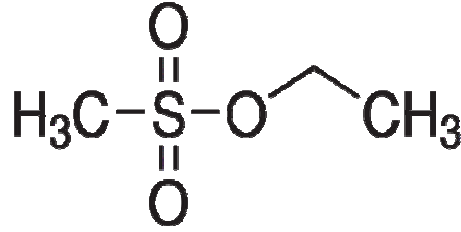
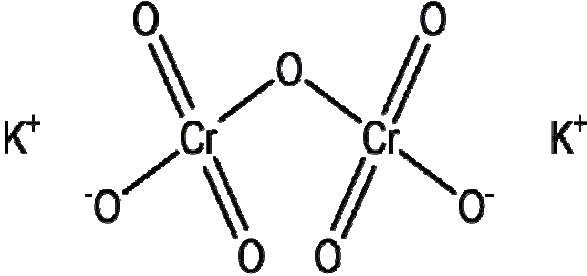
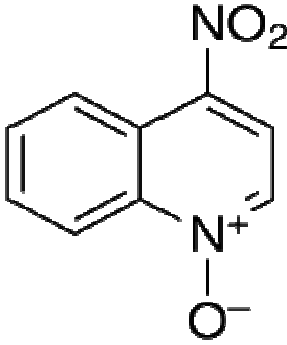
2.4. Deney Grupları

Bu çalışmada, Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$)'ın genotoksisitesine karşı Resveratrol'ün ön uygulamalar ve eş zamanlı uygulamalar ile antigenotoksik etkileri çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada Resveratrol, EMS ve $K_2Cr_2O_7$ suda, 4-NQO ise % 5 etanolde çözülerek çalışmalarda derişimler hazırlandı. 4-NQO'in % 5 etanolde çözünmüş olması nedeniyle % 5 etanol ve su negatif kontrol grubu olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasalların CAS (Chemical Abstract Service) numaraları, kimyasal yapıları, dahil oldukları gruplar, ismi ve saflık dereceleri Çizelge 2.1' de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı, CAS no. Saflık derecesi	Kimyasal yapısı
RESVERATROL 3,4',5-Trihydroxy- <i>trans</i> -stilbene 501-36-0 ≥99%	
ETİL METAN SÜLFONAT 1-Methylsulfonyloxyethane 62-50-0 ≥98%	
POTASYUM DİKROMAT Potassium Dichromate (VI) 7778-50-9 ≥99%	
4-NİTROKİNOLİN OKSİT 4-Nitroquinoline 1-oxide 56-57-5 >98%	

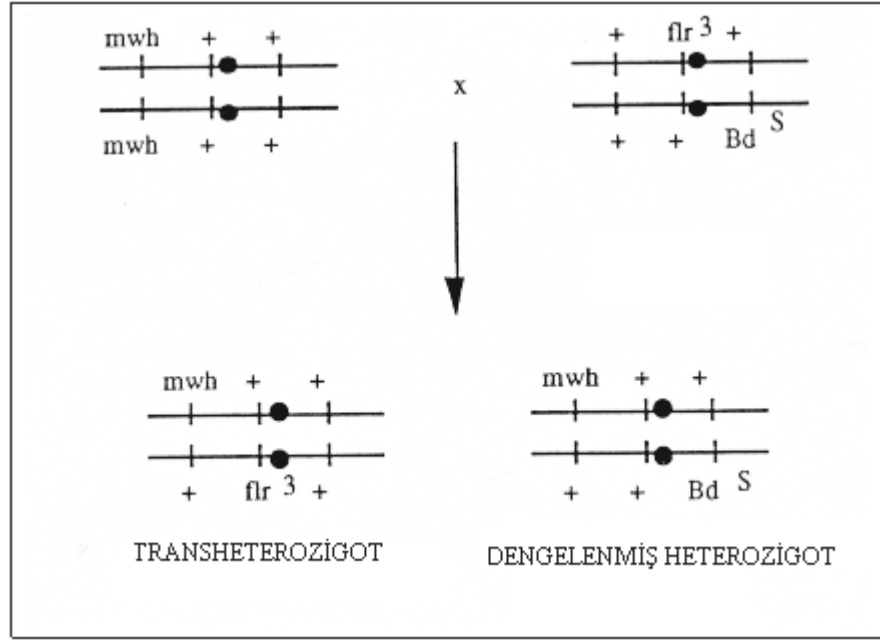
2.5. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi

Bu çalışmada; *mwh/mwh* ve *flr³/TM3, Bd^S* genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanıldı. Yapılan çaprazlama aşağıdaki gibidir.

$$\text{♀ } flr^3 / TM3, Bd^S \times \text{♂ } mwh / mwh$$

flr³/TM3, Bd^S hattının yüksek yumurta verimine sahip olması nedeniyle çaprazlamada dişi bireyleri tercih edilmiştir.

Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için döllenmemiş dişi bireylerin kullanılması gerekmektedir. Bunun için de 4'er saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplanarak yeni bir besin ortamına alındılar. Bireylerin yaşı üreme verimi üzerinde etkili olduğundan, üreme verimliliği için en ideal yaş olan 3-7 günlük bireyler tercih edildi. Ayrıca yeterli miktarda transheterozigot larvanın elde edilebilmesi için her şişeye ortalama 40 ♂ ve 40 ♀ olacak şekilde birey konularak çaprazlama yapıldı ve bu bireyler en az bir gün aynı ortamda bırakılarak döllenme ve embriyogenezin gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra bireyler yeni bir besin ortamına alınarak 8 saat boyunca yumurta bırakmaları sağlandı. Böylece aynı larval evrede olan transheterozigot larvalar elde edilmiş oldu. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanıldı. Larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama şekil 2.8'de gösterilmektedir (Graf vd 1984, 1989, Vanschaik ve Graf 1991).



Şekil 2.8. Dengelenmiş heterozigot *mwh/Bd*^S ve transheterozigot *mwh/flr*³ bireylerin elde edilebilmesi için *mwh/mwh* ve *flr*³/*TM3*, *Bd*^S bireyleri arasındaki çaprazlamalar (Graf vd 1984)

2.6. Resveratrol Dozlarının 48 ± 4 ve 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları

Elde edilen bir grup transheterozigot larva 48 ± 4 saatlik olduklarında, bir başka grup transheterozigot larva ise 72 ± 4 saatlik olduklarında Resveratrol'un genotoksik olmadığı ön çalışmalarla belirlenen üç (3) dozuna (1, 5 ve 10 mM) maruz bırakılmıştır.

2.7. Etil Metan Sülfonat, 4-Nitrokinolin Oksit, Potasyum Dikromat ve Resveratrol Dozlarının Ön Uygulamaları ve Eş Zamanlı Uygulamaları

Ön çalışmalarla genotoksik olduğu belirlenmiş olan EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) 'un genotoksitesine karşı Resveratrol'un üç dozunun (1, 5 ve 10 mM) antigenotoksik etkileri ön uygulamalar ve eş zamanlı uygulamalar ile test edilmiştir. Ön uygulama çalışmalarında 48 ± 4 saatlik larvalar ön uygulamalı olarak Resveratrol'un farklı dozlarına maruz bırakıldıktan sonra aynı larvalar 24 saat sonra EMS, 4-NQO ve $K_2Cr_2O_7$ 'in genotoksik dozlarına maruz bırakılmıştır. Bunun yanı sıra bir başka larva grubu 72 ± 4 saatlik olduklarında Resveratrol ve mutajenlere eş zamanlı maruz bırakılmıştır.

İmajinal diskler, larval gelişim periyodu boyunca sürekli mitotik bölünme ile büyüyen hücrelerdir. Kanat imajinal disk hücreleri, birinci larval evrede yaklaşık 50-100 kadardır. Üçüncü larval evrede (72 saatlik larva) bu sayı yaklaşık 24.400'e ulaşmaktadır (Graf 1995). Genç larvalarda oluşan klonlar sayı bakımından azdır fakat bunlar oldukça büyük klonlardır. Larval gelişim esnasındaki sürekli hücre çoğalması, imajinal disklerdeki hedef hücre sayısının artmasına neden olur. Böylece mutajen uygulanan larvanın yaşının artması ile birlikte klon indüksiyon frekansının artması beklenir. Artan klon sayısının aksine oluşan klonların büyüklükleri genç larvalara göre daha küçüktür. Bu yüzden kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için mutajen uygulanmasında en uygun zamanın 72. saat olduğu bildirilmektedir (Graf 1995).

Ön uygulamalar için sekiz saat boyunca toplanan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvalar ikinci larval evreye ulaştığında (48 saat sonra) besinler musluk suyu altında yıkanarak larvalar ince gözenekli metal elekten geçirilerek ayrıldı. 48 ± 4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan plastik tüpler içerisine birer ölçü (~ 4.5 gr) hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, ABD) konuldu ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış Resveratrol derişimlerinin 9 ml'si ile nemlendirildi. Her bir tüp içerisine musluk suyu altında ayrılan larvalardan 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konuldu ve tüplerin ağızları sünger tıkaçlarla kapatıldı. Resveratrol uygulanan tüpler 25 ± 0.5 °C'deki inkübatöre (Sanyo) konuldu. 24 saat boyunca Resveratrol ile nemlendirilmiş besinle beslenen larvalar 72 ± 4 saatlik olduklarında aynı şekilde EMS, 4-NQO ve $K_2Cr_2O_7$ 'ın farklı dozlarına maruz bırakıldı.

Eş zamanlı uygulamalar için ise sekiz saat boyunca toplanan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvalar üçüncül larval evreye ulaştığında (72 saat sonra) besinler musluk suyu altında yıkanarak larvalar ince gözenekli metal elekten geçirilerek ayrıldı. 72 ± 4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan plastik tüpler içerisine birer ölçü (~ 4.5 gr) hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, ABD) konuldu ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış Resveratrol derişimleri ile çözülerek hazırlanan EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) çözeltilerinin 9 ml'si ile

nemlendirildi. Her bir tüp içerisine musluk suyu altında ayrılan larvalardan 1-2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konuldu ve tüplerin ağızları sünger tıkaçlarla kapatıldı.

Çalışılan her bir derişim için normal kanatlı bireylerden cinsiyet gözetilmeksizin tesadüfî olarak 40 birey (80 kanat) seçilerek kanat preparatları hazırlandı. Her bir derişim için 80 kanadın istatistikî değerlendirmeler için yeterli olduğu Frei ve Würbler (1995) tarafından belirlenmiştir.

Antigenotoksik etkinin tespit edilebilmesi için aşağıdaki gibi bir deneysel yol izlenmiştir:

1- Birinci grupta 48 saatlik (2. larval evre) transheterozigot larvalar ön çalışma ile belirlenen Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozlarına maruz bırakılmıştır.

2- İkinci grupta, 72 saatlik larvalar sadece Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozlarına maruz bırakılmıştır.

3- Üçüncü grupta, 48 saatlik (2. larval evre) transheterozigot Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozlarına maruz bırakılan larvalar 72 saatlik olduklarında 1 mM EMS, 3 mM 4-NQO ve 1 mM K₂Cr₂O₇ bileşiklerine maruz bırakılmıştır.

4- Dördüncü grupta, 72 saatlik larvalar eş zamanlı olarak hem Resveratrol'ün 1, 5 ve 10 mM dozlarına hem de 1 mM EMS, 3 mM 4-NQO ve 1 mM K₂Cr₂O₇ bileşiklerinin dozlarına maruz bırakılmıştır.

5- Beşinci grupta, transheterozigot larvalar 48. ve 72. saatlerde ayrı ayrı sadece distile suya ve 72. saatte % 5 etanole maruz bırakılmıştır. Buradan elde edilecek bireyler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

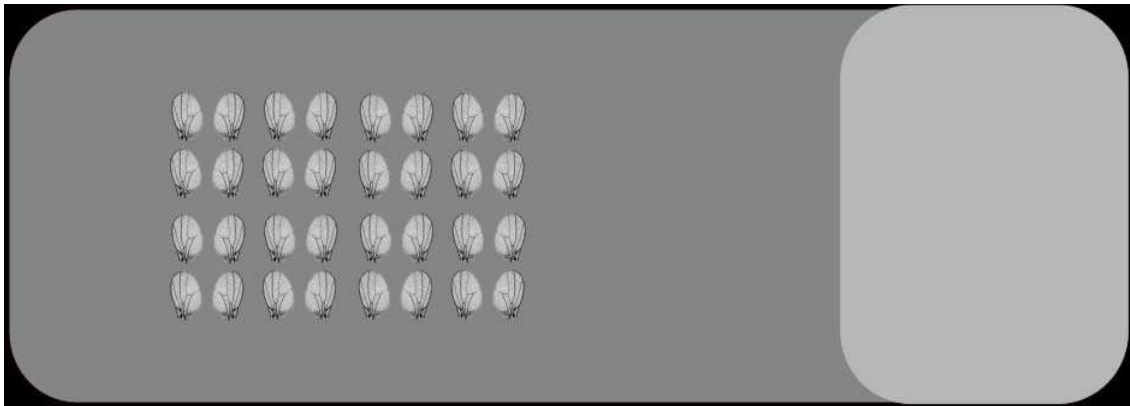
2.8. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Yapılan tüm uygulamalardan sonar farklılaşarak pupadan çıkan ergin bireyler eterle bayıldıktan sonra toplandı. Yeterli sayıda birey elde edilinceye kadar her gün bu işleme devam edildi. Toplanan bireyler, kanat preparatları hazırlanıncaya kadar % 70'lik etil alkole alınarak +4 °C'de saklandı.

