

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN
***İN VİTRO* HİDROJEN PEROKSİT İLE**
İNDÜKLENEN İNSAN KORONER ARTER
ENDOTEL HÜCRE HASARINA OLASI
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

OYA SAYIN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ
İZMİR- 2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN
***İN VİTRO* HİDROJEN PEROKSİT İLE**
İNDÜKLENEN İNSAN KORONER ARTER
ENDOTEL HÜCRE HASARINA OLASI
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

OYA SAYIN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2006.KBSAG047 sayı ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	v
Şekil Listesi.....	vii
Kısaltmalar	x
Türkçe Özet.....	xii
İngilizce Özet.....	xiv

BİRİNCİ BÖLÜM

1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
----------------------	---

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİ	3
2.2. HİDROJEN PEROKSİTİN METABOLİZMASI	3
2.3. HİDROJEN PEROKSİTİN SİNYAL MEKANİZMALARI	5
2.4. HİDROJEN PEROKSİT VE ENDOTEL.....	5
2.5. OKSİDATİF STRES VE KARDİOVASKÜLER HASTALIKLAR.....	7
2.6. ANTİOKSİDANLAR	10
2.6.1. HÜCRE İÇİ ANTİOKSİDAN SİSTEMLER	10
2.6.1.1. Glutasyon.....	10
2.6.1.2. γ-Glutamil Sistein Sentetaz	15
2.6.1.3. Glutasyon Peroksidaz	16
2.6.1.4. Glutasyon Redüktaz	20
2.6.2. HÜCRE DIŞI ANTİOKSİDAN	21
2.6.2.1 Resveratrol	21
2.6.2.1.1. Yapısal Özellikleri.....	21
2.6.2.1.2. Kaynakları.....	22
2.6.2.1.3. Biyosentezi	22
2.6.2.1.4. Diyetle Alınan Resveratrolün Emilimi	23
2.6.2.1.5. Diyetteki Resveratrolün Dokulara Transportu	25
2.6.2.1.6. Diyetle Alınan Resveratrolün Atılımı.....	27
2.6.2.1.7. Resveratrolün Sinyal İleti Yolları.....	28
2.6.2.1.8. Resveratrolün Kardiyoprotektif Etkileri.....	29

2.6.2.1.8.1. Vazorelaksasyon	31
2.6.2.1.8.2. Anti-enflamatuvar etkileri	32
2.6.2.1.8.3. ROS yakalayıcısı olarak resveratrol	32
2.6.2.1.8.4. Anti-apoptotik etki	33

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. ÇALIŞMANIN PLANI VE DENEY GRUPLARI	34
3.2. GEREÇ	35
3.3. YÖNTEM	35
3.3.1. Hücrelerin Çözülmesi	35
3.3.2. Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi Canlılık Testi	36
3.3.3. Hücrelerin pasajlanması	37
3.4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.4.1. SİTOTOKSİSİTENİN LAKTAT DEHİDROGENAZ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	39
3.4.1.1. Resveratrolün HCAE hücrelerinde <i>in vitro</i> etkisi	41
3.4.1.2. Hücrelerde H ₂ O ₂ İle Optimum Hasar Modeli Oluşturma	42
3.4.1.3. Resveratrolün H ₂ O ₂ Uygulanan Endotel Hücrelerinde Olası Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi	44
3.4.2. REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİNİN ANALİZİ	45
3.4.2.1. H ₂ O ₂ Hasarında Reaktif Oksijen Ürünleri Oluşumunun Değerlendirilmesi	45
3.4.2.2. Resveratrolün Reaktif Oksijen Ürünleri Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi	46
3.4.3. İNDİRGENMİŞ VE YÜKSELTGENMİŞ GLUTATYON DÜZEYLERİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE DEĞERLENDİRİLMESİ	47
3.4.3.1. Glutasyon Ölçümü İçin Örneklerin Hazırlanması	47
3.4.3.2. Glutasyon Düzeyinin HPLC İle Değerlendirilmesi	49

3.4.3.2.1. İndirgenmiş Glutasyon Ölçümü İçin Örneklerinin Hazırlanması.....	50
3.4.3.2.2. Total Glutasyon Ölçümü İçin Örneklerinin Hazırlanması.....	50
3.4.3.2.3. HPLC Kolonuna Enjeksiyon	51
3.4.3.2.4. Yükseltgenmiş Glutasyon	51
3.4.4. γ -GLUTAMİL SİSTEİN SENTETAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ-1 VE GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ.....	52
3.4.4.1. Hücre lizati hazırlanması.....	53
3.4.4.2. Protein Ölçümü	54
3.4.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması	55
3.4.4.4. Örnek Hazırlanması.....	57
3.4.4.5. Jelin Yüklenmesi	57
3.4.4.6. Elektroforetik Yürütme	57
3.4.4.7. Proteinlerin Membrana Transferi	58
3.4.4.8. Bloklama.....	58
3.4.4.9. Primer Antikor İle İnkübasyon	58
3.4.5.0. Sekonder antikor ile inkübasyon.....	59
3.4.5.1. Görüntüleme.....	59
3.4.5.2. Dansitometrik analiz	59
3.5. İstatistiksel Analiz.....	60

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR.....	61
4.1. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ.....	61
4.1.1. Resveratrolün HCAE Hücrelerine <i>in vitro</i> Etkisi.....	61
4.1.1.1. Resveratrolün HCAE Hücrelerine Etkisinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi.....	63
4.1.2. H ₂ O ₂ Hasar Modelinin Oluşturulması	64
4.1.2.1. H ₂ O ₂ Hasar Modeline İlişkin Mikroskopik Görüntüler	67

4.1.3. Resveratrolün H ₂ O ₂ İle Oluşturulan Hasara Etkisi	69
4.1.3.1. Resveratrolün H ₂ O ₂ Hasarına Etkilerinin Mikroskopik Olarak Gözlenmesi	70
4.2. ROS ANALİZLERİ.....	71
4.2.1. H ₂ O ₂ Hasar Modelinde ROS Oluşumunun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	71
4.2.2. Resveratrolün H ₂ O ₂ Hasar Modelinde ROS Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi.....	72
4.3. İNDİRGENMİŞ VE YÜKSELTGENMİŞ GLUTATYON ANALİZİ	74
4.3.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Protein Düzeyleri	74
4.3.2. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Glutasyon Düzeyleri.....	75
4.4. γ-GLUTAMİL SİSTEİN SENTETAZ, GLUTATYON PEROKSİDAZ-1 VE GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ WESTERN BLOT İLE ANALİZİ.....	79
4.4.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Protein Ekspresyonlarının Western Blot İle Gösterilmesi.....	79
BEŞİNCİ BÖLÜM	
5. TARTIŞMA.....	83
ALTINCI BÖLÜM	
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	101
YEDİNCİ BÖLÜM	
7. KAYNAKLAR.....	103
EK 1. Etik Kurul Onayı.....	111
EK 2. Özgeçmiş	113
EK 3. Yayımlanmış Makale.....	118
EK 4. Yayına Gönderilen Makale.....	133

TABLO LİSTESİ

- Tablo 1. Hücre lizati hazırlamada kullanılan lizis tamponu içeriği
- Tablo 2. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10) hazırlanması
- Tablo 3. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması
- Tablo 4. Resveratrolün HCAE hücrelerine *in vitro* etkisinin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbans bulguları
- Tablo 5. Resveratrolün HCAE hücrelerine *in vitro* etkisinin LDH ile değerlendirildiği deneyde % sitotoksite bulguları
- Tablo 6. Resveratrolün 10,50 ve 100 μ M konsantrasyonlarının 1,12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde kontrole göre “p” değerleri
- Tablo 7. H₂O₂ hasar modelinde sitotoksisitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbans bulguları
- Tablo 8. H₂O₂ hasar modelinde sitotoksisitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde % sitotoksite bulguları
- Tablo 9. H₂O₂’in değişik konsantrasyonlarının sitotoksisite üzerine etkilerinin kontrole göre tüm zaman noktalarındaki istatistiksel sonuçları
- Tablo 10. 10, 50 ve 100 μ M resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda sitotoksisitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbans bulguları
- Tablo 11. 10, 50 ve 100 μ M resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda sitotoksisitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde % sitotoksite bulguları
- Tablo 12. 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında resveratrolün sitotoksisite üzerine etkilerinin 1,12 ve 24 saat inkübasyon süreleri açısından istatistiksel sonuçları
- Tablo 13. HCAE hücrelerinde farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında ve sürelerinde ROS oluşumu
- Tablo 14. HCAE hücrelerinde H₂O₂’in farklı konsantrasyonlarında ve sürelerinde yapılan deneyin kontrol grubuna göre karşılaştırılmasının istatistiksel sonuçları
- Tablo 15. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarında ROS oluşumu
- Tablo 16. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarında yapılan deneyin tüm zaman noktalarında H₂O₂ grubuna göre yapılan karşılaştırılmasının istatistiksel sonuçları

- Tablo 17. Kontrol grubu ve deney gruplarında hücre lizati ortalama protein düzeyleri
- Tablo 18. Kontrol grubu ve deney gruplarında indirgenmiş glutatyon (GSH) bulguları
- Tablo 19. Kontrol grubu ve deney gruplarında yükseltgenmiş glutatyon (GGSG) bulguları
- Tablo 20. Kontrol grubu ve deney gruplarında indirgenmiş glutatyon düzeyi açısından istatistiksel sonuçlar
- Tablo 21. Kontrol grubu ve deney gruplarında yükseltgenmiş glutatyon düzeyi açısından istatistiksel sonuçlar
- Tablo 22. Kontrol grubu ve deney gruplarında γ - Glutamil Sistein Sentetaz'ın dansitometrik bulgularının istatistiksel sonuçları
- Tablo 23. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutatyon Peroksidaz-1 dansitometrik bulgularının istatistiksel sonuçları
- Tablo 24. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutatyon Redüktaz'ın dansitometrik bulgularının istatistiksel sonuçları

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. H_2O_2 'in metabolizması
- Şekil 2. Kardiyovasküler hastalıklardaki oksidatif stres ve endotel fonksiyon kaybı
- Şekil 3. İndirgenmiş glutatyon'un yapısı
- Şekil 4. Glutatyon'un sentezi
- Şekil 5. Glutatyon'un hücre içi dağılımı
- Şekil 6. Glutatyon'un katabolizması
- Şekil 7. Glutatyon'un redoks ve konjugasyon reaksiyonları
- Şekil 8. γ -GCS enziminde disülfid bağı oluşumu ve indirgenmesini gösteren bir model
- Şekil 9. Glutatyon Peroksidaz-1'in moleküler mekanizmaları ve işlevleri
- Şekil 10. NADPH'dan GSH ve Glutatyon redüktaz aracılığı ile elektron transferi
- Şekil 11. Resveratrol ve konjuge formlarının yapısal formülleri
- Şekil 12. Resveratrolün biyosentezi
- Şekil 13. *Trans*-resveratrolün ve *trans*-piceidin Emilimi
- Şekil 14. Resveratrolün plazmadan hücre içi hedeflere olası yolları
- Şekil 15. Resveratrolün metabolizması
- Şekil 16. Resveratrolün moleküler hedefleri
- Şekil 17. Resveratrolün kardiyoprotektif etkileri
- Şekil 18. Çalışmamızda oluşturduğumuz deney gruplarımız
- Şekil 19. Hücre sayımında kullanılan Thoma lamı
- Şekil 20. Pasaja hazır HCAE P4 hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüsü
- Şekil 21. LDH yönteminin enzimatik denklemi
- Şekil 22. Akış çizelgesi: Resveratrolün hücre canlılığına *in vitro* etkisinin değerlendirilmesi
- Şekil 23. Akış çizelgesi: Hidrojen peroksit hasar modelinin *in vitro* uygulaması
- Şekil 24. Akış çizelgesi: Resveratrolün, H_2O_2 hasarlı HCAE hücrelerine *in vitro* etkisinin değerlendirilmesi
- Şekil 25. Akış çizelgesi: H_2O_2 hasar modelinde ROS ölçümü
- Şekil 26. Akış çizelgesi: Resveratrolün *in vitro* H_2O_2 hasarına etkisinin değerlendirilmesi
- Şekil 27. Akış çizelgesi: Değişik deney gruplarında glutatyon ölçümleri öncesinde hücre lizati hazırlanması ve derivatizasyon işlemleri
- Şekil 28. Western Blot aşamalarının gösterimi