Kanat preparatlarının hazırlanmasında kullanılan Faure çözeltisinin içeriği aşağıdaki gibidir (Kaya 2000).

- Gum arabic : 30 g
- Gliserol : 20 ml
- Kloral hidrat : 50 g
- Distile su : 50 ml

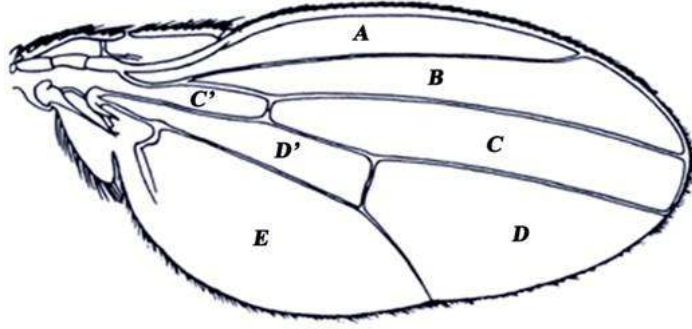
Kanat preparatları hazırlanmadan önce uygulamalardan elde edilen normal kanatlı bireyler distile su içerisine alındılar. Çukur lam üzerine 1-2 damla Faure solüsyonu damlatılarak distile su içerisindeki bireyler birer birer solüsyon içerisine alındılar. Daha sonra ince uçlu pens ve iğne yardımıyla Nikon SMZ645 model stereo mikroskop altında bireylerin kanatları vücutlarından ayrıldı. Ayırma işleminde, kanata ve üzerindeki kıllara zarar verilmemesine dikkat edildi. Aynı bireye ait kanatlar çiftler halinde düzgün bir şekilde lam üzerine yerleştirildi (Şekil 2.9). Hazırlanan preparatlar bir gün süre ile tozsuz bir ortamda kuruması için bekletildi. Kuruyan preparatların üzerine 1-2 damla Faure solüsyonu damlatılarak lamel (24X60 mm) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Preparatlar kurutma kâğıdına sarıldıktan sonra üzerlerine metal bloklar konarak en az iki gün kurumaya bırakıldılar. Preparatlar tamamen kuruduktan sonra kenarlarına taşmış olan fazla Faure solüsyonu distile su ve kurutma kâğıdı yardımıyla temizlenerek sayıma hazır hale getirildi (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Kanat preparatlarının hazırlanması (Orijinal)

2.9. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi

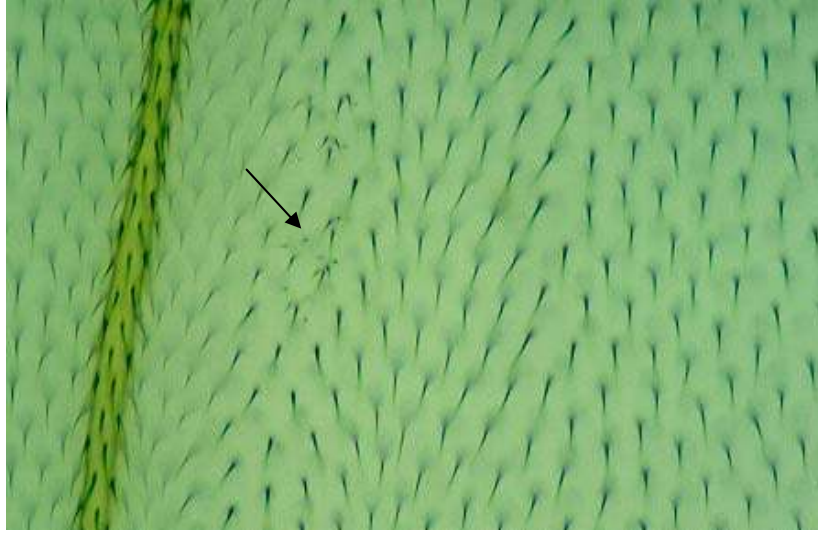
Hazırlanan kanat preparatları Nikon YS100 model ışık mikroskopunda 40X10 büyütmede incelendi. Kanat üzerindeki sektörler incelemeye kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C', D, D' ve E olarak bölümlere ayrıldı (Şekil 2.10). Her bir sektörün her iki yüzündeki (dorsal ve ventral) hücre tabakaları da mikrovida yardımıyla kontrol edilerek mutant klonların olup olmadığı incelendi ve bunların kayıtları tutuldu (Kaya 2000).



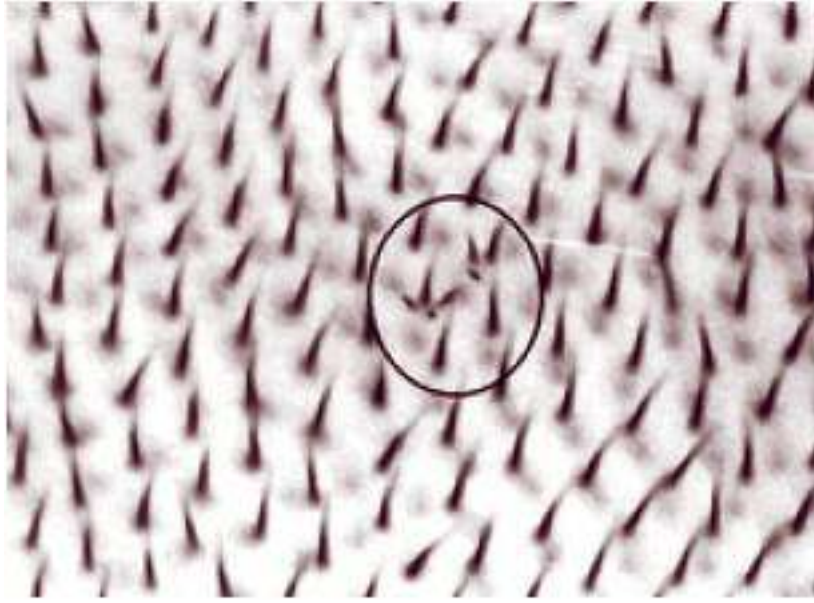
Şekil 2.10. Kanat sektörlerinin şematik görünümü (Graf vd 1984)

Sayımda mutant klonlar, küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olmak üzere üç kategoride değerlendirildi. Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf vd (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar sadece 1 veya 2 tane *mwh* hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.12).

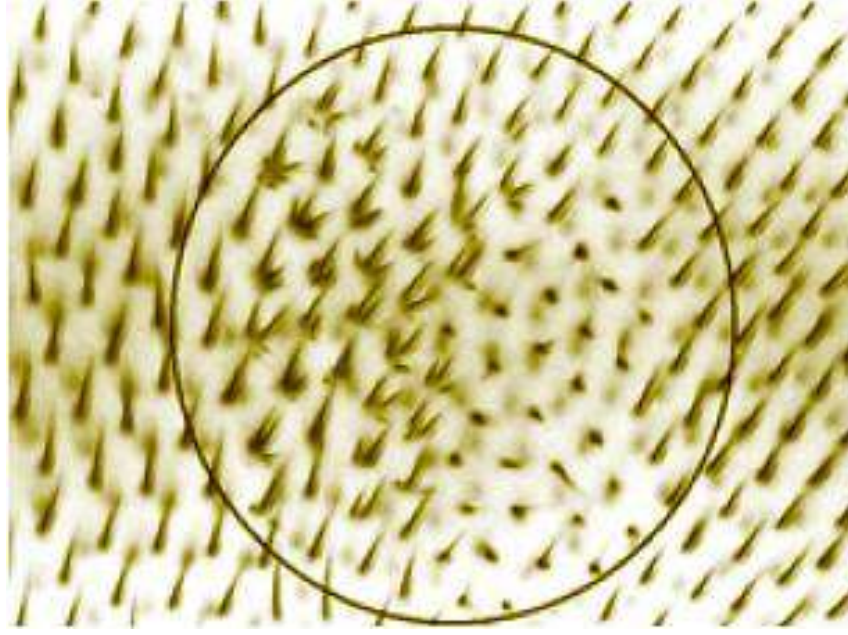
Büyük tek tip klonlar 3 veya daha fazla *mwh* ya da 4 veya daha fazla *flr³* mutant hücrelerinin oluşturduğu klonlardır (Şekil 2.11 ve Şekil 2.14). Daha önce yapılan çalışmalarda *flr³* klonlar için dörtten daha az sayıda gözlenen sadece *flr³* fenotipteki trikomların oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle olduğu, bu yüzden *flr³* fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücrelerin sayıma dahil edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Szabad vd 1983). Bu nedenle küçük tek tip klonlar sadece *mwh* hücrelerden oluşmaktadır. Diğer bir kategori olan ikiz klonlar ise *mwh* ve *flr³* hücrelerinin aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu klonlardır (Şekil 2.13).



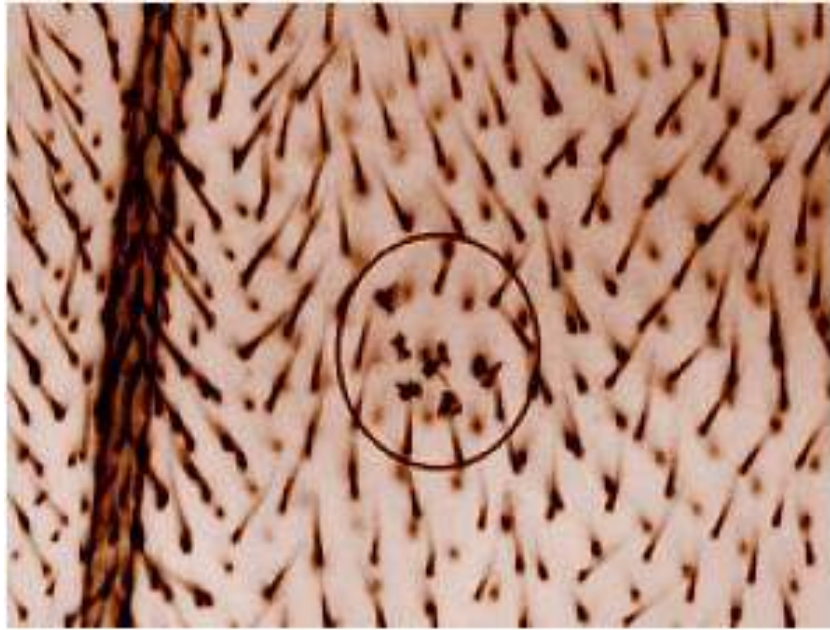
Şekil 2.11. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü (Orijinal)



Şekil 2.12. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü (Orijinal)

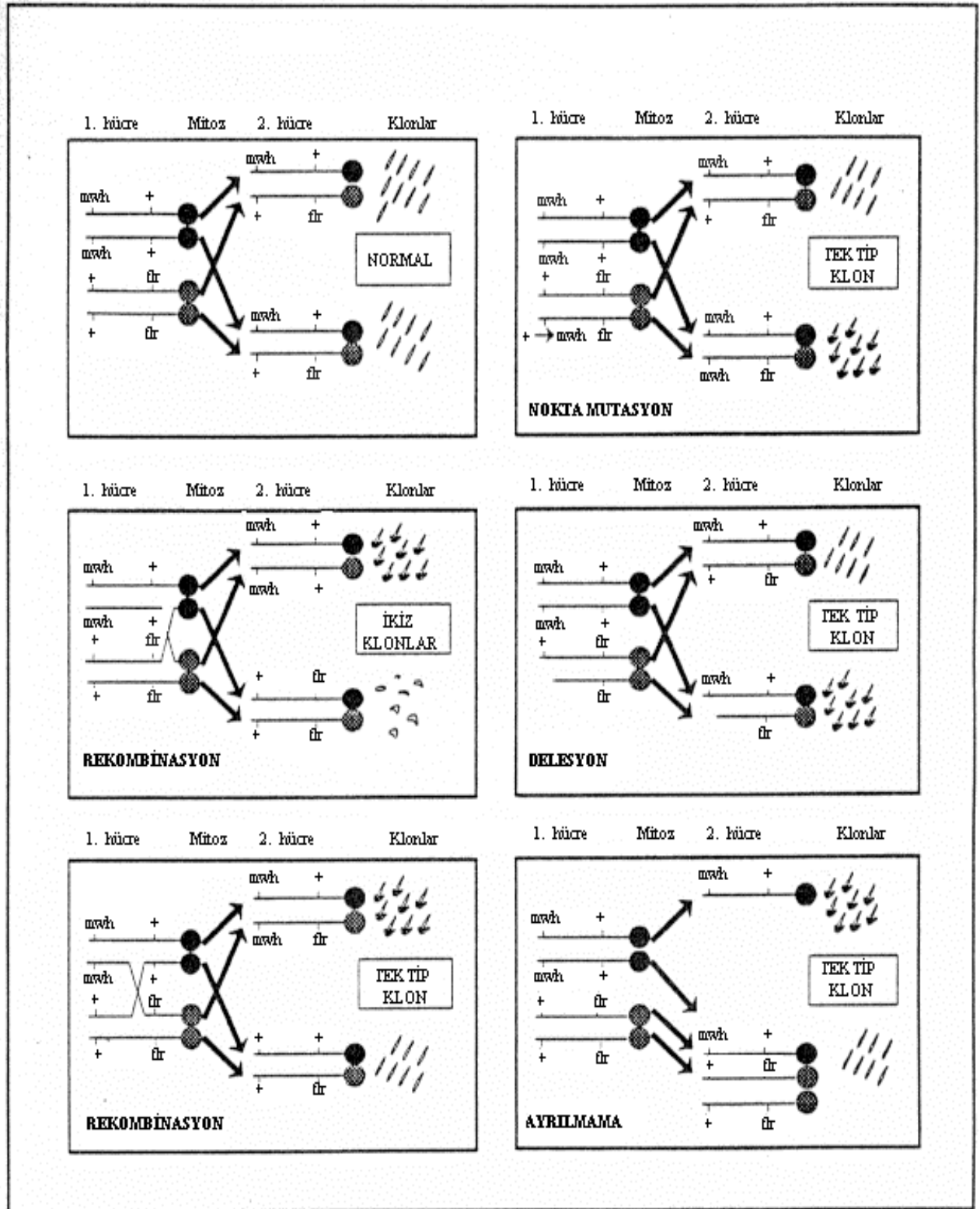


Şekil 2.13. İkiz mutant klonların görünümü (Orijinal)