- Şekil 29. Akış çizelgesi: Değişik koşullardaki hücrelerden Western-blot için lizat hazırlanması
- Şekil 30. Proteinlerin SDS'e bağlanması sonucu denatürasyonu
- Şekil 31. Protein ekspresyonlarının Western blot yöntemi ile incelenmesi basamakları
- Şekil 32. HCAE hücrelerinde 10, 50 ve 100 μ M resveratrolün 1, 12 ve 24 saat inkübasyonları ile elde edilen % sitotoksosite değerlerinin grafikte gösterimi
- Şekil 33. 10, 50 ve 100 μ M resveratrol ile 24 saat inkübe edilen HCAE hücrelerin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri
- Şekil 34. HCAE hücrelerinde 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M H₂O₂ ve 1, 3 ve 6 saat inkübasyonu ile elde edilen % sitotoksosite değerlerinin grafikte gösterimi
- Şekil 35. Hasar modeli oluşturma deneyinde: Kontrol grubu ve 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M H₂O₂ ile 1 saat inkübasyona bırakılan HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri
- Şekil 36. 10, 50 ve 100 μ M resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda elde edilen % sitotoksosite değerlerinin grafikte gösterimi
- Şekil 37: Resveratrolün koruyuculuk deneyinde, 10, 50 ve 100 μ M RSV ile preinkübasyona bırakıldıktan sonra 1 saat 750 μ M H₂O₂ ile inkübe edilen HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri
- Şekil 38. HCAE hücrelerinde farklı koşullarda ROS oluşumuna etkisinin grafiksel gösterimi
- Şekil 39. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarının ROS oluşumuna etkisinin grafiksel gösterimi
- Şekil 40. BSA standart kalibrasyon eğrisi
- Şekil 41. HCAE hücrelerinde Kontrol grubu ve deney gruplarında indirgenmiş glutatyon düzeylerinin grafiksel gösterimi
- Şekil 42. HCAE hücrelerinde kontrol grubu ve deney gruplarında yükseltgenmiş glutatyon düzeylerinin grafiksel gösterimi
- Şekil 43. Kontrol grubu ve deney gruplarında yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) bulgularının karşılaştırılmalı olarak grafiksel gösterimi
- Şekil 44. Kontrol grubu ve deney gruplarında aktin ekspresyonunun Western blot bulguları
- Şekil 45. Kontrol grubu ve deney gruplarında γ - Glutamil Sistein Sentetaz ekspresyonunun Western blot bulguları

Şekil 46. Kontrol grubu ve deney gruplarında γ - Glutamil Sistein Sentetaz Western blot spotlarının dansitometrik analizi

Şekil 47. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutasyon Peroksidaz-1 ekspresyonunun Western blot bulguları

Şekil 48. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutasyon Peroksidaz Western blot spotlarının dansitometrik analizi

Şekil 49. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutasyon Redüktaz ekspresyonunun Western blot bulguları

Şekil 50. Kontrol grubu ve deney gruplarında Glutasyon Redüktaz Western blot spotlarının dansitometrik analizi

KISALTMALAR

ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
O₂^{•-}	: Süperoksit Anyonu
OH[•]	: Hidroksil Radikali
NO[•]	: Nitrik Oksit TG6Y
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
RSV	: Resveratrol
γ-GCS	: γ-Glutamil Sistein Sentetaz
GCL	: Glutamat Sistein Ligaz
LPH	: Laktaz Florizin Hidrolaz
CBG	: Sitozolik-β-Glukozidaz
SGLT1	: Sodyuma Bağlı Glukoz Transporter 1
UGT	: UDP-Glukuronoziltransferaz
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
PI3K	: Fosfotidilinozitol-3- Kinaz
PKB	: Protein Kinaz B
VCAM	: Vasküler Adezyon Molekül-1
ICAM-1	: Hücre İçi Adezyon Molekülü-1
oxLDL	: Okside LDL
NFκB	: Nükleer Faktör Kappa B
VEGF	: Vasküler Endoteyal Büyüme Faktörü
MCP-1	: Monosit Kemoatraktant Protein-1
cGMP	: Guanozin 3',5'-Monofosfat
AP-1	: Aktivatör Protein-1
JNK	: Jun N-terminal Kinaz
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
TNF-α	: Tümör Nekroz Edici Faktör-α
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez

DTT	: Ditiyotreitol
APS	: Amonyum persülfat
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LDH	: Laktat dehidrogenaz
HPF	: Hidroksifenil floresin fluoeresans
HCAEC	: İnsan koroner arter endotel hücresi
INT	: İodotetrazolium klorid

ÖZET

RESVERATROLÜN *İN VİTRO* HİDROJEN PEROKSİT İLE İNDÜKLENEN İNSAN KORONER ARTER ENDOTEL HÜCRE HASARINA OLASI ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Oya Sayın

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

35340 Balçova-İzmir

oya.sayin@deu.edu.tr

Giriş: Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve yıkılımı arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Vasküler ve enflamatuvar hücrelerden kaynaklanan hidrojen peroksit, oksidatif stresi indükleyerek endotelde fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Bu da koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, periferik arter hastalığı ve diyabet gibi hastalıklarda önemlidir. Enzimatik antioksidan savunma kaynakları süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğerleridir. Resveratrol; stilbenlerin alt grubu olup, üzüm ve kırmızı şarapta bulunan polifenolik bir bileşiktir. Antienflamatuvar, antioksidan, antikanser, sitoprotektif ve kardioprotektif etkilere sahiptir.

Amaç: Literatürde resveratrolün hidrojen peroksit hasarı ile indüklenen endotel hücresi üzerine *in vitro* etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, resveratrolün *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerini hidrojen peroksit hasarına karşı koruyucu etki gösterip göstermediğini araştırmaktır. Bu amaçla hücre sitotoksitesi, reaktif oksijen ürünleri oluşumu, γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin protein ekspresyonları ve glutatyon düzeyi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada; *in vitro* insan koroner endotel hücrelerinde resveratrolün değişik konsantrasyonları ve preinkübasyon sürelerinde hidrojen peroksit'in indüklediği hücre sitotoksitesi üzerine etkileri araştırıldı. Resveratrolün hücre hasarındaki etkisi hücre sitotoksite değerlendirme testi olan laktat dehidrogenaz ile incelendi. Hasar modelinde resveratrolün değişik konsantrasyonlarının çeşitli preinkübasyon sürelerinde ve zaman dilimlerinde reaktif oksijen ürünleri oluşumuna etkisi oksidan duyarlı bir floresans prob olan hidroksifenil floresin kullanılarak değerlendirildi. Resveratrolün antioksidan etkileri γ -glutamil

sistein sentetaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin protein ekspresyonları Western blot yöntemi ile değerlendirildi. *İn vitro* insan koroner endotel hücrelerinde resveratrolün glutatyon düzeyine etkisi de yüksek performanslı sıvı kromatografisinde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Resveratrolün 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarının 1, 12 ve 24 saat preinkübasyon sürelerinde 1 saat, 750 μ M hidrojen peroksit'in oluşturduğu sitotoksiteyi istatistiksel olarak anlamlı azalttığı saptanmıştır ($p<0.05$). 10, 50 ve 100 μ M resveratrol ile 24 saat preinkübasyon süresinde resveratrolün 15., 60. dakika ve 6. saat zaman noktalarında reaktif oksijen ürünleri oluşumunu da anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Resveratrol, indirgenmiş glutatyon düzeyini anlamlı olarak arttırmaktadır ($p<0.05$). Yine resveratrol oksidatif hasarda görülen, γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırmaktadır ($p<0.05$).

Sonuç: Tüm bulgular birbirlerini destekleyici özellikte olup, araştırma koşullarında resveratrolün çeşitli yönlerden insan koroner arter endotel hücre hasarına koruyucu etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bu araştırmanın sonuçlarının kardiyovasküler hastalıklarda oluşan oksidatif stresin geri döndürülmesinde kullanılabilecek yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi, Oksidatif Hasar

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE POSSIBLE EFFECTS OF RESVERATROL ON HUMAN CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELL DAMAGE INDUCED BY *IN VITRO* HYDROGEN PEROXIDE

Oya Sayın

Dokuz Eylül University Health Sciences Institute

35340 Balçova-İzmir

oya.sayin@deu.edu.tr

Introduction: Oxidative stress is defined as an imbalance between the production and destruction of reactive oxygen species. Hydrogen peroxide resulting from vascular and inflammatory cells causes endothelial dysfunction by inducing oxidative stress, which is of importance in coronary artery disease, cardiac failure, hypertension, peripheral artery disease and diabetes. Defense sources of enzymatic antioxidant include superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione catalase. Non-enzymatic antioxidants are ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione, carotenoids, flavonoids, stilbenes and others. Resveratrol, a subclass of stilbenes family, is a polyphenolic compound found in grapes and red wine. It has anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-apoptotic, cytoprotective, anti-cancer and cardio-protective effects.

Aim: No research conducted on *in vitro* effects of resveratrol on endothelial cells induced by hydrogen peroxide damage have been found in the literature. The purpose of this study is to investigate whether resveratrol can protect *in vitro* human endothelial cells against hydrogen peroxide damage. Therefore, cell cytotoxicity, production of reactive oxygen species, expressions of γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione reductase and glutathione peroxidase enzymes and glutathione levels were investigated.

Materials and methods: In this study, various concentrations of resveratrol found in *in vitro* human coronary endothelial cells and the effects of resveratrol on cell cytotoxicity induced by hydrogen peroxide during pre-incubation periods were investigated. The effect of resveratrol on cell damage was investigated with the lactate dehydrogenase test, a test used for the evaluation of cell cytotoxicity. The effects of various concentrations of resveratrol on the production of reactive oxygen species during various pre-incubation periods and time slices were evaluated by using hydroxyphenyl fluorescein, an oxidant-sensitive fluorescent probe. Anti-oxidant effects of resveratrol, protein expressions of γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymes were evaluated with the Western blot method. The effects of resveratrol on the glutathione level *in vitro* human coronary endothelial cells were evaluated with high performance liquid chromatography.

Results: It was determined that 10 and 50 μ M concentrations of resveratrol statistically significantly decreased the cytotoxicity induced by 750 μ M hydrogen peroxide during 1, 12 and 24-hour pre-incubation periods for one hour ($p < 0.05$). It was also determined that 10, 50 and 100 μ M concentrations of resveratrol statistically significantly decreased the production of reactive oxygen species at 15th and 60th minutes and 6th hour during the 24-hour pre-incubation periods ($p < 0.05$). Resveratrol statistically significantly increases the reduced glutathione levels ($p < 0.05$). Resveratrol increases the protein expressions of γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione peroxidase-1 and glutathione reductase enzymes ($p < 0.05$).

Conclusion: All the data support each other and suggest that resveratrol has a protective effect on the human coronary artery endothelial cell damage. It is thought that the findings obtained in this study can light the way to the new therapeutic approaches to be used for the reversal of oxidative stress which develops in cardiovascular diseases.

Key words: Resveratrol, human coronary artery endothelial cell, oxidative damage

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan damar duvarı ile kan akışı arasında yer alan endotel, basınç ve germe kuvveti gibi mekanik uyarılara; vazoaaktif maddeler gibi hormonal uyarılara duyarlıdır ve yanıt olarak vazomotor işlevi düzenleyen, enflamatuvar olayları tetikleyen ve homeostazı etkileyen çeşitli etmenlerin salınmasını sağlamaktadır (1). Fizyolojik koşullar altında, damar duvarında reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve elimine edilmesi bir denge halindedir. Oksidan enzimlerin aktivitesindeki artma ve/veya antioksidan enzimlerin aktivitesindeki azalma oksidatif strese neden olmaktadır (2). Oksidatif stres; hidrojen peroksit ve süperoksit gibi endojen reaktif oksijen türlerinde artış ile karakterizedir. Düşük düzeyde hidrojen peroksit, fizyolojik hücresel olayları düzenlemekte, enflamatuvar durumda izlenen yüksek düzeyde hidrojen peroksit ise genellikle endotelde işlev kaybına ve/veya sitotoksositeye neden olmaktadır. Bu koşullarda hidrojen peroksit metabolik yolları ve intrasellüler sinyal kaskadını düzenleyerek dolaylı rol oynamaktadır. Oksidatif stres; kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet ve yaşlanma gibi hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları; bu mekanizmaların engellenmesi, onarımı, fiziksel savunma ve antioksidan savunmayı kapsamaktadır. Enzimatik antioksidan savunma süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğerleridir. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında bir denge söz konusudur. Bu denge, organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir.

Resveratrol, stilbenlerin alt grubu olup, üzüm ve kırmızı şarapta bulunan polifenolik bir bileşiktir. Antienflamatuvar, antioksidan, sitoprotektif, antikanser ve kardioprotektif etkileri bulunduğu bildirilmiştir (3,4). Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiyovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı saptanmıştır (Fransız paradoksu)(5).

Literatür incelendiğinde resveratrolün *in vitro* protektif etkilerinin mekanizmalarına yönelik çalışmalar rat kardiyomyosit hücrelerinde (6), rat aort düz kas hücrelerinde (7) ve sıgır aort endotel hücrelerinde (8) değişik hasar modellerinde gerçekleştirilmiştir. İnsan koroner arter endotel hücrelerinde *in vitro* oksidatif hasar modeli kullanılarak resveratrolün glutasyon ve döngüsünde görev alan glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve γ-glutamil sistein sentetaz enzimlerinin protein ekspresyonlarına etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırmanın temel amacı, hidrojen peroksit ile *in vitro* ortamda insan koroner arter endotel hücresinde oluşturulan hasarda resveratrolün olası koruyucu etkisinin değerlendirilmesidir. Önce sitotoksosite ve ROS ölçümü ile incelenmesi amaçlandı. Sitotoksosite bulguları ile ROS bulgularının birbirlerini destekleyip desteklemediklerinin değerlendirilmesi planlandı. Ayrıca araştırmanın diğer bir yönü glutasyon ve metabolizmasında yer alan enzimlerin ekspresyonlarının değerlendirilmesidir. Glutasyon metabolizmasında görev alan enzimler olarak γ-glutamil sistein sentetaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın incelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon dengesinin araştırılması amacıyla total glutasyon ve indirgenmiş glutasyon parametrelerinin çalışılması uygun bulunmuştur. Glutasyon bulguları ile ROS bulgularının birbirlerini destekleyip desteklemediğinin gözlenmesi hedeflenmiştir.