Şekil 2.14. Büyük tek tip flr^3 mutant klonların görünümü (Orijinal)

mwh ve *flr*³ hücreleri aynı klon içerisinde bulunabildikleri gibi yan yana iki ayrı klon olarak da bulunabilirler. Graf vd (1984) birbirine komşu iki mutant klonun sınıflandırılmasında, iki klon arasında üç yada daha fazla sayıda yaban tip trikoma sahip hücre sırası varsa bunları iki farklı klon olarak değerlendirmişlerdir. *mwh* klonların oluşması nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucu olmaktadır (Şekil 2.15). Buna karşın, gerek *flr*³ klonlar gerekse ikiz klonlar *flr*³ geni ile sentromer arasında gerçekleşen bir rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. *mwh/flr³* genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomaliler (Graf vd 1984)

2.10. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Szabad vd 1983).

$$f = \frac{n}{N \times C} \times 10^5$$

Sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdaki “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, “N” analiz edilen kanat sayısını ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarla bu sayının 24.400 olduğu belirlenmiştir (Garcia-Bellido ve Merriam 1971).

Ayrıca inhibisyon/indüksiyon yüzdeleri de aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Abraham 1994):

$$\text{İnhibisyon/İndüksiyon} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a, tek başına kimyasal tarafından indüklenen toplam klon frekansını ve **b**, kimyasal ile birlikte Resveratrol’ün uygulandığı dozların toplam klon frekansını göstermektedir.

2.11. Verilerin Değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan bilgisayar programı (MICROSTA) yardımıyla değerlendirildi. Değerlendirme yapılmadan önce iki farklı hipotez kuruldu. Orijinal (null) hipotez (H_0)’da uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez (H_a)’da ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan *m* defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezler Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplandı.

Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (n_t) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (n_c) mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse H_A red edildi. Orijinal ve alternatif

hipotezlerin kabul veya red edilmesinde karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden yararlanıldı.

Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Selby ve Olson 1981, Frei ve Würzler 1988).

Çizelge 2.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H_A	
		KABUL (1-β)	RED (β)
H₀	KABUL (1-α)	ÖNEMSİZ FARK $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	NEGATİF $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P=\alpha\beta$

Bu değerlendirmelerle sonuçlar; H₀ ve H_A’nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 2.2 kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile antigenotoksikolojik özellikleri değerlendirilen Resveratrol uygulamalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1-3.4’de gösterilmiştir. Resveratrol’ün antigenotoksik etkileri değerlendirilirken her bir derişim için, normal kanatlı bireylerden kanat preparatları hazırlanarak incelenmiştir. Bu çalışmada toplam 2560 kanadın mikroskop altında incelenmiştir.

3.1. Kontrol Grupları

3.1.1. 48 ± 4 saatlik Resveratrol dozları, distile su ve etil metan sülfonat (EMS) uygulamaları

48 ± 4 saatlik distile su uygulamasında, preparatı yapılan 80 kanatta 14 adet küçük tek tip klon, 3 adet büyük tek tip klon, 1 adet ikiz klon olmak üzere toplam 18 adet klon belirlenmiştir. Toplam *mwh* klon sayısı ise 18 olarak bulunmuştur. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 0.92 (Bkz. Çizelge 3.1) olarak hesaplanmıştır.

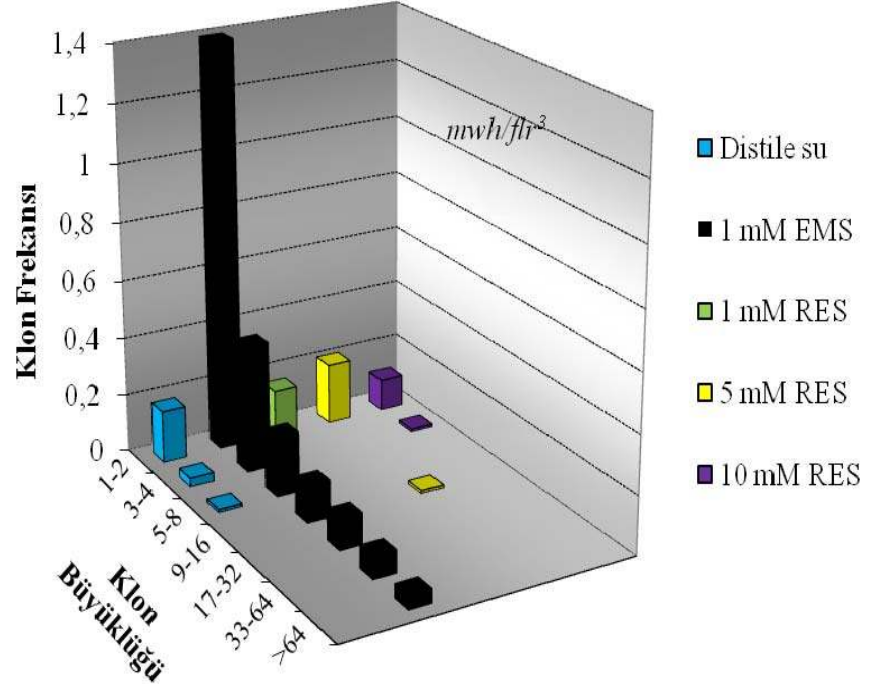
Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve daha önceki çalışmalarda (Graf vd 1984, Kaya 2000) genotoksik olduğu belirlenmiş olan Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucunda, distile su ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlenirken Resveratrol’ün çalışılan dozlarının hiçbirinde istatistiksel anlamda negatif kontrol grubundan fark tespit edilmemiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Resveratrol Dozlarının 48 ± 4 saatlik Uygulamaları

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) ($m=5$)			İkiz klonlar ($m=5$)			Toplam mwh klonları ($m=2$)			Toplam klonları ($m=2$)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5 hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile su	80	14	(0.18)		3	(0.04)		1	(0.01)		18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 mM EMS	80	116	(1.45)	+	87	(1.09)	+	33	(0.41)	+	230	(2.88)	+	236	(2.95)	+	11.8
Resveratrol (mM)																	
1	80	13	(0.16)	-	0	(0.00)	-	0	(0.00)	i	13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
5	80	17	(0.21)	i	1	(0.01)	-	1	(0.01)	i	19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0.97
10	80	9	(0.11)	-	1	(0.01)	-	1	(0.01)	i	11	(0.14)	-	11	(0.14)	-	0.56

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würger 1988): +, pozitif; negatif; i, önemsiz fark; m =çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05

RESVERATROL DOZLARININ 48 ± 4 SAATLİK UYGULAMALARI



Şekil 3.1. Resveratrol dozlarının (1, 5 ve 10 mM) 48 ± 4 saatlik uygulamalarına ait klon frekans dağılımı

3.1.2. 72 ± 4 Saatlik Resveratrol dozları, distile su, % 5 etanol, etil metan sülfonat (EMS), 4- nitrokinolin oksit (4-NQO) ve potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) uygulamaları

72 ± 4 saatlik 3. evre transheterozigot larvalara distile su, % 5 etanol, EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) Resveratrol'ün dozları (1, 5 ve 10 mM) uygulanmıştır.

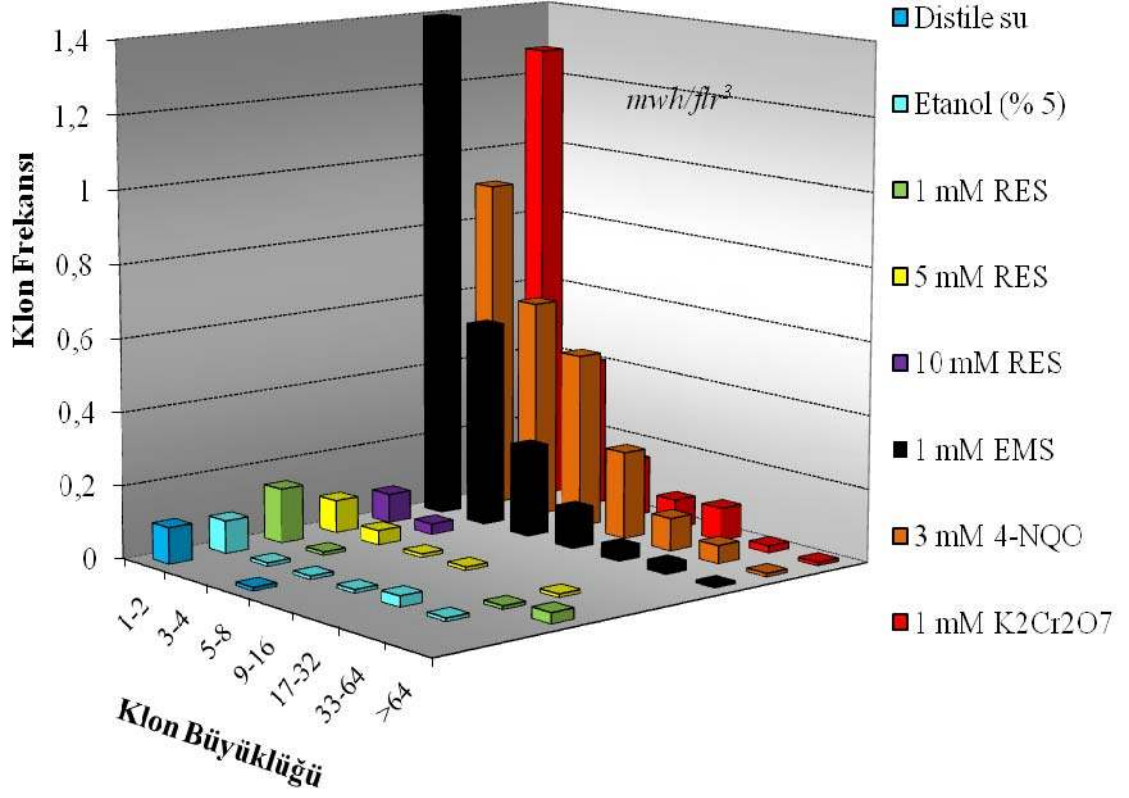
3 mM 4-NQO uygulaması sonucu elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan % 5 etanol uygulamalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel anlamda farkların olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2). 1 mM $K_2Cr_2O_7$ ve 1 mM EMS uygulamaları sonucu elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan distile su uygulamasından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde hem EMS, hem de $K_2Cr_2O_7$ da istatistiksel oranda artış gözlenmiştir. (Çizelge 3.2). 1, 5 ve 10 mM Resveratrol uygulamaları sonucu elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan distile su ile karşılaştırıldığında farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin oksit (4-NQO), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ve Resveratrol (Res) Dozlarının 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) ($m=5$)			İkiz klonlar ($m=5$)			Toplam <i>mwh</i> klonları ($m=2$)			Toplam klonları ($m=2$)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5 hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile su	80	18	(0.23)		1	(0.01)		0	(0.00)		19	(0.24)		19	(0.24)		0.97
Etanol (% 5)	80	7	(0.18)		6	(0.09)		1	(0.01)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
1 mM EMS	80	112	(1.40)	+	81	(1.01)	+	39	(0.49)	+	229	(2.86)	+	234	(2.93)	+	11.7
3 mM 4-NQO	80	73	(0.91)	+	117	(1.46)	+	41	(0.50)	+	219	(2.70)	+	231	(2.89)	+	11.2
1 mM $K_2Cr_2O_7$	90	119	(1.32)	+	69	(0.77)	+	55	(0.61)	+	237	(2.63)	+	243	(2.70)	+	10.8
Resveratrol (mM)																	
1	80	12	(0.15)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	16	(0.20)	-	16	(0.20)	-	0.82
5	80	7	(0.09)	-	6	(0.08)	i	1	(0.01)	i	13	(0.16)	-	14	(0.18)	-	0.67
10	80	6	(0.08)	-	2	(0.03)	i	1	(0.01)	i	9	(0.11)	-	9	(0.11)	-	0.46

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würger 1988) : +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m =çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05

RESVERATROL DOZLARININ 72 ± 4 SAATLİK UYGULAMALARI



Şekil. 3.2. 72 ± 4 saatlik *D. melanogaster* larvalarına distile su, etanol (% 5), Resveratrol dozları (1, 5 ve 10 mM), EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve K₂Cr₂O₇ (1 mM) uygulamalarına ait klon frekans dağılımı

3.2. Etil Metan Sülfonat (EMS), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ve 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Resveratrol 72 ± 4 Saatlik Eş Zamanlı Uygulamaları

72 ± 4 saatlik 3. evre trans-heterozigot larvalara eş zamanlı olarak EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) Resveratrol'ün dozları (1, 5 ve 10 mM) uygulanmıştır.