Antioksidan etkileri çeşitli dokularda gösterilmiş resveratrolün koroner arter endotel hasarını önlemede de olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir. Araştırmanın hipotezi, "*in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde oluşturulan hasar modelinde resveratrol hücre sitotoksitesini ve ROS düzeyini azaltarak ve glutasyon ve glutasyon metabolizmasında ilgili enzimlerin ekspresyonunu arttırarak oksidatif strese karşı korumaktadır" şeklinde formüle edilmiştir. Bu araştırmadan elde edileceği düşünülen verilerin oksidatif stres durumunda endoteli koruyacak tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutacağı öngörülmektedir. Koroner arter endotel hasarını önlemede olumlu etkilerinin saptanması durumunda özellikle yüksek riskli hastalarda resveratrol kullanımının söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

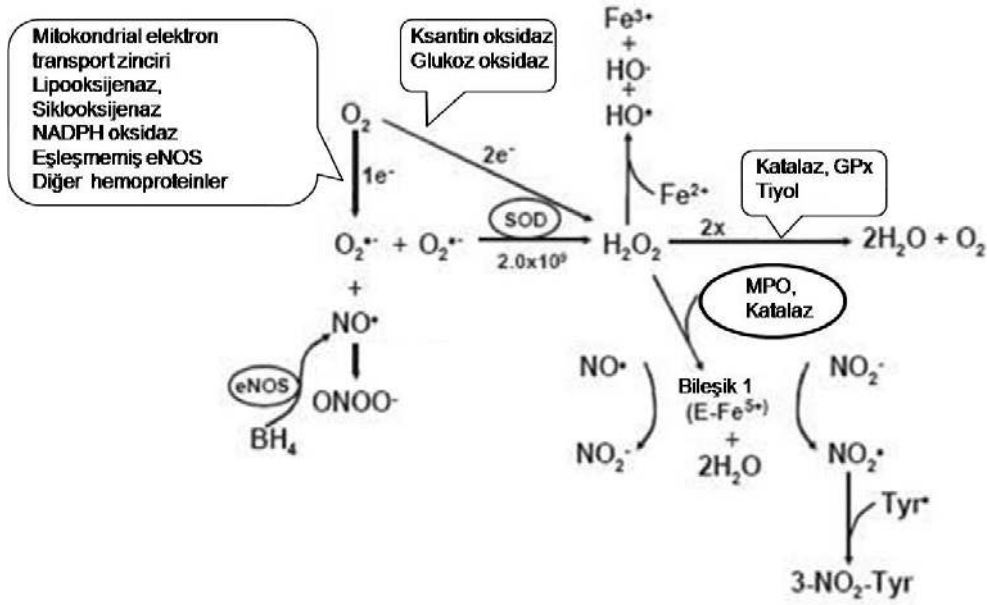
2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Serbest radikaller atomik ya da moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronlar içeren molekül parçacıkları ya da moleküller olarak tanımlanmaktadır. Bu eşleşmemiş elektron/ elektronlar serbest radikallerin reaktivite derecesini belirlemektedir. Reaktif oksijen türleri ("reactive oxygen species" - ROS) ailesi moleküler oksijenin indirgenmesinden kaynaklanan fazlaca biyoaktif, kısa ömürlü molekülleri içerir (9). Yaygın olan reaktif oksijen türlerinden bazıları hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikalidir. Reaktif oksijen türleri yüksek konsantrasyonda bulunduğu hücrel proteinlere ve lipidlere zarar verebilir ve DNA'da eklentiler oluşturarak karsinojenik aktiviteyi başlatabilir. Oksijenden kaynaklanan radikaller (reaktif oksijen türleri) canlı sistemlerde en önemli radikal türleridir. Moleküler oksijen (dioksijen) özel bir elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi bir radikaldir. Dioksijene bir elektron eklenmesiyle süperoksit anyon radikali oluşur. Süperoksit anyonu metabolik işlemler aracılığı ile ya da fiziksel radyasyon ile oluşur ve "primer ROS" olarak adlandırılır. Primer ROS daha sonra direkt ya da enzimler/ metal ile katalize edilen reaksiyonlarla diğer moleküllerle etkileşime geçer ve "sekonder ROS" moleküllerini oluşturur (10).

2.2. HİDROJEN PEROKSİTİN METABOLİZMASI

Memeli hücrelerinde ROS'un enzimatik kaynakları; mitokondrial elektron transport zinciri, araşidonik asiti metabolize eden lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri, sitokrom P450, ksantin oksidaz, NADPH oksidazlar, eşleşmemiş nitrik oksit sentaz, peroksidazlar ve diğer hemoproteinlerdir (Şekil 1). Bu sistemler özellikle süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) oluşturmak üzere moleküler oksijenin bir elektron alıp indirgenmesini katalize ederler. $O_2^{\bullet-}$, hızla nitrik oksit'i ($NO^{\bullet}$) inaktive ederek peroksinitrit oluşturur. Normal koşullar altında süperoksit molekülü spontan olarak ya da süperoksit dismutaz enzimi ile H_2O_2 'e dönüşmektedir. $NO^{\bullet}$ kaybı H_2O_2 'nin oluşumunda artışa yol açmaktadır. Ksantin oksidaz ve glukoz oksidaz gibi enzimler oksijene direkt iki elektron vererek H_2O_2 oluşturmaktadır. H_2O_2 'in eşleşmemiş elektronu olmadığı için aslında bir radikal değildir. H_2O_2 'in önemi ağır metallerin bulunması durumunda,

$O_2^{\bullet-}$ radikali ve H_2O_2 , Fe gibi ağır metallerle fazlaca reaktif olan hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) oluşturmak üzere Fenton reaksiyonuna katılmasıdır. Myeloperoksidaz ve katalaza bağlandığında H_2O_2 , nitrik oksit radikalini ($NO^{\bullet}$) nitrojen dioksit anyonuna okside eden bileşik I'i oluşturur. Bu sırada nitrojen dioksit anyonu (NO_2^-), nitrojen dioksit radikale ($NO_2^{\bullet}$) dönüşmektedir. Nitrojen dioksit radikali nitrotirozinlerin oluşumu gibi nitratlayıcı olaylara katılmaktadır (11). Memeli hücrelerinde glutatyon peroksidaz H_2O_2 'in düşük konsantrasyonlarının katalaz ise H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonlarının eliminasyonunda önem taşımaktadır. Glutatyon peroksidazın enzimatik etkisi, indirgenmiş glutatyonun (GSH) glutatyon redüktaz ile NADPH kullanılarak yenilenmesine bağlıdır. NADPH, pentoz fosfat yolu ile oluşmakta ve hız sınırlayıcı enzim glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ile kontrol edilmektedir (12).



Şekil 1. H_2O_2 'in metabolizması (11)

2.3. HİDROJEN PEROKSİTİN SİNYAL MEKANİZMALARI

Memeli hücrelerinde submikromolar konsantrasyonunda bulunan H_2O_2 'in fonksiyonu konusunda bilinenler azdır. Memeli hücre kültüründe tirozin kinaz, mitojen aktive protein kinaz (MAP kinaz), epidermal büyüme faktörü reseptörü, potasyum kanalları ve aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör kappa B (NF κ B) gibi transkripsiyon faktörleri H_2O_2 ile aktive olmaktadır (10). H_2O_2 ; endotel hücre büyümesi ve apoptozun düzenlenmesinde aracılık eden sinyal yollarına katılmaktadır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi mitojenik uyarılar süperoksidi ve sonrasında da hidrojen peroksidi oluşturmak üzere NADPH oksidazları aktive eder. H_2O_2 ; büyüme sinyalleri ile ilgili olan p38 MAPK, ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) ve transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonuna aracılık etmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 , Fas ve Jun N-terminal kinaz (JNK) yollarını aktive ederek apoptoza neden olmaktadır. H_2O_2 , aktin iskeleti ve bariyer fonksiyonlarını da düzenlemektedir. Trombin gibi hücre dışı uyarılara karşı oluşan hücre içi H_2O_2 fosfolipaz D ya da kalsiyum kalmodulin bağlı protein kinaz II'ye bağlı ERK1/2 aktivasyonunu indüklemeye yeteneğindedir. Daha ileri sinyal yolu tropomiyozini-1'i aktive ederek aktin iskeletinin ve bariyer fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Protein kinaz C (PKC), protein kinaz A (PKA) ve kalsiyum gibi çeşitli kinazlar H_2O_2 'in indüklediği endotel bariyerinin fonksiyon kaybında da yer almaktadır. H_2O_2 , eNOS ekspresyonu ve endotele bağlı vazorelaksasyonda aracılık etmektedir. Fizyolojik koşullarda damarlarda H_2O_2 ; endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)'ı PI3K/AKT (Fosfotidil inozitol-3-kinaz/ aktive serin treonin kinaz) sinyal yolu ile aktive etmekte bu da nitrik oksite bağlı relaksasyona neden olmaktadır. H_2O_2 , endotelde enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. H_2O_2 ; tümör nekroz edici faktör- α (TNF- α), hipoksi gibi hücre dışı uyarılara cevap olarak NF κ B gibi transkripsiyon faktörünü aktive ederek hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM), vasküler adezyon molekül-1 (VCAM), MCP-1 (monosit kemoatraktant protein-1) gibi enflamatuvar proteinlerin endotelde indüksiyonuna aracılık etmektedir (11).

2.4. HİDROJEN PEROKSİT VE ENDOTEL

Kan ve vasküler düz kas hücreleri arasında yer alan endotel hücreleri birçok vazoaktif maddelerin salınmasında, trombosit agregasyonunda, vasküler yapının kontrolünde görev almaktadır. Fizyolojik şartlar altında endotelden salınan maddelerin başlıca etkileri vazodilatasyon, antiproliferatif ve antiagregan olmalarıdır. Bu etkileri dokuda kan akışının düzenlenmesi, kan basıncındaki yüksekliğin sınırlandırılmasını sağlamaktadır (13). Endotel'in kan damarları içindeki pozisyonu kan ve vasküler düz kas hücreleri arasında bir bariyer görevi üstlenmesini sağlamaktadır. Bu nedenle endotel'in fonksiyonel bütünlüğü vasküler sızıntı ve ateroskleroz oluşumunun önlenmesinde önemlidir (14,15).

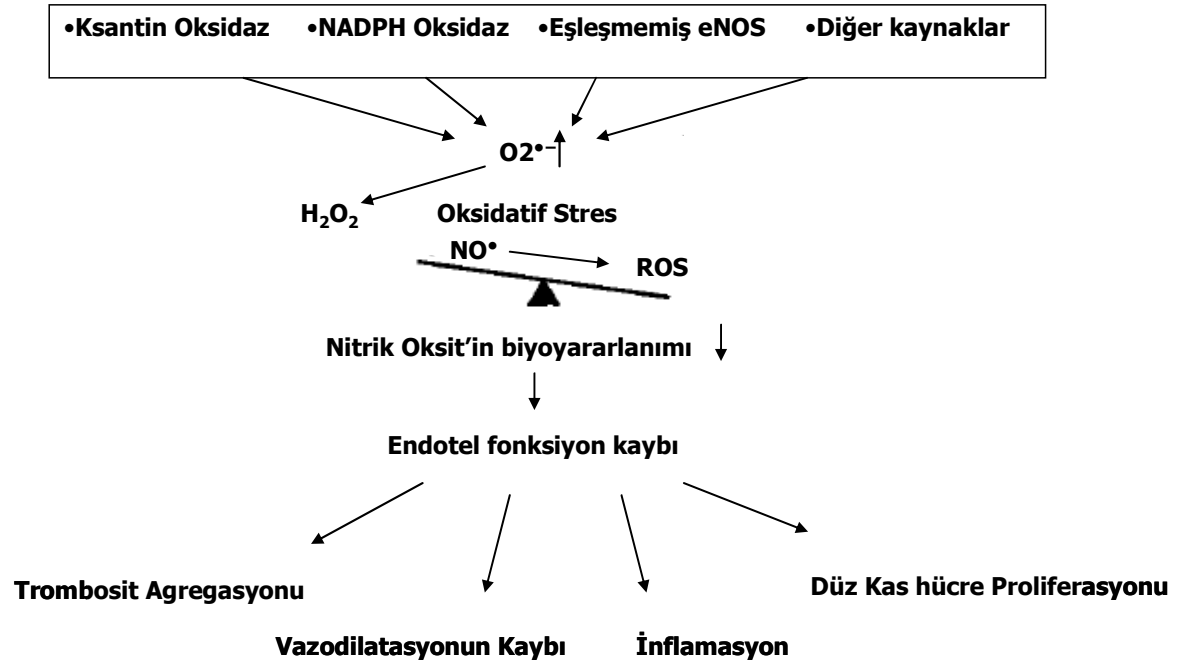
Endotel hücreleri $O_2^{\bullet}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$, nitrik oksit ve peroksinitrit radikalleri kapsayan reaktif oksijen türleri oluşturmaktadır. $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerinin endotel fonksiyonunda önemli etkileri vardır. Hem fizyolojik olarak düzenlenmesinde hem de hastalıkların patofizyolojisinde yer alırlar (16).

Başka bir faktör yoksa, hidrojen peroksit memeli hücrelerine mitojenik etkilidir. Çeşitli hücre kültürlerinde düşük konsantrasyonda H_2O_2 proliferasyonu ya da hücre yaşamını uyarmaktadır. Düşük konsantrasyondaki H_2O_2 endotel hücrelerinde proliferasyona ilave olarak hem migrasyonu hem de tüp oluşumunu uyarmaktadır (17). Düşük konsantrasyonlarda (nano-mikromolar) çeşitli sinyal yollarını aktive etmenin yanı sıra yüksek konsantrasyonda olduğunda, H_2O_2 'in ağır metallerle reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikali, proteinleri, lipidleri okside etmekte, DNA ipliklerinde kırıklara neden olmaktadır (11). Plazmada H_2O_2 hem proteinleri, sülfidril grupları ve askorbat ile reaksiyona girdiğinden dolayı düşük düzeyde tutulmaktadır. H_2O_2 hücre membranlarından difüze olabilen stabil bir reaktif oksijen türüdür. Bu yüzden endotel hücreleri subendotel boşlukta intimal düz kas hücreleri ve enflamatuvar hücrelerinden oluşan H_2O_2 'e daha fazla maruz kalırlar. H_2O_2 'nin vasküler hücre hasarını indükleme mekanizması tamamen anlaşılamamıştır. H_2O_2 eşleşmemiş elektron içermemektedir ve bundan dolayı birçok ROS'dan daha az reaktiftir. Böylece, direkt oksidatif hasarın dışında başka bir mekanizma vasküler hücrelerde H_2O_2 'in sitotoksik etkilerine katkıda bulunmaktadır. Şöyle ki, enflamatuvar bir durumda oluşan H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonları myeloperoksidaz ile daha reaktif moleküller olan hipokloröz ve nitrozilleyici ürünleri oluştururlar. Bu oksidanlar çeşitli antioksidan sistemlerle ortamdaki uzaklaştırılırlar. Ancak bunlar hücrelerin antioksidan kapasitelerini aştıkları zaman hücrelere zarar vererek çeşitli hastalıklara yol açarlar (18).

2.5. OKSİDATİF STRES VE KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

“Oksidatif stres”, prooksidanların antioksidan kapasitesini aşarak reaktif oksijen türleri oluşumunda artış ile sonuçlanan, denge durumunun değişmesi olarak tanımlanmaktadır (19). Fizyolojik şartlar altında endotelden salınan maddelerin başlıca etkileri vazodilatasyon, antiproliferasyon ve antiagregasyondur. Homeostaz durumunda endotel dokuda kan akışının düzenlenmesi, damar tonusu ve kan basıncındaki yüksekliğin sınırlandırılması sağlanmaktadır (4). Endotel tabakanın kan damarları içindeki yerleşimi kan ve vasküler düz kas hücreleri arasında bir bariyer görevi üstlenmesini sağlamaktadır. Bu nedenle endotelin işlevsel bütünlüğü vasküler sızıntı ve ateroskleroz oluşumunun önlenmesinde önemlidir (20). ROS damar duvarında; endotel hücrelerinin büyümesi, damar duvarının yeniden düzenlenmesinde ve endotel işlevlerine ikinci mesajcı olarak katılarak fizyolojik bir rol oynamaktadır (19). Endotelde damar homeostazının sürdürülmesi birçok faktörle olmaktadır. Endotel damar tonusunu vazokonstrüktörler (Anjiyotensin II, tromboksan A2 ve endotelin-1 gibi) ve vazodilatörler (Nitrik oksit: NO, prostasiklin, prostaglandin E2 gibi) oluşturarak dengelemektedir (20). Vasküler homeostazisin sürdürülmesinde NO önemli rol oynamaktadır. Serbestçe difüze olabilen bir molekül olan NO’nın; pıhtı oluşumunu önlemesi, düz kas hücre proliferasyonunu suprese etmesi, vazodilatasyona neden olması ve vasküler duvara lökosit yapışmasını azaltması gibi görevleri bulunmaktadır. Tüm bu olaylar aterosklerozun başlaması ve ilerlemesinde yer alan süreçlerdir ve NO’nın anti-aterosklerotik ajan olduğu düşünülmektedir. Endotel NO biyobulunabilirliğinin azalması endotel fonksiyon kaybının yaygın bir nedenidir. Oksidatif stres endotel fonksiyon kaybının gelişmesinde direkt ve indirekt rol oynamaktadır. Endotel fonksiyon kaybında direkt mekanizma, endotel kaynaklı NO’nun süperoksit tarafından inaktive edilmesi ve peroksinitrit oluşmasıdır. NO; guanil siklazı aktive eder ve damar düz kaslarında cGMP (guanozin 3’,5’-monofosfat) oluşumunu artırarak relaksasyona neden olmaktadır. Peroksinitrit guanil siklaz için daha zayıf agonisttir ve vasküler homeostaziste önemli olan prostasiklin sentazın nitrasyonuna ve böylece enzimin inaktivasyonuna neden olur. Prostrasiklin vasküler relaksasyona neden olduğundan, prostasiklin kaybı artmış oksidatif stres durumunda endotelin fonksiyon kaybına katkıda bulunacaktır. Ayrıca peroksinitrit potent bir oksidandır, tetrahidrobiyopterin ya da eNOS’un çinko tiyolatı ile bir araya gelmesini okside eder ki bu durum eNOS’un eşleşmemesi olarak tanımlanan, eNOS’un NO yerine süperoksit radikali oluşturması ile sonuçlanır. Böylece artan süperoksit; sadece endotel kaynaklı NO’i inaktive etmez; aynı zamanda peroksinitrit oluşumu ile prostasiklin sentaz inaktivasyonuna da neden olur. Her iki mekanizma endotelin fonksiyon

kaybına katkıda bulunmaktadır. ROS ürünleri artışı indirekt mekanizma ile vasküler homeostazi etkilemektedir: oksidatif stres düşük dansiteli lipoproteinleri (LDL) okside ederek ateroskleroza ilerletmektedir. LDL'nin oksidasyonu sonucunda endotel hücre toksisitesi, endotele lökosit adezyonu ve sub endotel boşluğa lökositlerin migrasyonu oluşmaktadır. Tüm bu olaylar endotel fonksiyon kaybı sürecinde yer almaktadır. Okside LDL, NO'ı de inaktive etmektedir bu nedenle ROS oluşumunun vasküler homeostaziste ve ateroskleroza çok sayıda etkileri bulunmaktadır (21,22). Endotelde fonksiyon kaybı olması, vazodilatasyonun azalması yönünde giden çeşitli olaylar ile karakterizedir. Vasküler sistemde reaktif oksijen türlerinin artışı; endotele bağlı dilatasyonu azaltır, arter lümeninin daralması sonrasında periferik direncin ve kan basıncı artmasına neden olan hipertansiyonla birliktedir. Endotel fonksiyonunun bozulması ile antitrombotik faktörlerin kaybı protrombotik faktörlerin artışı, enflamasyon, vazodilatasyon kaybı ve düz kas hücre proliferasyonu meydana gelmektedir (20). Oksidatif stres; koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, periferik arter hastalığı ve diyabet gibi hastalıkları kapsayan kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (2). Sonuçta endotel fonksiyon kaybı; hem ateroskleroz hem de vasküler hastalıkların ilk belirtisidir. Endotel fonksiyonlarının iyileştirilmesi ya da arttırılması aterosklerozun gelişimini önleyecek, bu da kardiyovasküler hastalıkların azalması ile sonuçlanacaktır (şekil 2) (21).



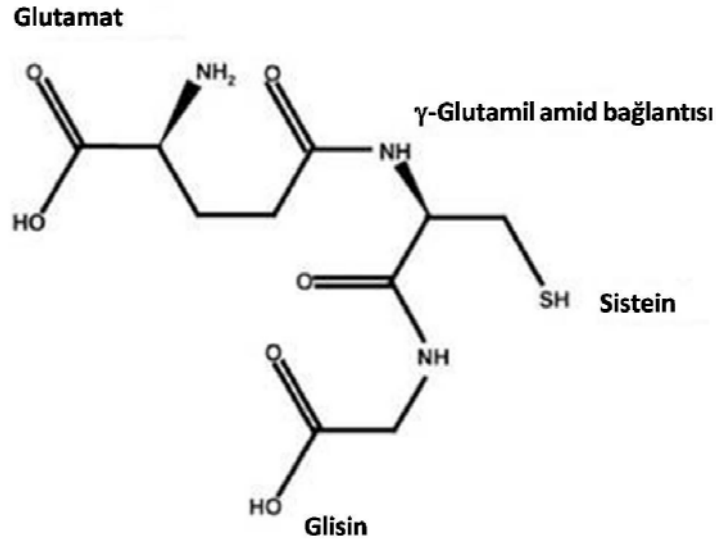
Şekil 2. Kardiyovasküler hastalıklar oksidatif stres ve endotel fonksiyon kaybı (22)

2.6. ANTİOKSİDANLAR

2.6.1. HÜCRE İÇİ ANTİOKSİDAN SİSTEMLER

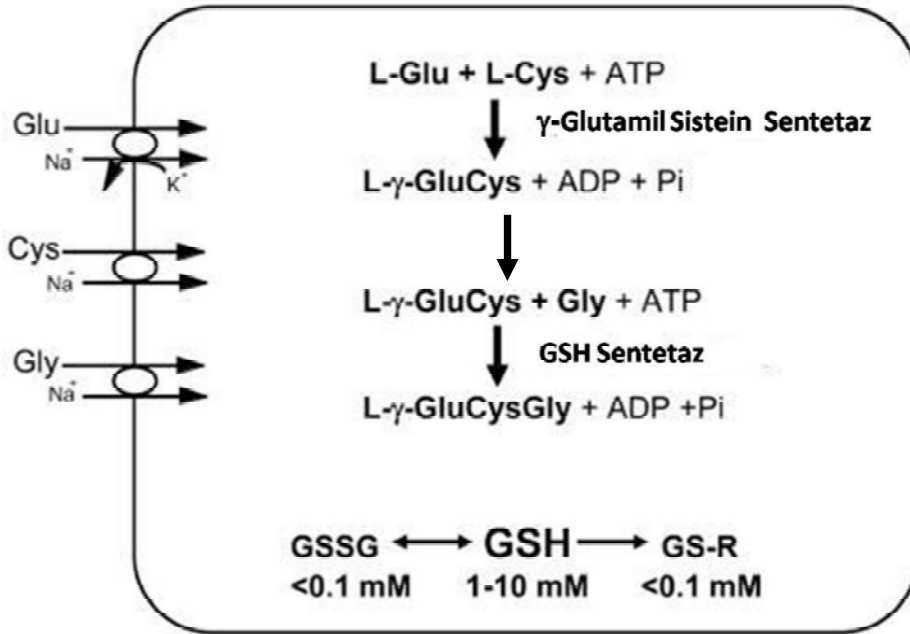
2.6.1.1. Glutasyon

Glutasyon hücresel antioksidan savunmada görev alan glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan protein olmayan bir tiyol (sülfidril) bileşiğidir (23). Hücre içi glutasyon büyük çoğunluğu (> % 98) sitozol ve çekirdekte indirgenmiş form (GSH) olmak üzere az miktarda glutasyon konjugatları (GS-R), merkaptidler (Cr, Cu (I), Cu (II), Se, Zn), tiyoeter ve tiyoester formlarının yanı sıra yükseltgenmiş disülfid dimer formu (GSSG) şeklinde bulunmaktadır. Şekil 3'de indirgenmiş glutasyonun yapısı görülmektedir. Sitoplazmada GSH/GSSG oranı 10:1'dir (24). Hücrelerdeki oksidatif stres, GSH ve GSSG durumu ölçülerek değerlendirilebilir ve sıklıkla bu ikisi arasındaki oran olarak ifade edilir. Bu oran oksidatif stresin önemli olduğu hastalıkların klinik göstergesi olarak değerlendirilmektedir (25,26). GSH, oksidatif stresin birikimini yansıtan yaşlanmaya bağlı durumda GSSG'ye yükseltgenmiş olur. Glutasyonun yükseltgenmiş formu glutasyon disülfid'tir (GSSG) (21). Hücrelerdeki GSH'ın büyük çoğunluğu sentez edildiği yer olan sitoplazmada bulunur (şekil 3)(27).