Resveratrol ve EMS' nin eş zamanlı uygulamalarından elde edilen sonuçlar ile kontrol grubu olan distile su uygulamasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığı gözlenirken sadece 1mM Resveratrol + EMS uygulamasında küçük tek tip klonlarda zayıf pozitif (z) sonuç gözlenmiştir (Çizelge 3.3). Ayrıca hesaplanan inhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde, sadece 1 mM Resveratrol + EMS uygulamasında indüksiyon gözlenirken, 5 ve 10 mM Resveratrol + EMS uygulamalarında doza bağlı inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

Resveratrol ve 4-NQO'un eş zamanlı uygulamalarının sonuçları ile kontrol grubu olan distile su uygulamasının sonuçları tüm klon tipleri açısından değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel anlamda önemsiz olduğu ve sadece 10 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamasında toplam klonlarda zayıf pozitif (z) sonuç gözlenmiştir (Çizelge 3.3). Ayrıca hesaplanan İnhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde, sadece 10 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamasında indüksiyon gözlenirken, 1 ve 5 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamalarında inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

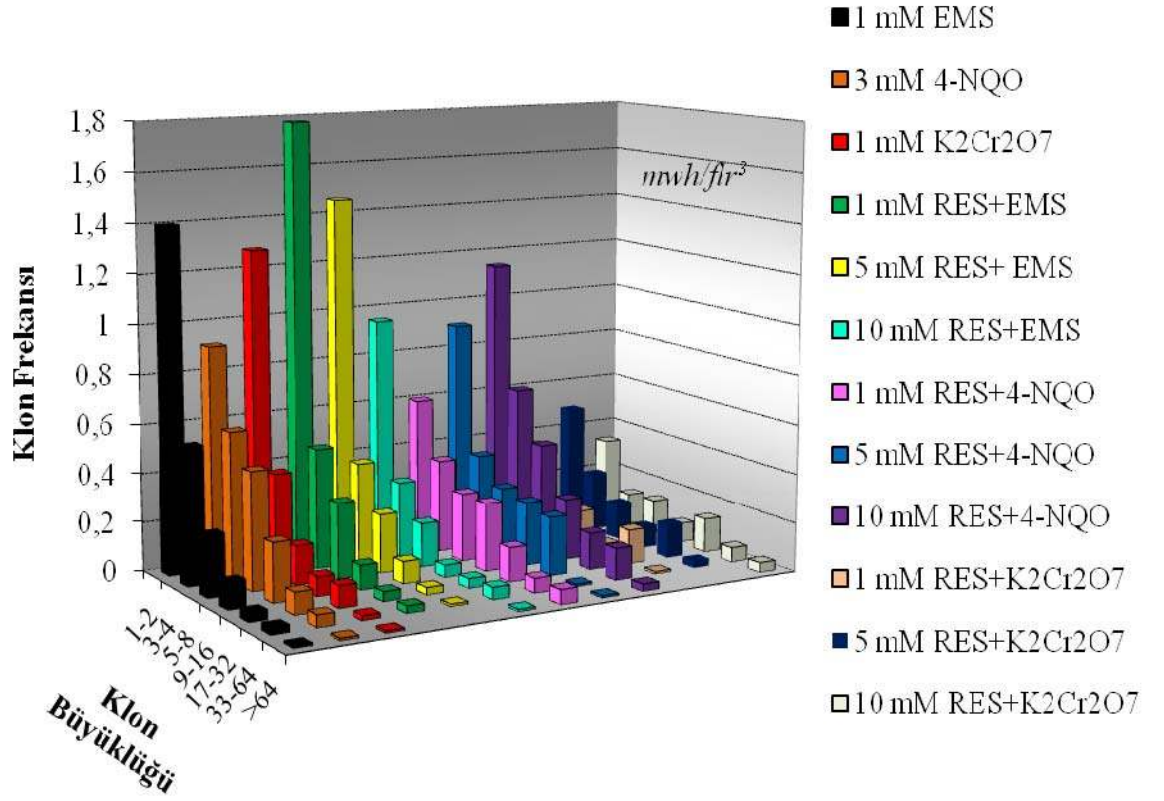
Resveratrol ve $K_2Cr_2O_7$ 'in eş zamanlı uygulamalarının sonucunda elde edilen veriler ve kontrol grubundan elde edilen veriler karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel oranda önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.3). Ayrıca hesaplanan inhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde tüm dozlarda (1, 5 ve 10 mM Res + $K_2Cr_2O_7$) inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Resveratrol (Res) ve Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4- NQO), Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$)' ın 72 ± 4 Saatlik Uygulamaları

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) ($m=5$)			İkiz klonlar ($m=5$)			Toplam <i>mwh</i> klonları ($m=2$)			Toplam klonları ($m=2$)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5 hücre)	İnhibisyon / İndüksiyon (%)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D		
1 mM EMS	80	112	(1.40)	+	81	(1.01)	+	39	(0.49)	+	229	(2.86)	+	234	(2.92)	+	11.73	
3 mM 4-NQO	80	73	(0.91)	+	117	(1.46)	+	41	(0.50)	+	219	(2.70)	+	231	(2.89)	+	11.2	
1 mM $K_2Cr_2O_7$	90	119	(1.32)	+	69	(0.77)	+	55	(0.61)	+	237	(2.63)	+	243	(2.70)	+	10.8	
Res + EMS'nin 72 ± 4 saat eş zamanlı uygulamaları																		
1 mM Res + EMS	80	143	(1.74)	z	77	(0.96)	-	28	(0.35)	-	240	(3.00)	-	248	(3.10)	i	12.30	4.86 ↑
5 mM Res + EMS	80	117	(1.46)	-	62	(0.78)	-	28	(0.35)	-	202	(2.53)	-	207	(2.58)	-	10.35	11.76 ↓
10 mM Res + EMS	80	76	(0.95)	-	51	(0.64)	-	13	(0.16)	-	131	(1.64)	-	140	(1.75)	-	6.71	42.80 ↓
Res + 4-NQO'nin 72 ± 4 saat eş zamanlı uygulamaları																		
1 mM Res + 4- NQO	80	48	(0.60)	-	95	(1.18)	-	44	(0.55)	-	176	(2.20)	-	187	(2.34)	-	9.02	19.46 ↓
5 mM Res + 4- NQO	80	72	(0.90)	-	94	(1.18)	-	41	(0.51)	-	197	(2.46)	-	207	(2.59)	-	10.09	9.91 ↓
10 mM Res + 4- NQO	80	91	(1.14)	-	130	(1.63)	-	59	(0.74)	-	262	(3.28)	-	280	(3.50)	z	13.42	19.82 ↑
Res + $K_2Cr_2O_7$ 'in 72 ± 4 saat eş zamanlı uygulamaları																		
1 mM Res + $K_2Cr_2O_7$	80	28	(0.35)	-	37	(0.46)	-	41	(0.51)	-	104	(1.30)	-	106	(1.33)	-	5.32	50.74 ↓
5 mM Resv + $K_2Cr_2O_7$	80	39	(0.49)	-	51	(0.64)	-	46	(0.58)	-	134	(1.68)	-	136	(1.70)	-	6.86	36.48 ↓
10 mM Res + $K_2Cr_2O_7$	80	26	(0.33)	-	46	(0.58)	-	43	(0.54)	-	112	(1.40)	-	115	(1.44)	-	5.74	46.85 ↓

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würler 1988): +, pozitif; z, zayıf pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m =çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05

RESVERATROL VE MUTAJENLERİN 72 ± 4 SAATLİK UYGULAMALARI



Şekil 3.3. 72 ± 4 saatlik *D. melanogaster* larvalarına eş zamanlı EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM), K₂Cr₂O₇ (1 mM) ve Resveratrol dozlarının (1, 5 ve 10 mM) uygulamalarına ait klon frekans dağılımları

3.3. Resveratrolün 48 ± 4 Saatte Ön Uygulaması ve 72 ± 4 Saatte Etil Metan Sülfonat (EMS), 4-Nitrokinolin Oksit (4-NQO) ve Potasyum Dikromat ($K_2Cr_2O_7$) Uygulamaları

48 ± 4 saatlik 2. evre transheterozigot larvalara ön uygulama olarak Resveratrol dozları (1, 5 ve 10 mM) aynı larvalar 72 ± 4 saatlik olduklarında ise, EMS (1 mM), 4-NQO (3 mM) ve $K_2Cr_2O_7$ (1 mM) uygulanmıştır.

Resveratrol ve EMS'nin ön uygulamalarının sonuçları ile distile su uygulamasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde farkın istatistiksel anlamda önemli olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Ayrıca hesaplanan İnhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde, uygulanan tüm dozlarda (1, 5 ve 10 mM Res + EMS) inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

Resveratrol ve 4-NQO'un ön uygulamalarından elde edilen bireylerin kanat preparatları kontrol grubu olan distile su uygulamasından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında tüm klon tiplerinde istatistiksel anlamda önemli bir fark olmadığı gözlenirken sadece 10 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamasında toplam *mwh* klonları ve toplam klonlarda zayıf pozitif (z) sonuçlar gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Ayrıca hesaplanan inhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde, sadece 10 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamasında indüksiyon gözlenirken, 1 ve 5 mM Resveratrol + 4-NQO uygulamalarında inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

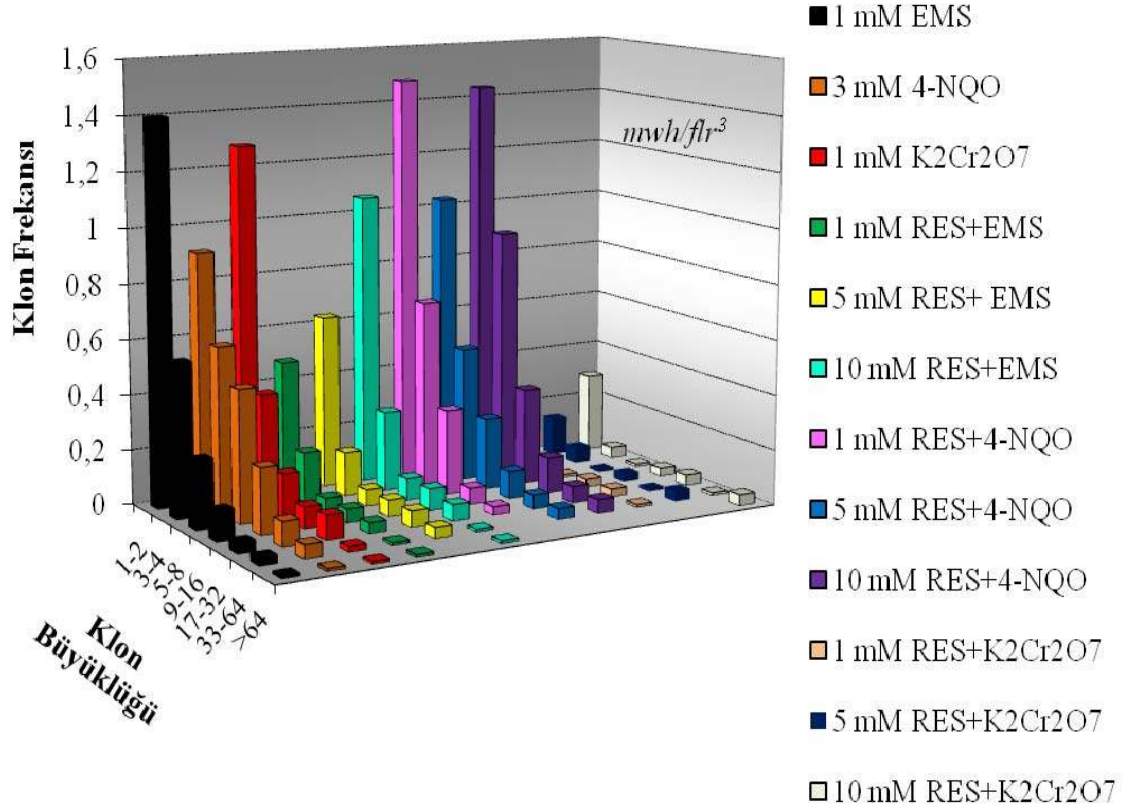
Resveratrol ve $K_2Cr_2O_7$ ön uygulamalarının sonuçları kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Ayrıca hesaplanan inhibisyon/indüksiyon yüzdelerinde tüm dozlarda (1, 5 ve 10 mM Res + $K_2Cr_2O_7$) inhibisyon gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Resveratrol (Res) Dozlarının 48 ± 4 Saatlik Ön Uygulaması ve 72 ± 4 Saatlik EMS, 4-NQO ve $K_2Cr_2O_7$ Uygulamaları

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) ($m=2$)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) ($m=5$)			İkiz klonlar ($m=5$)			Toplam <i>mwh</i> klonları ($m=2$)			Toplam klonları ($m=2$)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5 hücre)	İnhibisyon / İndüksiyon (%)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D		
1 mM EMS	80	112	(1.40)	+	81	(1.01)	+	39	(0.49)	+	229	(2.86)	+	234	(2.92)	+	11.73	
3 mM 4-NQO	80	73	(0.91)	+	117	(1.46)	+	41	(0.50)	+	219	(2.70)	+	231	(2.89)	+	11.2	
1 mM $K_2Cr_2O_7$	90	119	(1.32)	+	69	(0.77)	+	55	(0.61)	+	237	(2.63)	+	243	(2.70)	+	10.8	
48. saat Res + 72 ± 4 saat EMS uygulaması																		
1mM Res + EMS	80	38	(0.48)	-	27	(0.34)	-	10	(0.13)	-	72	(0.90)	-	75	(0.94)	-	3.69	68.54 ↓
5 mM Res + EMS	80	50	(0.63)	-	31	(0.39)	-	19	(0.24)	-	100	(1.25)	-	100	(1.25)	-	5.12	56.35 ↓
10 mM Res + EMS	80	85	(1.06)	-	44	(0.55)	-	12	(0.15)	-	137	(1.71)	-	141	(1.80)	-	7.02	40.15 ↓
48. saat Res + 72 ± 4 saat 4-NQO uygulaması																		
1mM Res + 4-NQO	80	118	(1.48)	+	96	(1.20)	-	39	(0.49)	-	243	(3.03)	i	253	(3.16)	i	12.45	6.14 ↑
5 mM Res + 4-NQO	80	82	(1.03)	-	76	(0.95)	-	18	(0.23)	-	170	(2.13)	-	176	(2.20)	-	8.71	22.23 ↓
10 mM Res + 4-NQO	80	114	(1.43)	+	122	(1.53)	-	44	(0.55)	-	266	(3.33)	z	280	(3.50)	z	13.62	21.61 ↑
48. saat Res + 72 ± 4 saat $K_2Cr_2O_7$ uygulaması																		
1 mM Res + $K_2Cr_2O_7$	80	9	(0.11)	-	9	(0.11)	-	3	(0.04)	-	21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08	90 ↓
5 mM Res + $K_2Cr_2O_7$	80	11	(0.14)	-	12	(0.15)	-	6	(0.08)	-	29	(0.36)	-	29	(0.36)	-	1.49	86.2 ↓
10 mM Res + $K_2Cr_2O_7$	80	13	(0.16)	-	14	(0.18)	-	15	(0.19)	-	40	(0.50)	-	41	(0.51)	-	2.05	81.2 ↓

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würzler 1988): +, pozitif; z, zayıf pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m =çarpım faktörü; olasılık düzeyi=0.05

**48 ± 4 SAATTE RESVERATROL ÖN UYGULAMASI VE 72 ± 4 SAATTE
MUTAJENLERİN UYGULANMASI**



4. TARTIŞMA

Canlılar günlük yaşamlarında ultraviyole (UV), çeşitli kimyasal maddeler, pişirme sonucu açığa çıkan farklı toksikantlar, hava ve su kirliliği gibi etmenlerle pek çok ekzojen kaynaklı maddelere maruz kalmaktadır. Tüm bu ekzojen kaynaklı genotoksik maddelerin dışında organizmanın kendi metabolik faaliyeti sonucunda da çeşitli genotoksik maddeler açığa çıkmaktadır. Bunların başında, oksijenli solunum zincirinde üretilen ROS gelmektedir. ROS başta genetik materyale olmak üzere hücrede pek çok makromolekülde (lipitler, proteinler, enzimler) hasara neden olabilmektedir. Genetik materyalin hasar görmesi sonucunda, çeşitli mutasyonlar, hücre döngüsü kontrolünün bozulmasını takiben kontrolsüz hücre bölünmesiyle kanserleşme ve bunların yanı sıra hücre ölümü gerçekleşebilir. Genetik materyal sadece ekzojen ve endojen kaynaklı genotoksik bileşiklere maruz kalarak hasar görmez, bunun yanı sıra genetik materyal kendini kopyalarken de spontan olarak replikasyon hataları meydana gelebilir. Genetik materyalin hasar görmeden kalması organizmanın yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmesi ve hayatta kalabilmesi için elzemdir. Bu sebepten ötürü organizmanın savunma ve tamir mekanizmaları genetik materyalin korunmasını sağlar. Organizmanın endojen savunma mekanizmalarının yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar dışarıdan beslenme yoluyla alınan bazı koruyucu maddelerin genotoksik hasarın önlenmesinde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dışarıdan alınan gıda kaynaklı koruyucu maddelerin başında ROS'un sebep olduğu oksidatif hasara karşı önemli rolü olan gıda antioksidanları gelmektedir. Diyetle bulunan bitki polifenollerinin de hücrenin antioksidan enzimlerin ifadenmesinde düzenleyici etkileri olduğu bilinmektedir (Sayın vd 2008).

Polifenoller; flavanoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, liganslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir. Resveratrol stilbenlerin alt grubu olan ve üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (Li vd 2006). Resveratrol'un antioksidan (Lee vd 1998), anti-karsinojen (Kundu vd 2008), trombosit kümeleşmesini inhibe ederek kalp koruyucu (Markus ve Morris 2008) etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir. Resveratrol'un kalp koruyucu etkisinin pek çok yolla olduğu bilinmektedir. Üzüm ya da şarap ekstraktı, damar duvarında 3',5'-monofosfat (cGMP)

miktarını arttırır, hem relaksasyon hem de cGMP’de artış NG-monometil-L-arjinin ya da NG-nitro-L-arjinin (endotelyuma bağılı gevşetici faktörün sentezinin kompetitif inhibitörü) tarafından ters çevrilir. Üzümdeki ürünler tarafından indüklenen vazorelaksasyona NO-cGMP yolu aracılık eder. Vazorelaksasyonda nitrik oksit (NO)’in doğrudan rolü Resveratrol ile muame edilen pulmoner arter endotel hücre kültüründe nitrik oksit sentaz (NOS) etkinliğinde artış bulunduğunda gösterilmiştir. Resveratrol’ün NOS üretimini etkileyerek kalp koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Das ve Maulik 2006). Ayrıca Resveratrol’ün kalp koruyucu etkilerine miyokardiyumdaki katalaz etkinliğini artırma yeteneği de eklenmektedir. Resveratrol *in vivo* antioksidan olarak fonksiyon görür, kalpte peroksil radikalini yakalayabilir ve bu yolla iskemi-reperfüzyon hasarından kalbi korur (Moskaug vd 2005). Brito vd (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise, sıgır aortik endotel hücresinde peroksinitritin aracılık ettiği endotel hücre toksisitesinde Resveratrol’ün etkisini hücre canlılığı, okside ve redükte glutasyon düzeyi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrol’ün peroksinitritin indüklediği oksidatif strese karşı hücre içi indirgenmiş glutasyon (GSH) düzeyini arttırarak kalp koruyucu etki sağladığını gösterilmiştir. Glutasyonun hücre yaşamındaki önemi dikkate alındığında, Resveratrol antioksidan özelliği ile kardiyovasküler sistemi koruyucu etkisine yeni bir yaklaşım sağlamak ve yeni tedavi stratejilerinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. (Sayın vd 2008). Sener vd ise (2006) Wistar albino sıçanlarda Resveratrol’ün iskemi-reperfüzyon hasarına karşı renal dokuyu koruyucu etkisini radikalleri yakalama ve antioksidan etkinliği ile gerçekleştirdiğini, GSH düzeyinin korunmasını sağlayarak renal dokuyu oksidatif strese karşı koruduğunu göstermişlerdir.

Resveratrol’ün pek çok biyolojik etkisi olduğu biliniyor, bunlardan bazıları düşük densiteli lipoprotein (LDL) kolesterolün oksidasyonunun inhibisyonu, trombosit kümeleşmesinin ve koagülasyonun engellenmesidir (Frankel vd 1993, Bertelli vd 1995, Pace-Asciak vd 1995).

Resveratrol, kimyasal karsinogenlerin tümör başlatıcı, ilerletici ve teşvik edici üç basamağını engellediği için kanser engelleyici ajan olarak kabul edilmektedir (Jang vd 1997) Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre kanser engelleyici ajanlar, insan tümör hücrelerinde apoptosisi başlatabilir (Fesus vd 1995, Samaha vd 1997). Resveratrol de insan tümör hücrelerinde apoptosisi başlatabilir (Clement vd 1998, Surh vd 1999).

Resveratrol'un de içinde bulunduğu bitki polifenollerinin çoğu, pro-oksidan olmalarının yanında antioksidan özelliğe sahiptirler (Inoue vd 1994, Ahmad vd 1992) bitki polifenollerinin pro-oksidan etkileri onların anti kanser özelliklerinin ve apoptosis başlatıcı özelliklerinin önemli bir mekanizmasını oluşturabilir (Hadi vd 2000, 2007). Resveratrol'un karsinogenesis mekanizmasının kinazlar, siklooksijenazlar, ribonükleotid redüktazlar ve DNA polimerazlar gibi pek çok hedef molekülü inhibe edici basamaklarından kaynaklandığı düşünülüyor (Saiko vd 2008).

Resveratrol'un özelliklerinden biri olan antioksidan etkisi üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlar;

1- Koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. 2- Mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, 3- Fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur (Sayın vd 2008). Resveratrol *in vitro* koşullarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olsa da *in vivo* olarak güçlü bir antioksidan işlevi görür. Resveratrol'un *in vivo* antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini arttırma yeteneği ile kuvvetlenmektedir. Bu bağlamda *in vivo* antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksiti yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (de la Lastra ve Villegas 2007). Resveratrol'un antioksidan mekanizmasını açıklamak için pek çok mekanizma önerilmiştir, bunlardan biri, nikotinamid-adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve adenosin 5'-difosfat (ADP)-Fe⁺-lipit peroksidasyonunun ve UV'nin indüklediği lipit peroksidasyonunun güçlü bir inhibitörü olması ve etkili bir radikal süpürücü olmasıdır (Miura vd 2000). Bunlar dışında Resveratrol'un bilinen en önemli özelliklerinden biri NAD⁺-bağımlı histon deasetilazlar sınıfından sirtuinleri aktive edebilme yeteneğidir (Chen vd 2009, Yu vd 2009). Sirtuin sınıfı enzimlerin memelilerde pek çok üyesi vardır-SIRT1 den SIRT7'ye kadar. SIRTUİN1, kalori kısıtlaması ve Resveratrol ile aktive olarak sağlıklı yaşamı ve ömür uzunluğunu yönlendirdiği gibi DNA tamiri, hücre canlılığı, glukoneogenez, hücre döngüsünün kontrolü, yağ asidi metabolizması ve insülin hassasiyeti gibi pek çok temel yolakla ilişkisi olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Baur ve Sinclair 2006, Jiang 2008, Brooks ve Gu 2009). Sgambato vd

(2001) yaptığı bir çalışmada sigara dumanında bulunan TAR ve H₂O₂ gibi ajanlara maruziyetin arttırdığı ROS'un engellenmesinde Resveratrol'un etkili olduğu gözlenmiştir. Resveratrol'un KOMET yöntemi ile yapılan bu çalışmada nükleer DNA fragmentasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Lee vd'nin (1998) yaptığı bir çalışmada Resveratrol'un HL-60 hücrelerinde TPA'nın (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13- acetate) indüklediği serbest radikal oluşumlarını inhibe ettiği gözlenmiştir. Yine başka bir çalışmada ise, Resveratrol'un lipopolisakkarit ya da forbol esterleri tarafından stimüle edilen ve makrofajlar tarafından üretilen süperoksit radikali ile hidrojen peroksit oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir (Martinez ve Moreno 2000). Yan vd'nin (2011a) *in vitro* yaptığı bir çalışmada etanol maruziyeti ile insan periferik lenfositlerinde oksidatif DNA hasarı gözlenmiştir. [•]OH radikali spesifik bir etanol metabolitidir. Etanol lenfositlerde alkol dehidrogenaz 1B (ADH1B) ve asetaldehit dehidrogenaz 2 (ALDH2) enzimleri ile parçalanır (Yan vd 2011b). Parçalanma sırasında bir molekül etanolden oluşan iki [•]OH radikali DNA zincirlerini etkileyerek DNA hasarına sebep olur (Stickel vd 2002). Bununla beraber DNA hasarı baz kesip-çıkarma tamir (BER) yoluyla ile insan lenfositlerinde kendiliğinden tamir edilebilir (Yan vd 2011b). Birincil olarak Resveratrol'un güçlü bir [•]OH radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu, ikincil olarak ise, tek başına veya etanol uygulamasından önce muamele edildiğinde ADH1B mRNA inhibisyonunu fakat ALDH2 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Çünkü etanol bu enzimler ile metabolize edilmektedir, Resveratrol'un bu etkisi ise [•]OH radikalini ve asetaldehit oluşumunu azaltması ile asetaldehitten asetik asite metabolizasyonunu arttırmasıyla ilişkili olarak DNA tamir yolağında BER sistemine ait enzimleri ve ilgili gen ekspresyonunu arttırarak transkripsiyonel ve protein seviyesinde etki ettiği gözlenmiştir (Yan vd 2011a). Yapılan diğer çalışmalarda Cu (II) varlığında polifenolik Resveratrol'un DNA zincir kırıklarına sebep olduğu gözlenmiştir (Fukuhara ve Miyata 1998). KOMET yöntemi ile insan periferik kanından izole edilen lenfositlerde Resveratrol-Cu(II) sisteminin DNA hasarına sebep olduğu doğrulanmıştır (Ahmad vd 2000). Azmi vd'e (2005) göre, bitki polifenollerinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri endojen bakır mobilizasyonuna ve pro-oksidan aktivasyonlarına bağlıdır. Yine bu bağlamda De Salvia vd'nin (2002) Chinese Hamster Ovaryum (CHO) hücreleri kullanarak yaptığı bir çalışmada H₂O₂'in indüklediği hasara karşı Resveratrol'un hem antioksidan hem de pro-oksidan özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir.