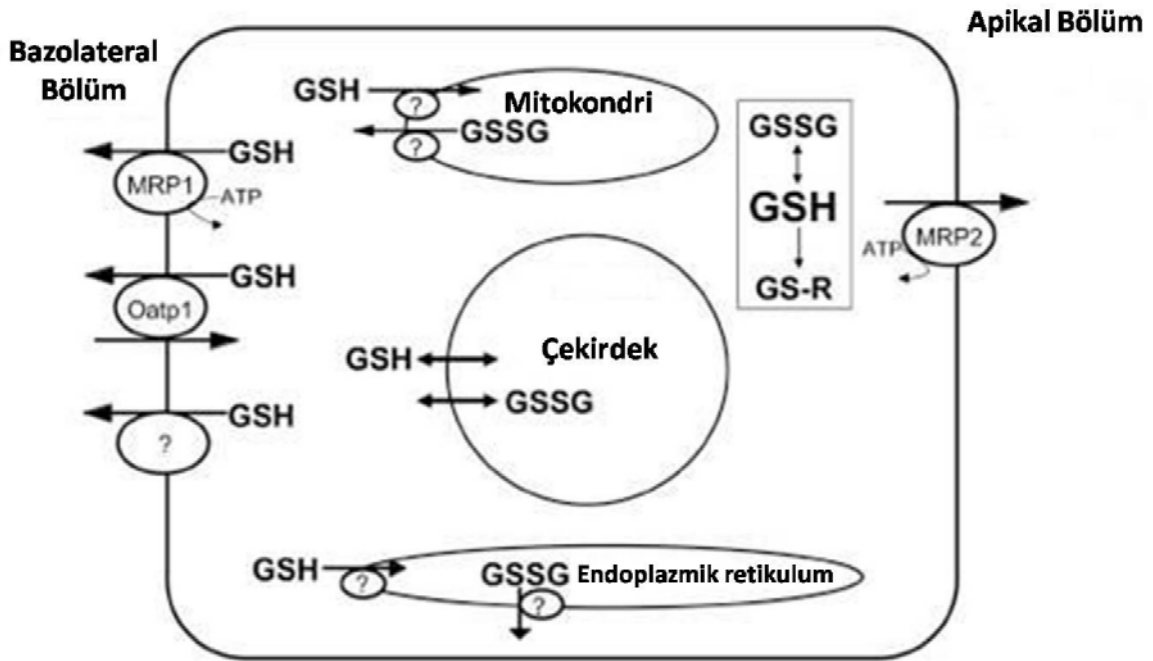
Şekil 3. İndirgenmiş glutasyonun yapısı (24)

Normal koşullarda hücre içi GSH düzeyi başlıca iki mekanizma ile düzenlenmektedir: sentez hızının kontrolü ve hücre dışına çıkması. Bununla birlikte GSH düzeyi hücrenin tiyol dengesini değiştiren çeşitli koşullar ve ajanlardan da etkilenmektedir. Bu durum glutatyon-S-konjugatları ya da komplekslerinin oluşmasına ve/veya glutatyonun hücre içi organellerinde dağılımının bozulmasına neden olmaktadır. Glutatyon düzeyi; hamilelik, egzersiz, beslenme, hormonal/stres düzeyinden de etkilenmektedir (28). GSH'ın sentezi iki enzimle hücre sitozolünde gerçekleşmektedir. GSH'ın sentezinde ilk reaksiyon γ -glutamilsistein oluşumunu sağlamak üzere L-Glutamat ile L-Sisteinin konjuge olmasıdır. Bu reaksiyonu γ -glutamil sistein ligaz olarak da bilinen γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GCS) kataliz etmektedir. γ -GCS reaksiyonunda peptidik γ -zinciri oluşturmak üzere glutamat'ın γ -karboksil grupları sistein'in amino grupları ile reaksiyona girer böylece GSH hücre içi peptidazların hidrolizinden korunmuş olmaktadır (24). Ayrıca sisteinin bulunabilirliği de GSH sentezinde hız sınırlayıcıdır. Sistein ve okside aminoasit formu olan sistin hücrelere sodyuma bağlı ve bağlı olamayan taşıyıcılarla hücreye alınmaktadır (29). İlk basamaktan sonra glutatyon sentetaz (GS) ile; γ -glutamilsistein'e glisin eklenerek glutatyon (GSH) meydana gelmektedir. Her iki basamakta da birer ATP molekülü kullanılmaktadır (Şekil 4) (30).



Şekil 4. Glutatyonun sentezi (28)

Sentezden sonra GSH mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi kompartmanlara ve hücre dışı boşluğa (kan plazması ve safra) diğer dokular ve hücreler tarafından kullanılmak üzere dağılmaktadır. Çok az miktarda akciğer sıvısı ve beyin omurilik sıvısı gibi hücre dışı boşluklara da verilmektedir. GSH ve konjugatları apikal membrandan multidrug resistanse protein 2 (MRP2) ile geçmekte halbuki kan plazmasına bazolateral membrana geçişte MRP1 ve organik anyon transport polipeptid proteinler (Oatp 1) görev almaktadır. Hücre içi transportunda aracılık eden spesifik proteinler hakkında bilinenler azdır. Glutasyonun mitokondriye geçişinin bir kısmı dikarboksilat ve okzoglutarat taşıyıcısı ile çekirdeğe geçişi ise muhtemelen çekirdek porlarından pasif difüzyonla gerçekleşmektedir. Endoplazmik retikulma geçişi ise bilinmemektedir (Şekil 5)(28).

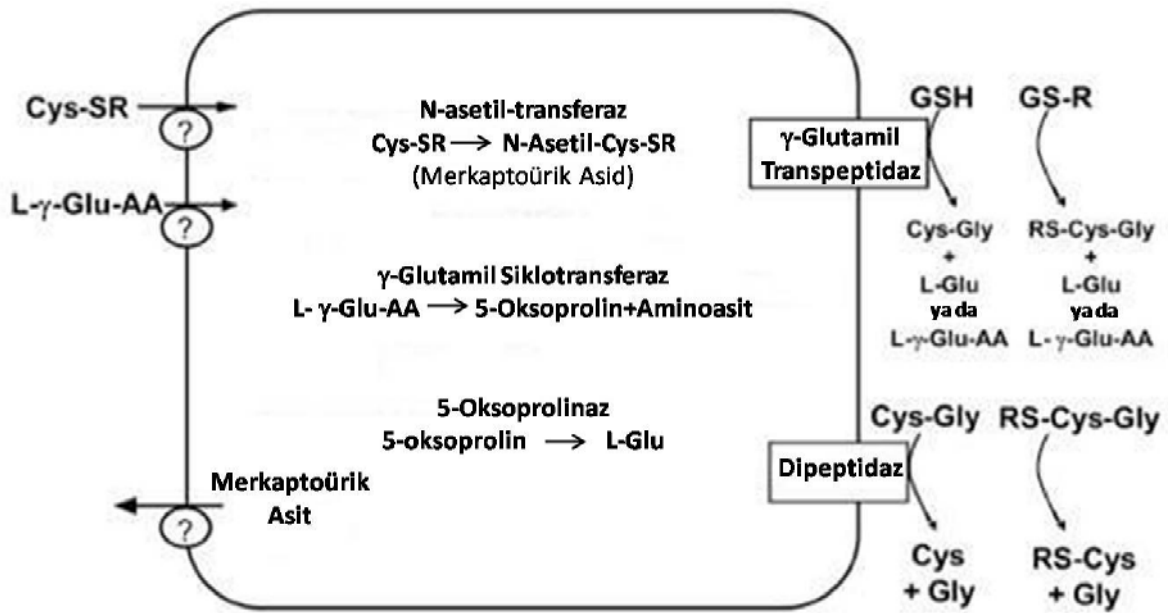


Şekil 5. Glutasyonun hücre içi dağılımı ve hücre dışına çıkışı (28)

Hücre içinde meydana gelen GSH sentezinin tersine yıkımı hücre dışında ekstrasellüler boşlukta meydana gelmektedir. Glutasyon katabolizması ekstrasellüler olarak γ -glutamil transpeptidaz enzimi ile olmaktadır. γ -glutamil transpeptidaz enzimi, hücrelerin apikal yüzeylerinde eksprese edilmekte sadece GSH'nin değil glutasyon-S-konjugatlarının ve glutasyon komplekslerinin de katabolizmasına aracılık etmektedir. γ -glutamil transpeptidaz; GSH ve GSH konjugatlarından ya hidroliz reaksiyonlarını katalize etmekte [serbest L-glutamik asit (L-Glu) + sisteinil glisin (Cys-Gly) ve sisteinil glisin konjugatları (RS-Cys-Glc) salınır] ya

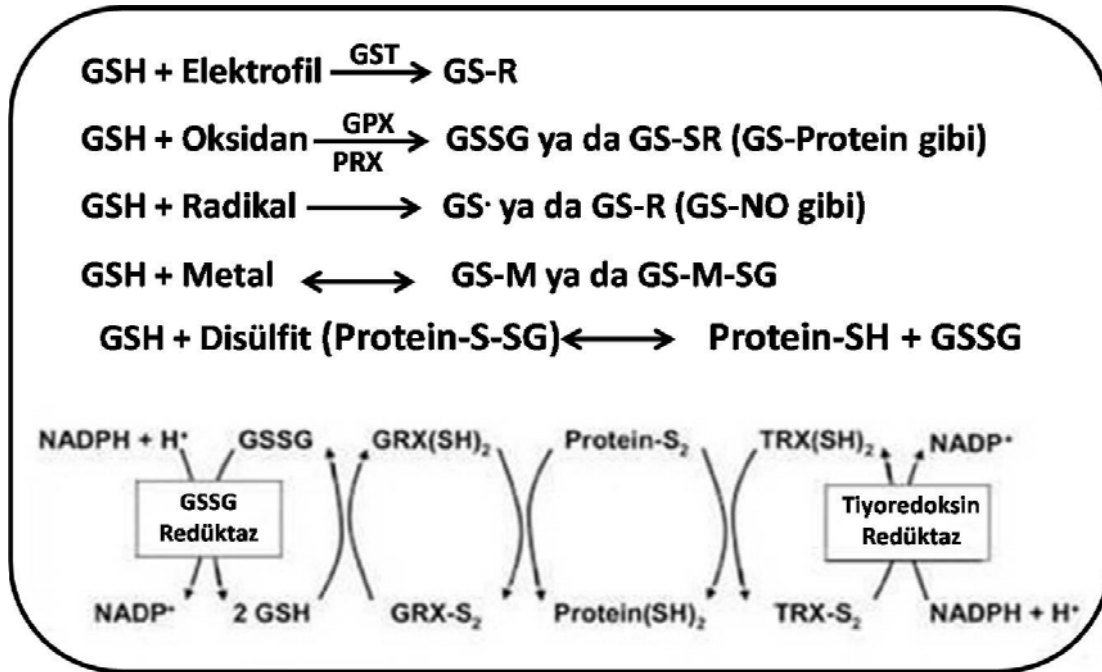
da transpeptidasyon reaksiyonunu katalize etmektedir [γ -Glutamil aminoasitler (γ -Glu-AA) + sisteinil glisin (Cys-Gly) ve sisteinil glisin konjugatları (RS-Cys-Glc) oluşmaktadır]. Transpeptidasyon reaksiyonunda oluşan γ -glutamil aminoasitleri, hücre içi enzim γ -glutamil siklotransferazın substratıdır ve tekrar hücrelere geri dönerler. γ -glutamil siklotransferaz; γ -glutamilaminoasidin 5-okzoprolin ve serbest bir aminoaside dönüşümünü kataliz etmektedir. Oluşan 5-okzoprolin, 5-okzoprolinaz ile glutamata dönüşmektedir. Transpeptidasyon reaksiyonunda oluşan diğer ürünler sisteinil glisin ya da sisteinil glisin konjugatları, sistein ile glisin arasındaki peptid bağını yıkan ektoprotein dipeptidazlar ile daha ileri hidrolize edilmektedir. Her iki reaksiyonda oluşan serbest aminoasitler ve γ -glutamil aminoasitleri hücrelere geri alınmakta ve tekrar GSH'nin oluşumunda kullanılmaktadır. Çünkü bu yol hücrelerden kaybolan GSH'nin tekrar döngüsünü sağlayan bir yoldur (Şekil 6)(24,28).

GSH ve GSH içeren bileşikler hücrelerden salınıncı, organ içinde ve organlar arasında glutatyonun yıkımı ve kullanımını söz konusudur Glutatyonun metabolizmasının başlıca yeri olan karaciğerde; sinüzoidal bölümlerin yanı sıra safra boşluğunda katabolizması, yıkım ürünlerinin bazılarının karaciğerden tekrar emilimi, sistein-S-konjugatlarının merkaptöürik aside dönüşümü ya da aminoasitlerin kullanımı gibi olaylar gerçekleşmektedir. Sistein -S- konjugatları (Cys-SR) N-asetil transferaz enziminin substratıdır, tekrar hücrelere döner ve N-asetil- sistein- konjugatları (N-asetil- sistein- SR ya da merkaptöürik asit) oluşur. Merkaptöürik asit hücrelerden dışarı çıkar, feçes ya da idrarla atılır. Merkaptöürik asidin transport mekanizması belli değildir.



Şekil 6. Glutatyonun katabolizması (28)

GSH; koenzim, kofaktör ve /veya bir çok enzimin substratıdır ve konjugasyon ve redoks reaksiyonlarına katılmaktadır. Oksidatif stres ya da elektrofilik bileşiklere maruz kalındığında, hücre içinde GSSG ve glutatyon-S-konjugatları (GS-R) oluşmaktadır. Konjugasyon reaksiyonları kendiliğinden meydana gelmekle birlikte bir nükleofil olarak GSH; glutatyon transferaz'ın (GST) katalize ettiği reaksiyonda çeşitli elektrofillerle (ksenobiyotik ya da endojen metabolitler) reaksiyona girmekte böylece GSH-konjugatlarını oluşturmaktadır. GSH; glutatyon peroksidaz (GPx) ile oksidanların indirgenmesini, glutaredoksin (GRX), peroksiredoksinler (PRX) ve tiyoredoksinler (TRX) aracılığı ile de proteinlerin tiyol gruplarının denge durumunun sürdürülmesini sağlamaktadır (Şekil 7)(28).