Endüstrinin hızla gelişmesi ve yaşam standartlarının yükselmesine paralel olarak, metallerin kullanım alanları da giderek artmaktadır. İnsanın endüstriyel aktivitesi sonucunda çevredeki metal kirlenmesi artmakta ve metal toksisitesi önemli çevresel ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Bayçu 2002). Kromium bileşikleri doğada Cr (III) ve Cr (VI) olmak üzere iki farklı şekilde bulunan ağır metal bileşikleridir (Patlolla vd 2009). Ticari olarak endüstride cila, deri tabakalama gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan kromium bileşikleri çevresel sistemleri kirletir (Norseth 1981, Cohen vd 1993, Wang vd 2006). Bu alanlarda yaygın olarak kullanılan heksavalan kromium Cr (VI) bileşikleri, insanlarda ve hayvanlarda ciddi toksik, karsinogenik ve mutajenik etkiler ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. DNA ROS tarafından atağa uğrayan hedef moleküllerden biridir, Cr bileşikleri de DNA ile etkileşime girerek DNA tek zincir kırıklarına, DNA-protein çapraz bağlanmalarına ve oksidatif DNA baz mutasyonlarına sebep olur (Weinberg 1989, Aiyar vd 1991, Singh vd 1998). Ayrıca Cr (VI)'nın biyolojik sistemlerde Cr (V) ve Cr (IV)'e indirgenmesi sırasında, moleküler oksijenin süperoksit anyonu meydana getirdiği ve dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksitin (H_2O_2) ise Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Shi ve Dalal 1992, Shi vd 1999, Liu ve Shi 2001). DNA oksidasyonu sonucu deoksiriboz bazlarının dördü de hasar görebilir, bunlardan en yaygını ve en kolay ölçülebileni 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) 'dir. 8-OH-dG karsinogenesinin ortaya çıkarılmasında kullanılan anahtar bir belirteçtir, çünkü DNA'da 8-OH-dG oluşumu replikasyon sırasında G-T transversiyonuna sebep olur (Cheng vd 1996). Burkhardt vd'nin (2001) Kalf timus DNA'si ile yaptığı bir çalışmada Cr (III)'ün H_2O_2 varlığında, fenton tipi reaksiyonla H_2O_2 'i sitotoksik $\cdot OH$ radikale çevirerek sebep olduğu oksidatif hasar sonucu DNA'da meydana gelen 8-OH-dG oluşumunu Resveratrol'ün $\cdot OH$ süpürücü etkisi ile azalttığı gözlenmiştir. $K_2Cr_2O_7$ 'in *Drosophila*'da genotoksik olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Amrani vd 1999). Ayrıca kültüre edilmiş insan hücreleri, fareler, Chinese hamsterları, rat ve guinea domuzu hücreleri ve bitkiler gibi pek çok sistemde $K_2Cr_2O_7$ 'in mutajenik etkisi kaydedilmiştir (De Flora vd 1990) Cr (III)'ün karsinogenik mekanizması H_2O_2 varlığında Fenton tipi reaksiyonlarla $\cdot OH$ üretilmesiyle ilişkilidir, örneğin, $Cr(III) + H_2O_2 \rightarrow Cr(IV) + \cdot OH + OH^-$ (Tsou vd 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan $\cdot OH$ radikalinin hedefi DNA molekülüdür ve sonuçta oksidatif DNA hasarı meydana gelir ve 8-OH-dG oluşumu

açığa çıkar (Chatgılıaloglu ve O’neill 2001). Lo’pez-Burillo vd’nin (2003) yaptığı Resveratrol düşük konsantrasyonlarda pro-oksidan özellik gösterirken, daha yüksek dozlarda H_2O_2 varlığında Cr (III)’ün indüklediği 8-OH-dG oluşumunu doza bağlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmanın bir diğer uygulamasında ise, antioksidan özelliğe sahip Melatonin ve Resveratrol kombine edilerek uygulandığında, Resveratrol’ün düşük dozlarının indüklediği pro-oksidan DNA hasarının Melatonin tarafından engellendiği gözlenmiştir. Resveratrol diğer antioksidanların (örneğin C vitamini, glutasyon gibi) varlığında pro-oksidan özelliğini kaybederek antioksidan özellik gösterir (Burkitt ve Duncan 2000). Bizim yaptığımız çalışmada da, oksidatif hasara sebep olduğu bilinen $K_2Cr_2O_7$ ’ın Reseveratrol ile hem ön uygulamalı hem de eş zamanlı uygulamalarında $K_2Cr_2O_7$ ’ın genotoksik etkisine karşı Resveratrol’ün uygulanan tüm dozlarda (1, 5 ve 10 mM) antigenotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde, Resveratrol’ün çeşitli mekanizmalar ile güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür, buna istinaden bizim yaptığımız bu çalışmada oksidatif hasara sebep olarak genotoksisiteye yol açan $K_2Cr_2O_7$ ’ın indüklediği hasara karşı Resveratrol’ün güçlü şekilde koruma gösterdiği hem eş zamanlı hem de ön uygulamalarda gözlenmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışma da Burkhardt vd’nin (2001) yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Çalışmalarımızın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, Resveratrol’ün ön uygulamalarının $K_2Cr_2O_7$ ’ın indüklediği hasara karşı koruyucu etkisinin eş zamanlı uygulamalara nispeten çok daha fazla olduğu ve bunun da Resveratrol’ün bazı moleküler savunma mekanizmalarını aktive etmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

4- NQO UV’nin etkisini taklit eden direk mutajen bir ajandır (Le Cruix vd 1993). 4-NQO DNA’da UV benzeri kompleksler oluşturmalarının yanı sıra ‘OH radikal benzeri türler aracılığı ile oksidatif hasara da sebep olmaktadır (Synderwine ve Bohr 1992, Nunoshiba ve Demple 1993, Yano vd 1995, Olive ve Johnston 1997). Potansiyel mutajen ve karsinojen olduğu bilinen 4-NQO akciğer, pankreas ve mide tümörlerini indüklediği Sugimura (1981) tarafından belirtilmiştir. Ponzanelli vd’nin (1996) yapmış olduğu bir çalışmada, 4-NQO ‘ın kardeş kromotid frekansını arttığı, yine 4-NQO uygulamasının ardından mitotik indeksin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Kaya

vd'nin (2002) SMART uygulaması ile yapmış olduğu bir çalışmada, askorbik asit'in 4-NQO 'in sebep olduğu genotoksik hasara karşı koruyucu olmadığı, bunun yanı sıra, yine aynı çalışmada $K_2Cr_2O_7$ 'nin aracılık ettiği genotoksik hasara karşı askorbik asit'in koruyucu özelliği gösterilmiştir. Langova vd'nin (2005) Mikronükleus ve Ames bakteriyel mutajenite testlerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, Resveratrol'ün indirek mutajenler AFB1 ile IQ ve direk mutajen MNU'e karşı antimutajenik etkisi araştırılmıştır. Mikronükleus testinde Resveratrol'ün üç mutajene karşı da koruyucu etkisi gözlenmiştir. Ames testinde ise, indirek mutajenler olan AFB1 ve IQ'a karşı antimutajenik etkisi gözlenirken, direk mutajen MNU'e karşı antimutajenik etkisi olmadığı gözlenmiştir. Uenobe vd'nin (1997) Ames bakteriyel mutajenite testinde *Salmonella typhimurium* TA98 kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise, Resveratrol'ün 4-NQO'un indüklediği mutasyona karşı koruyucu olmadığı gözlenmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise, Resveratrol ön uygulaması ve 4-NQO uygulamasının sonucunda, toplam klon sayılarına göre yapılan hesaplamada Resveratrol'ün iki dozunda (1 ve 10 mM) 4-NQO 'un oluşturduğu toplam klon sayılarında indüksiyon gözlenirken bir dozunda (5 mM) ise inhibisyon gözlenmiştir. Eş zamanlı Resveratrol ve 4-NQO uygulamasında ise, Resveratrol'ün iki dozunda (1 ve 5 mM) toplam klon sayılarında indüksiyon, bir dozunda (10 mM) inhibisyon gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, Resveratrol'ün 4-NQO 'in neden olduğu kompleks hasarların ortadan kaldırılmasında açıkça etkili olmadığı gözlenmiştir, çünkü 4-NQO hem oksidatif yolla hasara neden olurken hem de UV etkisini taklit ederek genotoksisiteye neden olmaktadır, bizim $K_2Cr_2O_7$ yaptığımız çalışmada ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan pek çok çalışmada (Martinez ve Moreno 2000, Sgambato vd 2001) Resveratrol oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermiştir fakat 4-NQO oksidatif hasara neden olmasının yanında farklı yollarla da hasara sebep olduğu için Resveratrol'ün bu kimyasalın etkisine karşı koruyucu olmadığı Uenobe vd'i (1997) tarafından da belirtilmiştir.

Alkilleyici ajanlar, alkil gruplarını etkileyerek veya yanlış baz eşleşmesi ile DNA'da guaninle beraber etki gösterirler (Bronstein vd 1991). Etil Metan Sülfonat (EMS) pek çok genotoksisite testinde yaygın olarak kullanılan bir alkilleyici ajandır. Alkilasyon, alkilleyici ajanın fiziko-kimyasal özelliklerine göre nükleotid bazlarının çeşitli bölgelerinde meydana gelebilir. EMS'nin hedef bölgeleri genellikle nükleofilik

merkezlerdir örneğin, guaninin N⁷ atomu, adeninin N³ atomu daha az yaygın olarak da guaninin O⁶ ve timinin O² atomları (Gocke vd 2009). Mutajenik potansiyele sahip genotoksik ajanların DNA lezyonlarına; a) replikasyon sırasında yanlış baz eşleşmesi, b) kromozomal bozukluğa sebep olan değişik etkiler c) farklı tamir yollarını değiştirerek (hata-tamir) sebep olduğu düşünülmektedir. EMS maruziyetinden sonra en yaygın mutasyon, replikasyon sırasında O⁶-etilguaninin Timin ile yanlış eşleşmesiyle meydana gelen GC-AT mutasyonudur. Kromozomal bozukluğa ise yaygın olarak alkillenmiş N atomunun sebep olduğu düşünülmektedir (Jansen vd 1995, Op het Veld vd 1997, Doak vd 2007). EMS'nin indüklediği gen mutasyonları ve kromozomal bozukluklar pek çok *in vitro* ve *in vivo* test sisteminde çalışılmıştır. EMS'nin virüs/faj, bakteri, mantar, bitki, böcek ve memeli hücrelerinde genotoksik etkiyi indüklediği çalışmalar Segal (1984) tarafından derlenmiştir. Demir vd'nin (2008) SMART yöntemiyle yapmış olduğu çalışmada EMS' nin genotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Demir vd'nin (2009) SMART yöntemiyle yapmış olduğu bir çalışmada, turunc kabuğu yağının EMS'nin neden olduğu genotoksik hasara karşı antigenotoksik etkisinin olduğu gözlenmiştir. Alkilleyici ajanların neden olduğu hasara karşı Resveratrol'ün koruyucu etkisine dair çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir. Resveratrol ile EMS eş zamanlı olarak uygulandığında, toplam klon sayılarına göre yapılan hesaplamada Resveratrol'ün bir dozunda (1 mM) toplam klon frekansında çok düşük bir oranda indüksiyon, diğer iki dozunda ise (5 ve 10 mM) inhibisyon gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Resveratrol'ün ön uygulamasının ardından EMS uygulamasıyla elde edilen sonuçlarda ise, uygulanan Resveratrol dozlarının tümünde (1, 5 ve 10 mM) toplam klon sayılarında inhibisyon gözlenmiştir. Eş zamanlı uygulamalardan 1mM Resveratrol dozunda gözlenen indüksiyon oranının oldukça düşük olması (% 4.86) bu sonucun biyolojik bireysel farklılıklardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Yaptığımız çalışmanın sonuçları Chakraborty vd (2004) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyum göstermektedir şöyle ki yapılan çalışmada da bir alkilleyici ajan olan ve EMS ile benzer şekilde genotoksik etkiye neden olan MNNG'nin oluşturduğu hasarın Resveratrol tarafından azaltıldığı gözlenmiştir. Yine bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Uenobe vd (1997) tarafından Ames testi kullanılarak yapılan bir çalışmada MNNG'nin neden olduğu mutajenite, etken maddesi Resveratrol olan bir bitki ekstraktı tarafından azaltılmıştır. Fakat Langova vd (2005) tarafından

yapılan çalışmaların sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, bir alkilliyici ajan olan MNU'nin indüklediği hasar Mikronükleus testinde Resveratrol tarafından azaltılırken, Ames testinde Resveratrol'ün herhangi bir koruma sağlamadığı belirtilmiştir. Bu da mutajen kimyasal aynı olsa dahi farklı test sistemlerinin farklı prensiplerle, farklı hasarlara neden olmasından kaynaklanmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmanın ön uygulamalı ve eş zamanlı uygulamalarının sonuçları karşılaştırıldığında, ön uygulamanın EMS'nin neden olduğu hasara karşı koruyucu etkisinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun da Resveratrol'ün ön uygulamalar ile bazı savunma sistemlerini uyatarak daha fazla koruma sağladığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada Resveratrol'ün Potasyum Dikromat'ın indüklediği genetik hasara karşı gösterdiği koruyucu etki mekanizmasının, Resveratrol'ün antioksidan etkilerinden kaynaklandığı düşünülmekle birlikte, koruma mekanizması hakkında daha net bilgiler elde etmek için ek çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Resveratrol'ün Potasyum Dikromat ve EMS'nin kimyasal yapısına etki ederek mi yoksa hücresel bazı sistemleri aktif hale getirerek mi koruma sağladığının araştırılması gerekmektedir. Potasyum Dikromat için Resveratrol'ün anti oksidan etkisini göstermesi için çok sayıda grup bulunurken EMS'ye karşı koruyucu etkisini muhtemelen tamir sistemlerini harekete geçirerek sağlamaktadır. Özellikle Potasyum Dikromat'ın oluşturduğu oksidatif hasara gerek ön uygulama ve gerekse eş zamanlı uygulamalarda etkili sonuçların ortaya çıkışı Resveratrol'ün güçlü antioksidan etkisiyle ilişkili olabilir. Ancak olası farklı koruyucu yolları aktive edip etmediğinin de araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen sonuçların mekanizmalarında ortaya konması bakımından farklı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ

Resveratrol üzüm, şarap ve yer fıstığında bulunan polifenolik bir bileşiktir. Resveratrol'ün antioksidan etkisi başta olmak üzere sağlık açısından pek çok faydası vardır. Bu çalışmada Resveratrol'ün değişik yollarla genotoksik hasara neden olan üç kimyasala (EMS, 4-NQO ve $K_2Cr_2O_7$) karşı antigenotoksik etkisi iki gen çifti bakımından transheterozigot olan *D. melanogaster* larvalarında ayrı ayrı ön uygulamalar ve eş zamanlı uygulamalar ile araştırılmıştır.

Resveratrol dozlarının (1, 5 ve 10 mM) tek başına 48 ± 4 ve 72 ± 4 saatlik larvalara uygulanmasıyla elde edilen sonuçlara göre, Resveratrol'ün çalışılan hiçbir dozunda genotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Larvalara Resveratrol'ün 48 ± 4 saatlik ön uygulamasını takiben 72 ± 4 saatlik olduklarında mutajen kimyasalların (EMS, 4- NQO ve $K_2Cr_2O_7$) uygulanmasıyla elde edilen sonuçlara bakıldığında, bir alkilleyici ajan olan EMS'nin ve oksidatif hasara sebep olan $K_2Cr_2O_7$ 'ın indüklediği genotoksisiteye karşı Resveratrol'ün tüm dozlarında antigenotoksik etki gözlenmiştir. Bu kimyasallardan Resveratrol'ün $K_2Cr_2O_7$ 'ın genotoksisitesine karşı antigenotoksik etkisinin çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bir diğer genotoksik ajan olan 4-NQO'nın indüklediği hasara karşı, Resveratrol'ün bazı dozlarının (1 ve 10 mM) toplam klon sayısı yüzdelelerini indüklediği, bir dozunun (5 mM) ise inhibe ettiği gözlenmiştir.

Resveratrol'ün 72 ± 4 saatlik eş zamanlı Resveratrol ve kimyasal uygulamalarından elde edilen sonuçlara göre, Resveratrol'ün iki dozunun (5 ve 10 mM) EMS'nin indüklediği genotoksik hasarı inhibe ettiği, bir dozunun (1 mM) ise çok düşük bir oranda indüklediği gözlenmiştir. Yine, 4-NQO'nın neden olduğu genotoksik hasara karşı Resveratrol'ün iki dozunun (1 ve 5 mM) toplam klon frekans yüzdelelerini inhibe ettiği, bir dozunun (10 mM) ise indüklediği gözlenmiştir. Tıpkı ön uygulamanın sonuçları gibi, eş zamanlı uygulamanın sonuçları da $K_2Cr_2O_7$ 'ın sebep olduğu hasara karşı Resveratrol'ün tüm dozlarında açık bir antigenotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa, Resveratrol'ün $K_2Cr_2O_7$ 'ın sebep olduğu genotoksisiteye karşı açık bir biçimde antigenotoksik etkisi olduğu

gözlenmiştir. Bu antigenotoksik etkinin Resveratrol'ün gıdalarla alınan bir antioksidan olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir, çünkü $K_2Cr_2O_7$ oksidatif hasara sebep olarak genotoksik etki göstermektedir. Antioksidanlar da oksidatif hasara karşı çeşitli mekanizmalarla organizmanın genetik materyalini korumaktadır. Çalışmamızda uyguladığımız bir diğer mutajen ise bir alkilleyici ajan olan EMS'dir. Resveratrol'ün EMS'nin indüklediği hasara karşı sadece bir tek doz hariç koruyucu olduğu gözlenmiştir. 4-NQO'nun oluşturduğu hasara karşı ise, Resveratrol dozlarının bazıları inhibisyona, bazıları da indüksiyona sebep olmaktadır, bu sonuçları ve literatürdeki çalışmaların sonuçları karşılaştırılacak olursa, Resveratrol'un 4-NQO'nun indüklediği hasara karşı koruyucu olduğunu söylemek uygun değildir. Başka araştırmacılar tarafından yapılan bir mutajenite testinde Resveratrol'ün 4-NQO'a karşı koruma sağlamadığı gözlenmiştir. Bu mutajen bir yandan UV benzeri kompleks lezyonlar ile hasar meydana getirirken, bir yandan da oksidatif hasar yoluyla genotoksisiteyi indüklemektedir, dolayısıyla Resveratrol sadece oksidatif hasar yoluyla genotoksisiteye neden olan $K_2Cr_2O_7$ 'in hasarına karşı koruma sağlarken, 4-NQO'nun çeşitli yollarla meydana getirdiği hasarı engellemek konusunda yetersiz kalmış olabilir.

Bu çalışmada kullanılan Resveratrol'ün *D. melanogaster*'de antigenotoksik özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla ilgili çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu bağlamda bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in genetik yapı olarak insana büyük oranda benzerlik göstermesi, ökaryotik bir organizma olması ve yapılan çalışmanın da *in vivo* koşullarda yapılmış olması bulgular açısından önemlidir. Bu test yardımı ile ayrılma (non-disjunction), kromozomdan parça kopması (delesyon), kromozomun bir parçasının yer değiştirmesi (translokasyon) ve rekombinasyon gibi birçok genetik hasar belirlenebilmektedir. Çeşitli maddelerin ve karışımların antigenotoksisitesinin değerlendirilmesi için kullanılan SMART'ın *in vivo* bir test olması çeşitli yollarla genotoksik hasara neden mutajenlere karşı Resveratrol'ün koruyucu etkisinin olup olmadığının gözlenmesi ve koruyucu etkisi varsa hangi mekanizmayla bunu gerçekleştirdiğinin gözlenmesi bakımından, büyük öneme sahiptir. Bu tür çalışmaların toplum sağlığını doğrudan ilgilendirmesi nedeniyle daha farklı testlerle değerlendirilmesi gereği vardır.

Sonuç olarak, Resveratrol'ün bazı mutajenlere karşı antigenotoksik etkisi olabileceği dikkate alınarak beslenme alışkanlarının değiştirilmesi ile toplum sağlığının korunmaya çalışılması gerekmektedir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar temel bilgi birikimi sağlayarak beslenme alışkanlıklarımızı olumlu yönde değiştirmemize olanak sağlayabilir. Buna ek olarak elde edilen sonuçların bu çalışmada Resveratrol'ün antigenotoksisite verilerine katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Ancak Resveratrol'ün antigenotoksisitesinin moleküler mekanizmalarının açıklanabilmesi için farklı test sistemleri (*in vivo* ve *in vitro*) ve farklı model organizmalar kullanılarak daha fazla bilimsel çalışmanın yapılması da gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ABRAHAM, S.K., 1994. Antigenotoxicity of coffee in the drosophila assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*, 9(4): 383-386.
- AHMAD, M.S., FAZAL, S., RAHMAN, A., HADI, S.M. and PARISH, J.H.1992. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): correlation with the generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, 13: 605-8.
- AHMAD, A., ASAD, S.F., SINGH, S. and HADI, S.M. 2000. DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Letters*, 154: 29-37.
- AIYAR, J., BERKOVITS, H.J., FLOYD, R.A. and WETTERHAHN K.E. 1991. Reaction of chromium (VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environmental Health Perspective*, 92: 53-62.
- AMRANI, S., RIZKI, M., CREUS, A. and MARCOS, R. 1999. Genotoxic activity of different chromium compounds in larval cells of *Drosophila melanogaster*, as measured by the wing spot test. *Enviromental Moecular Mutagenesis*, 34: 47-51.
- ASHBURNER, A. 1989. *Drosophila: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1331 pp. New York.
- AZMI A.S., HUSSAIN BHAT, S.H. and HADI, S.M. 2005. Resveratrol–Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implications for anticancer properties. *Febs Letters*, 579: 3131-3135.
- BAUR, J.A and SINCLAIR, D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5: 493-506.
- BAYÇU, G. 2002. Phytochelatin biosynthesis and cadmium detoxification. *Journal of Molecular Cell Biology*. 1: 45-55.
- BERTELLI, A.A.E., GIOVANNINI, L., GIANNESSI, D., MIGLIORI, M., BERNINI, W., FREGONI, M. and BERTELLI, A. 1995. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*, 17: 1-3.
- BRONSTEIN, S.M., COCHRANE, J.E., CRAFT, T.R. and SWENBERG, J.A., Skopek ,T.R. 1991. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-Nnitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Research*, 51: 5188-5197.
- BROOKS, C.L. and GU, W. 2009. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nature Reviews Cancer*, 9: 123-128.

- BRITO, P.M., MARIANO, A., ALMEDA, L.M. and DINIS T.C.P. 2006 Resveratrol affords protection against peroxynitrite- mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chemico-biological Interactions*, 164: 157-166.
- BRONSTEIN S.M., COCHRANE J.E., CRAFT T.R., SWENBERG J.A. and SKOPEK ,T. R. 1991. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-Nnitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Research*, 51: 5188-5197.
- BURKHARDT, S., REITER, R. J., TAN D.X., HARDELAND, R., CABRERA, J. and KARBOWNIK, M. 2001. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33: 775-783.
- BURKITT, M.J. and DUNCAN, J. 2000. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: Evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381(2): 253-263.
- CEMELI, E., BAUMGARTNER, A. and ANDERSON, D., 2009 Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 681: 51-67.
- CHATGILIALOGLU, C. and O'NEILL, P. 2001. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental Gerontology*, 36: 1459-1471.
- CHEN, C.J., YU, W. and FU, Y.C. 2009. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378: 389-393.
- CHENG, K.C., CHAHILL, D.S., KASAI H., NISHIMURA, S. and LOEB, L.A. 1996. 8 hydroxydeoxyguanosine, an abundant from of oxidative DNA damage, causes G_T and A_C substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 166-172.
- CHUN, Y.J., KIM, M.Y. and GUENGERICH, F.P., 1999. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262: 20-24.
- CHAKRABORTY, S., ROY, M. and BHATTACHARYA, R.K. 2004. Prevention and repair of DNA damage by selected phytochemicals as measured by single cell gel electrophoresis. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, 23: 215-226.
- CIOLINO, H.P. and YEY, G.C. 1999. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Molecular Pharmacology*, 56: 784-790.

- CLEMENT, M.V., HIRPARA, J.L., CHAUDHURY, S.H. and PERVAIZ, S., 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signalling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 92: 996-1002.
- COHEN, M.D., KARGACIN, B., KLEIN, C.B. and COSTA, M. 1993. Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 255-281.
- CORNELLI, U., 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27: 175-194.
- DAS, D.K. and MAULIK, N. 2006. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Molecular Interventions*, 6: 36-47.
- DE FLORA, S., BAGNASCO, M., SERRA, D. and ZANACCHI, P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds: a review. *Mutation Research*, 238: 99-172.
- DE KOK, T.M.C.M., DE WAARD, P., WILMS, L.C. and VANBREDA, S.G.J. 2010. Antioxidative and antigenotoxic properties of vegetables and dietary phytochemicals: The value of genomics biomarkers in molecular epidemiology. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54: 208-217.
- DEMIR, E., KOCAOGLU, S., CETIN H. and KAYA B. 2009. Antigenotoxic Effects of Citrus aurantium L. Fruit Peel Oil on Mutagenicity of Two Alkylating Agents and Two Metals in the Drosophila Wing Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50: 483-488.
- DEMIR, E., KOCAOGLU, S., KAYA, B. 2008. Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the Drosophila wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3): 1034-1041.
- DE LA LASTRA, C.A. and VILLEGAS, I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transaction*, 35: 1156-1160.
- DE SALVIA, R., FESTA, F., RICORDY, R., PERTICONE P. and COZZI R. 2002. Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H₂O₂ in mammalian cells in vitro. *Toxicology Letters*, 135: 1-9.
- DOAK, S.H., JENKINS, G.J., JOHNSON, G.E., QUICK, E., PARRY, E.M. and PARRY, J.M. 2007. Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Research*, 15: 3904-3911.
- EL ATTAR, R. T. and VIRJI, A., 1999. The effects of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, 19: 5407-5414.
- FALAKALI, B. 1990. *Drosophila* Genetiği. Ege Üniversitesi Basımevi Basımevi 44 ss., Bornova-İzmir.