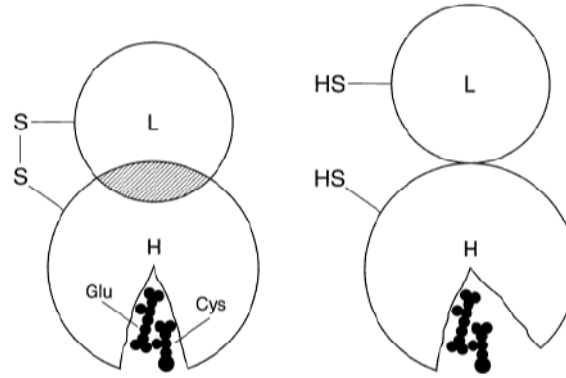


Şekil 7. Glutatyonun redoks ve konjugasyon reaksiyonları (28)

2.6.1.2. γ -Glutamil Sistein Sentetaz (EC 6.3.2.2)

Glutatyonun *de novo sentezinde* hız sınırlayıcı enzim olan ve daha önceleri γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GCS) olarak da bilinen glutamat sistein ligaz (GCL) enzimi 73 kDa ağırlığında, tüm substratları bağlama yeri içeren ağır alt birim (katalitik, GCLC) ve 28 kDa (düzenleyici, GCLR) ağırlığında substrat ve inhibitörlere bağlanmada ağır altbirimin afinitesini düzenleyen hafif alt birimden oluşan bir heterodimerdir (31). γ -GCS enzimi altbirimler arasındaki disülfid bağı ile stabilize edilmektedir. γ -glutamat sistein sentetaz reversibl disülfid bağları oluştuğunda aktive olmakta, disülfid bağının varlığı veya yokluğu enzimin substrat veya inhibitörlere karşı affinitesini düzenlemektedir (32,33). Disülfid bağı GSH'ın fizyolojik konsantrasyonunda (0.5 ile 10 mM) indirgenmekte; GSH düzeyinin azalması disülfid bağı oluşumu ve optimum enzim aktivitesi oluşumunu attırmaktadır. İnsanda ağır alt birimde 14 sistein, hafif alt birimde 6 sistein bulunmaktadır. Optimum enzim aktivitesi için gereken disülfid bağları en az iki çifttir. Bir çift disülfid bağı ağır alt birim ve hafif alt birim arasındadır. İkinci disülfid bağı molekül içindedir. Fizyolojik konsantrasyonlarında glutatyon, GSH'ın feedback inhibisyonu (geriye doğru besleme) yönünde γ -glutamat sistein sentetaz enziminin konformasyonunda değişiklik meydana getirerek moleküller arası disülfid bağı indirgemektedir. İnsan ağır alt birim kromozomun 6p12'de haritalanmıştır. Tek kopya geni ve üç alleli bulunmaktadır. İnsan hafif alt birim ise 1p21'de haritalanmıştır, tek kopya geni vardır (32).

Çeşitli bileşikler γ -glutamil sistein sentetaz aktivitesini arttırarak redükte glutatyon düzeyini arttırmaktadır (22). Huang ve ark. (33) yaptıkları çalışmalarında γ -glutamil sistein sentetaz enziminin ağır ve hafif alt birimleri arasında disülfid bağı oluştuğunda substrat bağlama yerinin sıkı hale geçtiğini, GSH ve diğer tripeptidlerin bağlamasının zorlaştığını; subünitler arası disülfid bağının indirgenmesinden sonra konformasyonel değişiklik ile substrat bağlanma yerinin gevşek duruma geçtiği ve tripeptidlerin kolay bağlanabildiğini göstermişlerdir (Şekil 8).



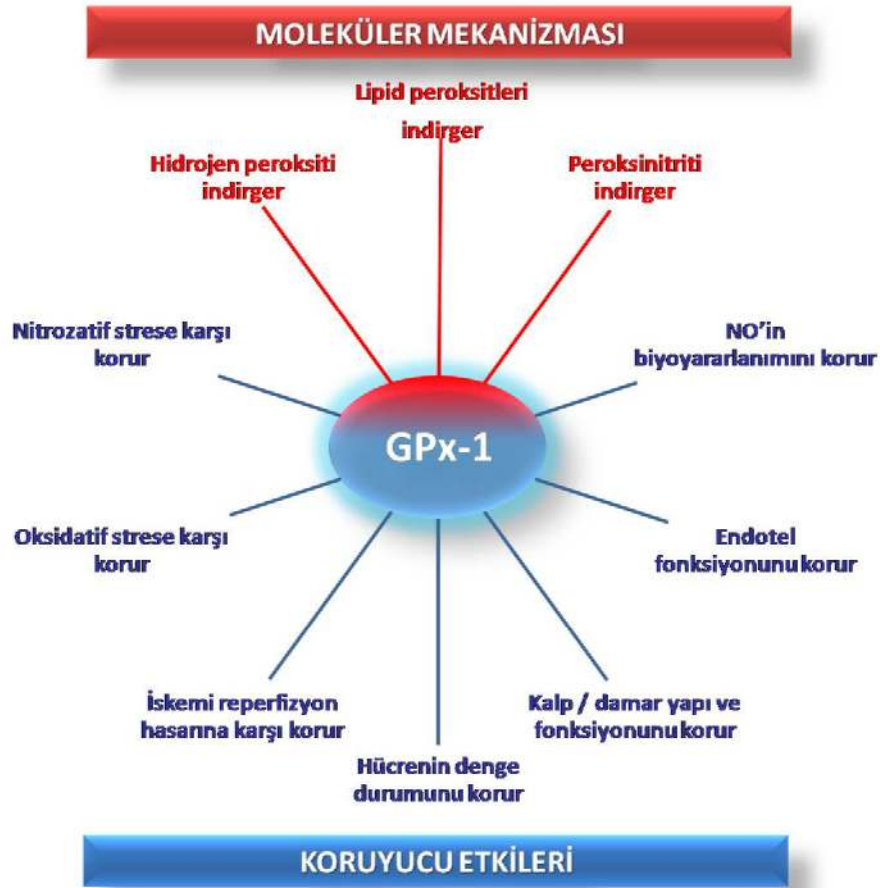
Şekil 8. γ -GCS enziminde disülfid bağı oluşumu ve indirgenmesini gösteren bir model (33)

γ -GCS aktivitesini ve/veya mRNA'sını azaltan/arttıran uyarılar ve oluşan cevap konusunda bilinenler azdır. Bu değişikliklerden sorumlu mekanizmalar tamamem bilinmemektedir. De novo glutatyon sentezinin düzenlenmesi en az üç faktör ile olmaktadır: hücrelerde γ -GCS düzeyi, substrat bulunabilirliği (özellikle sistein) ve γ -GCS üzerinde GSH'ın feed back inhibisyonu. γ -GCS aktivitesi, nitrozasyon ve fosforilasyon ile de düzenlenebilmektedir (33). Glutamat ve glisin hücre içi konsantrasyonu yüksek olduğundan, GSH biyosentezini sınırlandıran sistein konsantrasyonudur. Bu yüzden hücrelere alınan sistin ve sisteinin artışı GSH biyosentezini arttırmaktadır (27). GSH, γ -GCS'nin non allosterik feed back inhibitörüdür, GSH enzime bağlanmada glutamat ile yarışmaktadır (27).

2.6.1.3. Glutatyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz (glutatyon:H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9; GPx) Mills tarafından hemoglobini oksidatif yıkımdan koruyan eritrosit enzimi olarak ilk defa 1957 yılında keşfedilmiştir. Glutatyon peroksidazlar endotel hücrelerinde eksprese edilen başlıca selenoproteinlerdendir. Endotelde selenoproteinlerin rolü, oksidatif hücre hasarından koruma yeteneği ile ilgilidir. Endotelde hidroperoksitleri indirgeyerek endotel hücresinin fizyolojisinin sürdürülmesi ve oksidatif hasardan korunmasını sağlar. Endotel hücresinde özellikle süperoksit, hidroperoksit ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen türleri ve nitrojen ürünleri oluşmaktadır. Bu ürünlerin metabolizması ve fizyolojik fonksiyonları glutatyon peroksidazlar ile düzenlenmektedir. Endotelde selenoproteinler; hücre adezyon moleküllerin ekspresyonunu kontrol ederek hücre adezyonunu, siklooksijenaz ve lipoksijenaz aktivitesini kontrol ederek eikosanoid oluşumunu, süperoksit anyon/nitrik oksit dengesini sağlayarak vasküler tonusun düzenlenmesinde görev alırlar (34,35). GPx'den ilk keşfedileni ve sitozolik veya hücresel

GPx'de denen GPx-1'dir. GPx-1; H_2O_2 'i ve kolesterol ve uzun zincirli yağ asiti peroksitlerini içeren bir grup organik hidroperoksitleri metabolize etmektedir (36). 1970'lerin başında iki grup, GPx-1'in selenyuma bağlı enzim olduğunu göstermiştir. Daha sonraları GPx-1 proteininde selenosistein (Sec), selenyumun bir kısmı olarak tanımlanmıştır. Günümüzde selenosistein, sisteine benzemesine rağmen yirmi birinci aminoasit olarak bilinmektedir. Selenosistein, GPx-1'in katalitik bölgesinde bulunmakta ve sisteine yapısal olarak benzemektedir (37). GPx'ler selenyum-bağımlı GPx'ler ve selenyum-bağımsız GPx'ler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Glutasyon peroksidazın birinci formu (GPx-1); bütün türlerde GPx-1 her biri bir selenosistein rezidüsü taşıyan ve molekül ağırlığı 22–23 kDa olan dört alt üniteden oluşmuş homotetramerik bir proteindir (36, 38). GPx-1'in moleküler mekanizmaları ve işlevleri şekil 9'de gösterilmektedir.



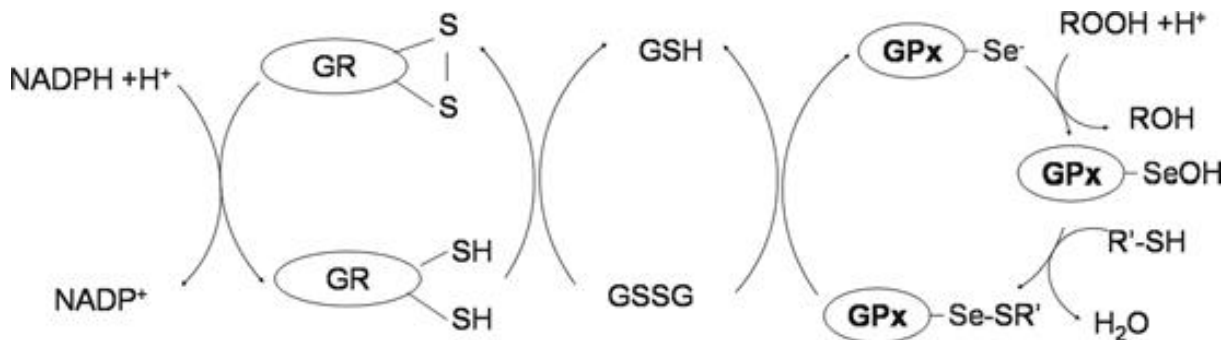
Şekil 9. Glutasyon peroksidaz-1'in moleküler mekanizmaları ve işlevleri (39)

Sitozolde bulunan glutatyon peroksidazın ikinci formu gastrointestinal veya GI-GPxG1 olarak adlandırılmaktadır. GPx-2 olarak adlandırılan bu formu, GPx-1 ile % 60 amino asit dizi benzerliği göstermektedir. H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksitleri indirgerler, fakat fosfolipid hidroperoksitlere etkileri yoktur (36).

GPx-1'in keşfinden sonra, birçok yıl plazmadaki GPx aktivitesinin karaciğer ve farklı organlardaki enzimin sızıntısından kaynaklanabileceği düşünüldü. Selenyum arttığında enzim aktiviteleri artmakta, azaldığında plazma GPx aktivitesi azalmaktaydı. Plazma GPx'i (GPx-3), GPx-1 ile benzer substrat spesifitesi göstermekte ve fakat kırmızı kan hücrelerini presipite eden GPx-1 antikorları ile reaksiyona girmemektedir. Çalışmalarda GPx-3'ün alt birimlerinin moleküler ağırlığının 23–25 kDa olduğu ve GPx-1 ile % 40–50 arasında homoloji gösterdiği öngörülmektedir (36).

Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz [(PHGPx, GPx-4); 20–22 kDa ağırlığında monomerik yapıdadır ve substrat olarak lipid peroksitlerin yanısıra H_2O_2 'de kullanılmaktadır. GPx-3 hücre dışında işlev gören bir glikoproteindir. Glutatyon peroksidaz benzeri diğer proteinler; selenyum-bağımsız olanlar selenosistein yerine sistein içeren glutatyon peroksidazlardır (36).

Epididime spesifik glutatyon peroksidaz (GPx-5)] ve olfaktör epitelyumunda bulunan (GPx-6). Bu enzimler peroksitlerin yıkımında substrat spesifiteleri ve dokulardaki dağılımı farklılık göstermektedirler (36). Yapıları arasında da çeşitlilik vardır; GPx-1,2,3 90 kDa homotetramerik yapıda, altbirimlerinin molekül ağırlığı 22–25 kDa'dur; GPx-4 20–22 kDa ağırlığında monomerik enzimlerdir. GPx'ler; glutatyon redüktaz ve GSH aracılığı ile NADPH'dan elektron alarak hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize ederler böylece hücreleri oksidatif strese karşı korurlar (Şekil 10) (38).



Şekil 10. NADPH'dan GSH ve Glutatyon redüktaz aracılığı ile elektron transferi (35)

2.6.1.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1.6.4.2)

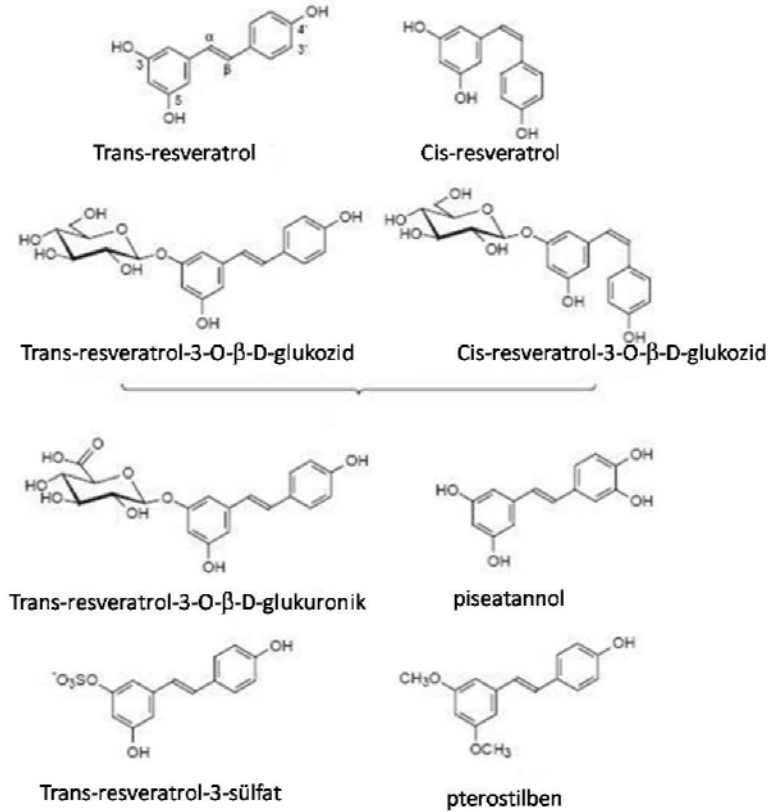
ROS'un hem enzimatik hem de enzimatik olmayan detoksifikasyonu GSH'dan GSSG oluşumu ile sonuçlanır. GSSG'deki artış hücrelere zararlı olduğu için GSSG sıklıkla hücrelerin dışına transport edilir bu da total GSH'un azalması ile sonuçlanır. GSSG'nin elimine etmek için daha ekonomik olan yol, glutasyon redüktaz aktivitesi iledir ve NADPH'a bağlı bir reaksiyonla GSSG'den GSH oluşmaktadır. Mitokondri ve sitoplazmada yer alan glutasyon redüktaz, disülfid bağı ile bağlanmış homodimer şeklindedir. Glutasyon redüktaz aktivitesindeki artışa birbirinden ayrı iki mekanizma aracılık edebilir: birincisi Glutasyon redüktaz aktivitesi ve/veya düzeyinde artış, ikincisi hücrelerde NADPH kaynağı olan pentoz fosfat şantının aktivitesinin artarak NADPH düzeyinde artış. Glutasyon redüktaz; FAD-içeren piridin nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesindendir. Aktif enzim; her biri FAD, NADPH ve GSSG için bağlanma yerleri içeren iki altbirimden oluşmaktadır. Enzim NADPH'dan GSSG'ye elektron akışında önemli rol oynayan redoks-aktif disülfid de içerir. Glutasyon redüktaz, okside glutasyonu indirgenmiş hale dönüştürürken, NADPH'dan gelen elektronlar yükseltgenmiş glutasyonun disülfid bağına direkt olarak aktarılmaz. Önce FAD'ye aktarılır. Enzimin katalizlediği reaksiyon sırasında FAD, NADPH tarafından indirgenir. Bundan gelen elektronlarda enzimin aktif merkezinde iki sistein rezidüsü arasındaki disülfid bağına (-S-S) aktarılır. Bu şekilde -SH grupları GSSG ile etkileşime girerek GSSG iki GSH'a indirgenmektedir. Fizyolojik şartlarda reaksiyon esas olarak tek yönlüdür ve glutasyon redüktaz bu yolla hücre içerisinde GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlamaktadır (şekil 10)(27, 33).

2.6.2. HÜCRE DIŞI ANTİOKSİDAN

2.6.2.1. Resveratrol

2.6.2.1.1. Yapısal Özellikleri

Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir. Tümü fenil alanin türevidir ve reaktif hidroksil grubu olan aromatik halka içerirler. Stilbenlerin alt sınıfı içinde yer alan resveratrolün (3,5,4'-trihydroxystilbene) *trans* ve *cis* izomerik formları bulunmaktadır. *Trans* izomeri bitkilerde daha fazla bulunduğundan dolayı, üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Resveratrol doğada 3-O- β -glukozidler (glikozile) şeklinde bulunur: "Piseidler". Resveratrolün minör konjuge formları 1-2 metil grubu (3,5-trimethoxy-4'-hydroxystilbene: "Pterostilben"), bir sülfat grubu ya da yağ asiti içermektedir. Yer değiştirme en fazla iki hidroksil grubu ile olmaktadır, böylece konjuge polifenoller antioksidan durumun sürdürülmesini sağlamaktadır. Doğal olarak oluşan resveratrol analogları üç hidroksil grubundan ziyade dört hidroksil grubu taşıyan "piseatannol" (3,4,3',5'- *trans*-tetrahydroxystilbene) formunda bulunmaktadır (Şekil 11) (4).



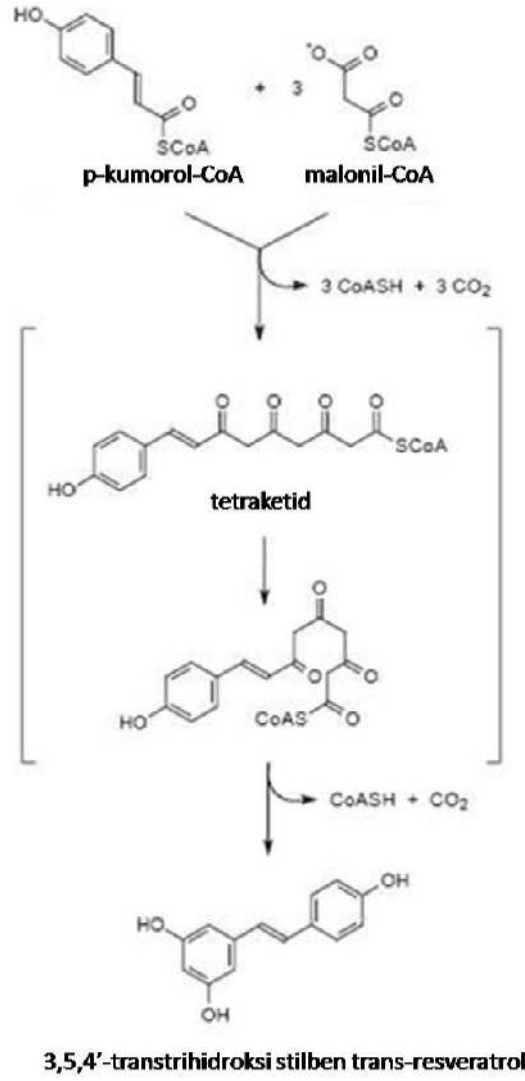
Şekil 11. Resveratrol ve konjuge formlarının yapısal formülleri (4)

2.6.2.1.2. Kaynakları

Resveratrol ve analogları (piceatannol, pterostilben) üzüm, şarap, yer fıstığı, yabanmersini, dut, çilek, böğürtlen ve keçiboynuzunda bulunmaktadır. Resveratrol 1976 yılında üzümde fitoaleksinin olarak keşfedilmiştir. 1982 yılında resveratrolün Çin ve Japonya'da Kojo-kon (Kojo-kon: Itadori çayı olarak da bilinmektedir) olarak adlandırılan; cilt enfeksiyonları, fungal enfeksiyonlar, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarında kullanılan "Polygonum cuspidatum"un kurutulmuş köklerinde bulunduğu bildirilmiştir. İnsan diyeti genistein, kuarsetin, epigallocateşin (soya fasulyesi, yeşil çay ekstresi) ve resveratrol (üzüm kabuğu, yer fıstığı) gibi çok sayıda bitki kaynaklı polifenol içerir. 1970'li yılların başlarında Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı saptanmıştır: "Fransız paradoksu". Daha sonraları bu molekülün pek çok yararlı etkileri tanımlanmıştır (4, 40) *Trans* izomeri daha stabildir ve UV, yüksek pH ile *trans* izomeri *cis* izomerine dönüşürken görünür ışık ve düşük pH'da *cis* izomeri *trans* izomerine dönüşmektedir (5).

2.6.2.1.3. Biyosentezi

Resveratrol sınırlı sayıda bitkiler tarafından sentezlenir. Normalde fazla miktarda bulunmaz, strese cevap olarak üretilir. Biyosentezini stilben sentaz enzimi kataliz eder. Resveratrolün biyosentezi malonil-CoA'dan üç C₂ ünitesi ile *p*-kumarol-CoA'nın *p*-kumarol kalıntısının dekarboksilasyon ile kondensasyon sonucu meydana gelir. Daha ileri reaksiyonları bifenolik halkanın 3. pozisyonunda doğal resveratrolün glikozil ya da sülfat kalıntılarına konjuge olmasıdır (Şekil 12). Resveratrol oksidatif yıkıma daha duyarlı iken glikozillenmiş piceid formu daha dirençlidir. Glikozillenmiş resveratrol biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlar, daha fazla çözünür ve stabildir, böylece insan barsağından daha kolay emilmektedir (4).



Şekil 12. Resveratrolün biyosentezi (4)

2.6.2.1.4. Diyetle Alınan Resveratrolün Emilimi

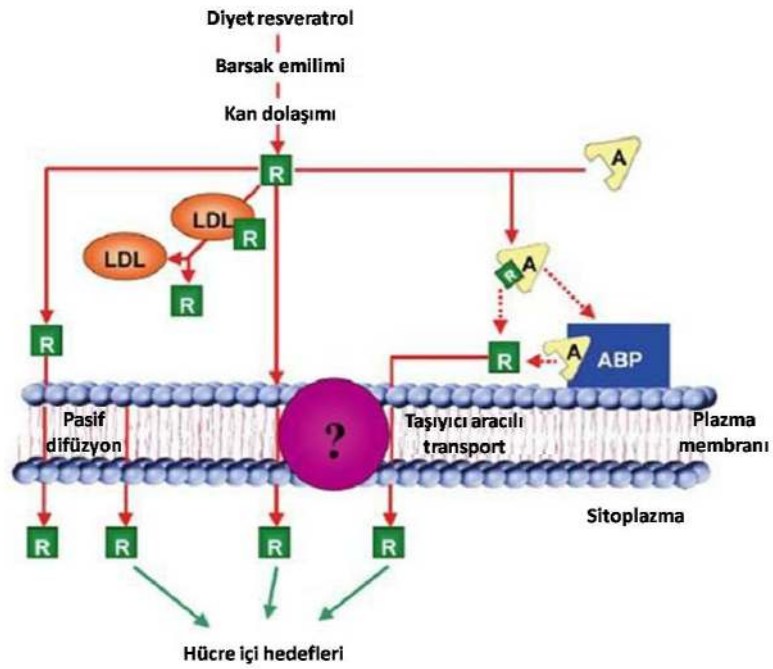
İnsan barsak Caco-2 hücrelerinde diyetle alınan resveratrolün çoğunlukla barsak düzeyinde emildiği gösterilmektedir. Resveratrolün emilimi ve taşınması sıçan barsak, insan kolon karsinom Caco-2 hücre hattı, insan hepatosit ve sağlıklı bireyler gibi bir çok modelde çalışılmıştır. Sıçan ince barsak modelinde resveratrol fazla miktarda jejunumdan, az miktarda da ileumdan emilmektedir. Bazolateral tarafa transport edilen resveratrolün çoğu glukuronid ve sulfat formunda konjuge edilir. Tüm perfüze edilen resveratrol ve konjugatlarının yalnızca % 6'sı barsak epiteli geçmektedir (4). Resveratrol diyet ürünlerinde *cis* ve *trans* şeklinde bulunur, çoğunlukla glikozillenmiş formu 3-O-beta-D-glukozid'tir. Glikozilasyon resveratrolün

enzimatik olarak oksidasyonunu inhibe eder ve böylece biyolojik aktivitesini korur, stabilitesini ve biyoyararlanımını artırır. Barsak hücrelerinde sadece aglikone resveratrol emilebildiği için emilim sürecinde glikozidazlar gerekir. Bu nedenle, yiyecekteki aglikone ve glikozile resveratrolün birbirine oranları emilim hızını düzenler. *Trans*-piseidin deglikozile edilmesi ince barsakta laktaz florizin hidrolaz [Lactase phlorizin hydrolase (LPH)] ve sitozolik- β -glukozidaz [Cytosolic- β -glucosidase (CBG)] tarafından gerçekleşmektedir. Enterositlerden geçişte *trans*-piseidin 2 yolu vardır: Birinci yol apikal membran üzerinde bulunan LPH iledir. Lümene aglikon *trans*-resveratrol olarak salınır. Daha sonra apikal membrandan pasif olarak difüze olur. İkinci yol sodyuma bağlı glukoz transporter 1 [Sodium-dependent glucose transporter1 (SGLT1)] ile fırçamsı kenar (brush-border) membranını geçtikten sonra CBG ile glukozidlerin yıkımıdır. Deglikozilasyondan sonra *trans*-piseidden *trans*-resveratrol oluşmaktadır. *Trans*-resveratrol enterositlerde daha ileri metabolize edilir, oluşan yeni bileşik glukuronat konjugatlarıdır. Major glukuronat *trans*-resveratrol-3-O- β -glukuronidtir. Minör olanı ise, *trans*-resveratrol-4'-O- β -glukuronidtir. *Trans*-resveratrolün glukuronidasyonu sadece karaciğerde değil enterositlerde de UDP-glukuronoziltransferaz [UDP-glucuronosyltransferase (UGT)] ailesinden UGT1A1 ile olmaktadır. Glukuronokonjugatlar enterositlerden lümene ekskrete edilir. Metabolitlerin apikal membrandan pasif olarak difüze olması negatif yüklerinden dolayı fizyolojik pH'da mümkün değildir. Bu bileşikler MRP ailesinden [multidrug resistance associated protein family (MRP)] özellikle MRP2 ile dışarıya atılır. MRP2 yalnızca apikal membran üzerinde bulunmaktadır. MRP2 akış pompası hem *trans*-piseidin hem de *trans*-resveratrolün dışarıya akışı ile ilgilidir. Hücrede doğal form (piseid ya da resveratrol) glukuronidlerden daha fazladır (şekil 13) (41).