- FESUS, L., SZONDY, Z. and URAY, I. 1995. Probing the molecular program of apoptosis by cancer chemopreventive agents. *Journal of Cellular Biochemistry*, 22: 151-161.
- FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L. and KINSELLA, J.E. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341: 1103.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, 334: 247-258.
- FUKUHARA, K. and MIYATA, M. 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 3187-3192.
- GARCIA-BELLIDO, A. and MERRIAM, J.R. 1971. Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 24: 61-87.
- GARCIA-BELLIDO, A. and DAPENA, J. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutations in *Drosophila*. *Molecular Genetics and Genomics*, 128: 117-130.
- GÖKPINAR, S., KORAY, T., AKÇİÇEK, E., GÖKSAN, T. ve DURMAZ, Y., 2006. Algal Antioksidanlar. *E.U. Su Ürünleri Dergisi*. 23: 85-89.
- GÜRBÜZ, N., 2006. Antimutajenler ve Antikarsinojenler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 26: 3.
- GRAF, U., WURGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUAN, H., HALL, C.B. and KALE, P.G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 6: 153-188.
- GRAF, U., FREI, H., KAGI, A., KATZ, A.J. and WURGLER, F.E. 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 222: 359-373.
- GRAF, U. and VANSCHAIK, N. 1992. Improved highbioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.
- GRAF, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51: 168-173.
- GRAF, U., ABRAHAM, S.K., GUZMAN-RINCON, J. and WURGLER, F.E. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 402: 203-209.

- GOCKE, E., BURGIN, H., MULLER, L. and PFISTER, T. 2009. Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicology Letters*, 190: 254-265.
- GUSMAN, J., MALONNE, H. and ATASSI, G., 2001. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 22(8): 1111-1117.
- GUZMAN-RINCON, J. and GRAF, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Butterworth, F.M. (editor). 169-181pp, New York.
- HADI, S.M., ASAD, S.F., SINGH, S. and AHMAD, A. A. 2000. Putative mechanism for anticancer and apoptosis including properties of plant derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life*, 50: 1-5.
- HADI, S.M., BHAT, S.H., AZMI, A.S., HANIF, S., SHAMIM, U. and ULLAH, M.F. 2007. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17: 370-376.
- INOUE, M., SUZUKI, R., KOIDE, T., SAKAGUCHI, N., OGIHARA, Y. and YABU, Y. 1994. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL60RG cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204: 898-904.
- JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K.V., THOMAS, C.F., BEECHER, C.W., FONG, H.H., FARNSWORTHY, N.R., KINGHOM, A.D., MEHTA, R.G., MOON, R.C. and PEZZUTO, J.M., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *American Associations for the Advancement of Science*, 275: 218-220.
- JANSEN, J. G., VRIELING, H., VAN TEIJLINGEN, C.M., MOHN, G.R., TATES, A.D., and VAN ZEELAND, A. A. 1995. Marked differences in the role of O⁶-alkylguanine in hprt mutagenesis in T-lymphocytes of rats exposed in vivo to ethylmethanesulfonate, N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea, or N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Research*, 55: 1875-1882.
- JIANG, W.J. 2008. Sirtuins: novel targets for metabolic disease in drug development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373: 341-344.
- KAREKAR, V., JOSHI, S. and SHINDE, S.L. 2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 468: 183-194.
- KASPRZAK, K.S. 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis, *Cancer Investigations*, 13: 411-430.
- KASTENBAUM, M.A. and BOWMAN, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9: 527-549.

- KAZANÇ, M.B., 1997. Antioksidan Vitaminler. *Sendrom*, Temmuz: 14-22
- KESKİN, N., NOYAN, T. ve KUNTER, B., 2009. Üzümden gelen sağlık. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 29(5): 1273-1279
- KAYA, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 134 ss., Antalya.
- KAYA, B., CREUS, A., VELAZQUEZ, A., YANIKOGLU, A. and MARCOS, R 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid-Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research*, 520(1-2): 93-101.
- KAYA, B., KOCAOGLU, S. and DEMİR, E. 2006. Analysis of UV-Stimulated Recombination in the *Drosophila* SMART Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(5): 357-361.
- KUNDU, J.K. and SURH, Y.J. 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269: 243-261.
- LANGOVA, M., PLIVKOVA Z., SMERAK, P., BARTOVA J. and BARTA, N. 2005. Antimutagenic effects of resveratrol. *Czech Journal of Food Sciences*, 23(5): 202-208.
- LE CURIEX, F., MARZIN, D. and ERB, F. 1993. Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity, *Mutation Research*, 319: 223-236.
- LEE, S.K., MBWAMBO, Z.H. and CHUNG, H.1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 1: 35-46.
- LEWIS, E.B. and BACHER, F. 1968. Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Information Service*, 43: 193.
- LI, Y., CAO, Z. and ZHU, H. 2006. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological Research*, 53: 6-15.
- LINDSLEY, D.L. and GRELL, E.H. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publ. 627: 472 pp., Washington DC.
- LINDSLEY, D.L. and ZIMM, G.G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
- LIU, K.J. and SHI, X. 2001. In vivo reduction of chromium(VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222: 41-47.

- LO'PEZ-BURILLO, S., TAN, D.X., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., MANCHESTER, L.C. and REITER, R.J. 2003. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and α-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *Journal of Pineal Research*, 34: 269-277.
- LU J., HO, C.H., GHAI, G. and CHEN, K.Y., 2001. Resveratrol analog, 3,4,5,4-tetrahydroxystilbene, differentially induces pro-apoptotic p53/Bax gene expression and inhibits the growth of transformed cells but not their normal counterparts. *Carcinogenesis*, 22(2): 321-328.
- MARKUS, M.A. and MORRIS, B.J. 2008. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical Interventions in Aging*, 3(2): 331-339.
- MARTINEZ, J. and MORENA, J.J. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59: 865-870.
- MIURA, T., MURAOKA, S., IKEDA, N., WATANABE, M. and FUJIMOTO, Y. 2000. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacology & Toxicology*, 86: 203-208.
- MORGAN, D.O. 1999-2007. The Cell Cycle: Principles of Control. 1999-2007 New Science Press.
- MOSKAUG, J., CARLSEN, H. and MYHRSTAD, M.C.V. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 277-283.
- NORSETH T. 1981. The carcinogenicity of chromium-Review. *Environmental Health Perspective*, 40: 121-130.
- NUNOSHIBA, T. and DEMPLE, B. 1993. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Research*, 53: 3250-3252
- OLIVE, P.L. and JOHNSTONE, P.J. 1997. DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization. *Oncology Research*, 9: 287-294.
- OP HET VELD, C.W., VAN HEES-STRUIVENBERG, S. and VAN ZEELAND, A.A. 1997. Effect of nucleotide excision repair on hprt gene mutations in rodent cells exposed to DNA ethylating agents. *Mutagenesis*, 12: 417-424.
- PACE-ASCIAK, C.R., HAHN, S., DIAMANDIS, E.P., SOLEAS, G. and GOLDBERG, D.M. 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235: 207-219.

- PANDEY, K.B. and RIZVI, S.I., 2010. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative insult. *Phytotherapy Research*, 24: 11-14.
- PATLOLLA, A.K., BARNES, C., YEDJOU, C., VELMA, V.R. and TCHOUNWOU, P. B. 2009. Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in sprague-dawley rats. *Environmental Toxicology*, 24(1): 66-73.
- PELLEGRINI, N., MIGLIO, C. and DEL RIO, D., 2009 . Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Internaitonal Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2): 12-22.
- PONZANELLI, I., LANDI, S. and BARALE, R. 1996. Persistence of 4-nitroquinoline-1-oxide induced lesions in human lymphocytes. *Mutation Research*, 362: 193-197.
- POTTER, C. J., TURENCHALK, G. S. and XU, T. 2000. Drosophila in cancer research. *TIG*, 16(1): 33-39.
- RATNAM, D.V., ANKOLA, D.D. and BHARDWAJ, V., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207.
- ROTHWELL, V.N. 1993. Understanding Genetics, A Molecular Approach. A John Wiley & Sons Inc. Publ. New York. 556 pp.
- SAIKO, P., SZAKMARY, A., JAEGER, W. and SZEKERES, T. 2008. Reseveratrol and its analogs: defence against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research*, 658: 68-94.
- SAMAHA, H.S., KELLOFF, G.J., STEELE, V., RAO, C.V. and REDDY, B.S., 1997 Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3- methylcaffeate and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Research*, 57: 1301-1305.
- SAVOURAT, J.F. and QUESNE, M., 2002. Resveratrol and cancer: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(2): 84-87.
- SAYIN, O., ARSLAN, N. and GUNER, G. 2008. Resveratrol ve kardiyovasküler sistem. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33(3): 117-121.
- SCHNEIDER, Y., DURANTON, B., GOSSE, F., SCHLEIFFER, R., SEILER, N. and RAUL, F., 2001. Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. *Nutrition and Cancer-An International Journal*, 39: 102-110.
- SEGA, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research*, 134: 113-142.

- SELBY, P.B. and OLSON, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- SENER, G., TUGTEPE, H. and YUKSEL, M. 2006. Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Archives of Medical Research*, 37: 822-829.
- SGAMBATO, A., ARDITO, R., FARAGLIA, B., BONINSEGNA, A., WOLF, F.I. and CITTADINI, A. 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 496: 171-180.
- SHI, X. and DALAL, N.S. 1992. The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(1): 323-327.
- SHI, X., CGIU, A., CHEN, C.T., HALLIVELL, B., CASTRANOVA, V. and VALLYATHAN, V. 1999. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B- Critical Reviews*, 2: 87-104.
- SINGH, J., CALISLE, D.L., PRITCHARD, D.E. and PATERNO, S.R. 1998. Chromium-induced genotoxicity and apoptosis. *Oncology Reports*, 5: 1307-1318.
- SNYDERWINE, E.G. and BOHR, V.A. 1992. Gene- and strand-specific and repair in Chinese hamster ovary cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Research*, 52: 4183-4189.
- STICKEL, F., SCHUPPAN D., HAHNE, E.G. and SEITS, H.K. 2002. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis. *Gut*, 51: 132-139.
- SUGIMURA, T. 1981. Carcinogenesis, A Comprehensive Survey, Vol. 6, "The Nitroquinoline", Raven, 1-153 pp., New York.
- SURH, Y.J., HURH, Y.J., KANG J.Y., LEE, E., KONG, G. and LEE, S.J. 1999. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters*, 140: 1-10.
- SZABAD, J., SOOS, I., POLGAR, G. and HEJJA, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Research*, 113: 117-133.
- TAKAHASHI, E., MARCZYLO, T.H., WATANABE, T., NAGAI, S., HAYATSU, H. and NEGISHI, T. 2001. Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. *Mutation Research*, 480-481: 139-145.

- TAKAHASHI, E., FUJITA, K., KAMATAKI, T., ARIMOTO-KOBAYASHI, S., OKAMOTO, K. and NEGISHI, T. 2002. Inhibition of human cytochrome P450 1B1, 1A1 and 1A2 by antigenotoxic compounds, purpurin and alizarin. *Mutation Research*, 508: 147-156.
- TSOU, T.C., CHEN, C.L., LIU, T.Y. and YANG, J.L. 1996. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis*, 17: 103-108.
- UENOBE, F., NAKAMURA, S. and MIYAZAWA, M. 1997. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutation Research- Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 373(2): 197-200.
- VANSCHAIK, N. and GRAF, U. 1991. Genotoxicity evaluation of 5 tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 260(1): 99-104.
- WANG, X.F., XING, M.L., SHEN, Y., ZHU, X. and XU, L.H. 2006. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress. DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology*, 228: 16-23.
- WEI, Y.H. and PANG, C.Y., 2005. The Role of Mitochondria in human aging process. <http://www.biotech-online.com>.
- WEINBERG, R.A. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogens. *Cancer Research*, 49: 3713-3721.
- WURGLER, F.E. and VOGEL, E.W. 1986. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their detection*. Würzler FE and Vogel EW (editors). Vol. 10. Plenum Press, 1-73. pp., New York.
- YAN, Y., YANG, J., CHEN, G., MOU, Y., ZHAO, Y., PAN, L., MA, C., LIU, X. and WU, C. 2011a. Protection of resveratrol and its analogues against ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, 721: 171-177.
- YAN, Y., YANG, J.Y., MOU, Y.H., ZHANG, H. and WU, C.F. 2011b. Possible metabolic pathways of ethanol that responsible for oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 35: 1-9.
- YANO, T., TAKAHASHI, S. and ICHIKAWA, T. 1995. Active oxygen generated in the process of carcinogen metabolism can induce oxidative damage in nuclei. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 87: 367-370.
- YU, W., FU, Y.C. and ZHOU, X.H. 2009. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT6 in H9c2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107: 741-747.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma TURNA, 1987 yılında Denizli ilinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya ilinde tamamladı. 2005 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2010 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. TÜBİTAK tarafından verilen, TÜBİTAK 2228 - Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Burs Programını 2010 yılında kazandı ve halen burs almaya devam etmektedir. 2010 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Eylül 2011'de Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen Yüksek Lisans öğrenimini sürdürmekte olup Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.