Şekil 13. *Trans*-resveratrol ve *trans*-piseidin emilimi (41)

2.6.2.1.5. Diyetteki Resveratrolün Dokulara Transportu

Resveratrolün hidrofilik konjugatlarına dönüşümü kana geçişini, vücutta dağılımını ve atılımını kolaylaştırır. Hayvan çalışmalarında resveratrolün oral alındıktan sonra aglikone ve konjuge formlarının kanda saptandığı gösterilmektedir. Resveratrol oral yolla alındıktan birkaç saat sonra dokulara dağılmaktadır. Zamanla ikinci pik görülünceye kadar plazma konsantrasyonu azalmaktadır. İkinci pik safradan salındıktan sonra tekrar dolaşıma girmesinden kaynaklanmaktadır. Resveratrol ve metabolitleri karaciğer ve safra kesesi tarafından kandan filtre edilerek safra ile barsaklara atılır. Daha sonra tekrar geri emilime uğramaktadır. Resveratrol oral yolla alındıktan kısa süre sonra kolonda bulunur. Ancak dokulara dağılımı birkaç saati alır. İnsan karaciğer hücrelerine resveratrolün alımı ve metabolizması *in vitro* modellerde çalışılmıştır. İnsan karaciğer hücrelerine resveratrolün alımı başlangıçta artış gösterirken (dakikalar içinde) daha sonra stabil olmaktadır (saatler içinde). Resveratrolün düşük konsantrasyonunda, hepatosit hücre içine alımında, sıcaklığa hassas aktif taşıyıcılar aracılık ederken yüksek konsantrasyonda ise molekül doygunluğa ulaşmayacak şekilde fakat konsantrasyona bağlı olarak hücrelere difüze olmaktadır (4). Hepatoblastoma hücrelerinde, resveratrolün pasif difüzyon ve olasılıkla taşıyıcı aracılı mekanizma ile hücre içine alındığı gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonda, total alımın yarısından fazlası taşıyıcı aracılı mekanizma ile olmaktadır. Fizyolojik koşullarda bu mekanizma, özellikle albumin olmak üzere serum proteinlerine bağlı olmasına rağmen kan dolaşımında bulunan resveratrolün hepatik hücrelere alımını sağlamaktadır. Taşıyıcı aracılı transportta iki hipotez ileri sürülmektedir. Birincisi: aktif taşıyıcının organik anyon transport polipeptid olabileceği, diğeri resveratrol-albumin kompleksine bağlanan albuminin taşıyıcı proteinler ile resveratrolün hücre içine alınabileceğidir. Resveratrol-albumin kompleksinin albumin membran reseptörü tarafından tutulacağı ve daha sonra hücre membranında serbest bırakılacağı varsayılmaktadır (Şekil 14) (42).



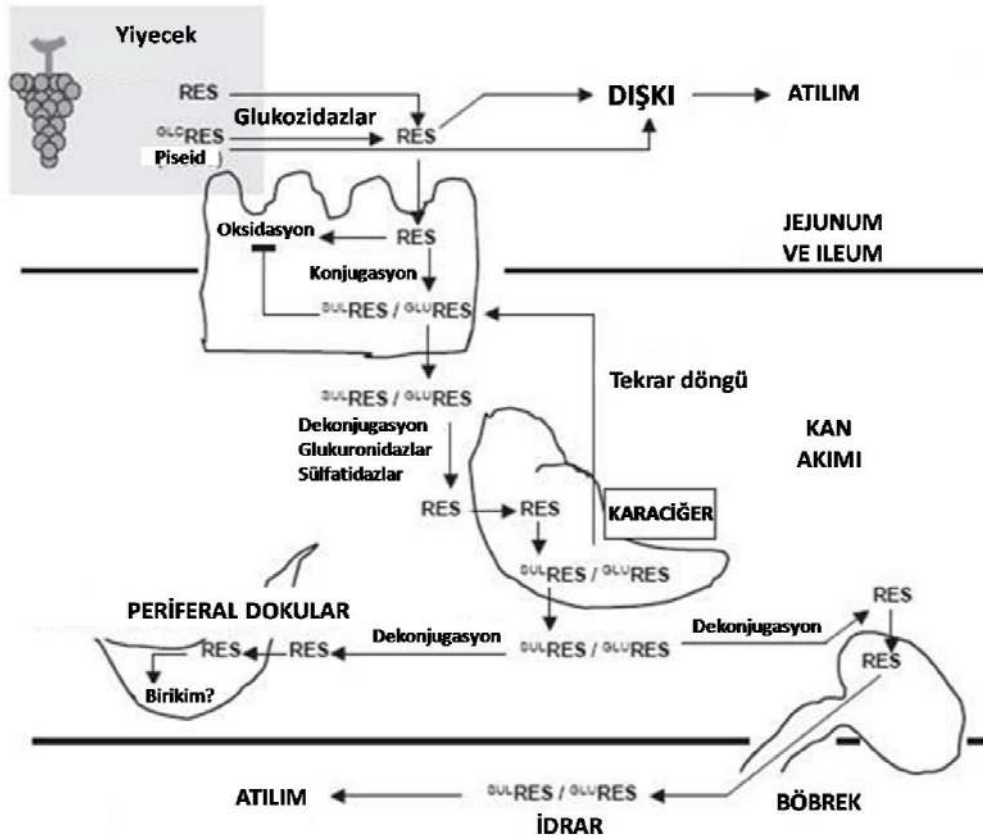
Şekil 14. Resveratrolün plazmadan hücre içi hedeflere olası yolları
(A: Albumin, B: Resveratrol) (42)

Albuminin çok sayıda amfifilik molekülü taşıdığı ve bağladığı bilindiğinden resveratrolün plazmada taşıyıcısı olarak iyi bir adaydır. İnsan serum albumin ve sıçan plazma albumin ile resveratrolün etkileşiminin olduğu gösterilmiştir. Serbest yağ asitlerinin albumin'e resveratrolün bağlanmasında pozitif etkileri olduğu gösterilmiştir (42).

Resveratrolün hücre içi reseptörleri konusunda bilinenler çok azdır. Resveratrolün aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanan digoksinin yarışmalı antogonisti olduğu gösterilmiştir. Resveratrol, AhR'nin nukleusa tranlokasyonunu sağlamaktadır. Genistein ve resveratrol gibi fitoöstrojenler, insan östrojenleri ile bazı yapısal benzerlikler göstermekte ve östrojen reseptörüne bağlanabilmektedir böylece östrojene cevap veren düzenleyici genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Dietil stilbestrerole benzeyen yapısından dolayı "fitoöstrojen" olarak da tanımlanan resveratrol estradiol ile kombine olduğunda "süperagonist" olarak fonksiyon görmektedir. Son yapılan çalışmalarda resveratrolün her iki izomerinin ılımlı konsantrasyonda ($>10 \mu\text{M}$) yalnızca süperöstrojen etkinliğine sahip olduğu; daha düşük konsantrasyonlarda ($<1 \mu\text{M}$) antiöstrojenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Resveratrol meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak rol oynamaktadır (42).

2.6.2.1.6. Diyetle Alınan Resveratrolün Atılımı

Hayvan modelinde resveratrolün böbreklerden atılımının saatler içinde başladığı ve 12-24 saat sonra arttığı gösterilmiştir. Böbrekte başlıca aglikon (doğal) formda bulunurken, idrarda konjuge formu çoğunluktadır. İnsanda atılım zamanı resveratrolün plazmada bulunan konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Başlangıç ile atılım miktarı arasında korelasyon bulunmamaktadır. Çok küçük miktarda resveratrol hızla metabolize ve elimine olurken; belirli dozun üzerinde resveratrol dokularda alıkonulmakta ve birikmekte böylece hücre alımı ve hücre içi sinyalleme için hazırda bulunmaktadır. Resveratrolün metabolizması ve atılımı ile ilgili birçok soru işareti bulunmaktadır. Resveratrolün konjuge formlarının dokulara transportu ya da atılımı için hedeflenmesi henüz açıklanmamıştır. *İn vitro* çalışmalarda resveratrolün yalnızca aglikon formu kullanıldığından hepatositlerde resveratrolün konjuge formlarının kan akışından hangi yola (emilim ya da atılım) hedefleneceği henüz bilinmemektedir (Şekil 15)(4).



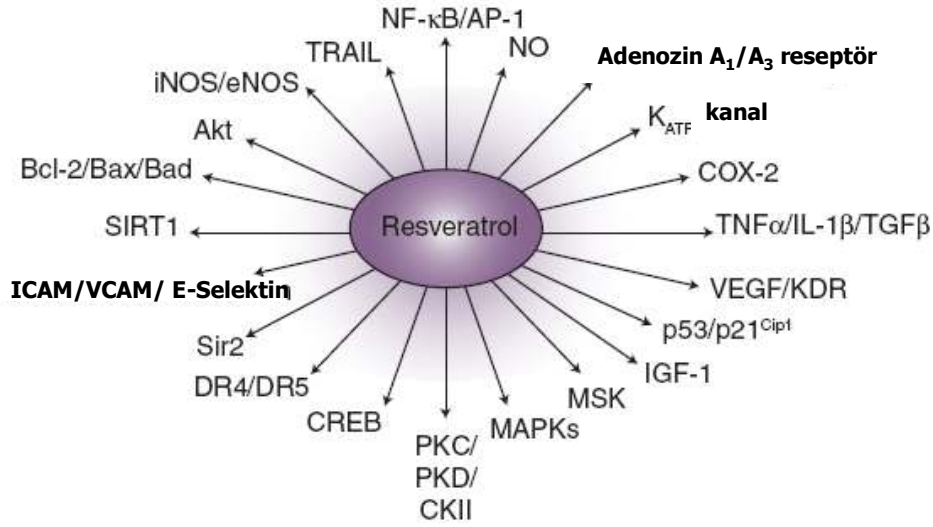
Şekil 15. Resveratrolün metabolizması (4)

2.6.2.1.7. Resveratrolün Sinyal İleti Yolları

ROS; NFκB, ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ve mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) fosforilasyonu ve aktivasyonu ile enflamasyonu arttırmada önemli rol oynamaktadır. Kronik enflamasyon, kanser, kardivasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklara neden olmaktadır. Resveratrol MAPK kaskadını harekete geçirebilir. MAPK'ların yolun aşağısına doğru hedefleri mitojenik proinflatuar enzimler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir. Resveratrol, farklı düzeylerde rol oynayabilir. Resveratrol protein kinaz C (PKC) fosforilasyonunu inhibe ederek yolun yukarısına doğru rol oynayabilir. Resveratrol MAPK kaskadını aktive eden diğer kinazların fosfotidilinozitol-3-kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve protein kinaz B'nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu inhibe edebilir. Bu olaylar ile resveratrol vasküler düz kas hücrelerinde p70 ribozomal protein S6 kinaz'ın (p70^{S6K}) fosforilasyonunu azaltır. Resveratrol ERK1/2/JNK/p38 kinaz'ın tirozin fosforilasyonunu ve vasküler hücrelerde nükleusa translokasyonunu inhibe ederek MAPK kaskadını aşağıya doğru baskılar. Fosforilasyonun ve sitoplazmadan nükleusa translokasyonun inhibisyonu vazokonstriksiyon, anjiyogenez, proliferasyon ve diferansiyasyon ile ilgili genlerin ifadenmesini azaltmaktadır. MAPK'ların (JNK, ERK1/2 ve p38 kinaz) programlanmış hücre ölümünde, farklılaşmada ve hücrenin normal proliferasyonunda önemli rolleri bulunmaktadır (43).

Resveratrolün *in vitro* MAPK sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Domuz koroner arterlerinde yapılan çalışmada resveratrolün ERK1/2, p38 kinaz ve JNK fosforilasyonunu azaltarak MAPK aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada da resveratrolün hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekül-1 (VCAM) gibi adezyon moleküllerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Resveratrolün trombosit agregasyonunun inhibe etmesi kardiyoprotektif etkisinde bir başka mekanizmasıdır (43).

Okside LDL (oxLDL) ve ROS gibi uyarılar, NF-κB yolunu aktive etme potansiyeline sahiptir. NFκB, sitoplazmada inhibitör κB (IκB) ile birlikte iken inaktif kompleks olarak bulunur. Uyarana yanıt olarak olarak IκB kinaz kompleksinin katalitik alt birimi (IKK), IκBα'nın iki serin aminoasidini fosforiller. Bu fosforilasyon 26S proteozom tarafından IκB'nin ubiquitine bağlı yıkımını tetikler. Aktive p50/p65 kompleksinin daha sonra nükleusa translokasyonu olur. p50/p65 kompleksi NFκB spesifik κB DNA motiflerine bağlanır ve siklooksijenaz, sitokin gibi hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. Resveratrol p65'in fosforilasyonunu ve transaktivasyonunu IKK, protein kinaz C (PKC) gibi kinazları inhibe ederek baskılar (44). Şekil 16'da resveratrolün moleküler hedefleri gösterilmektedir.



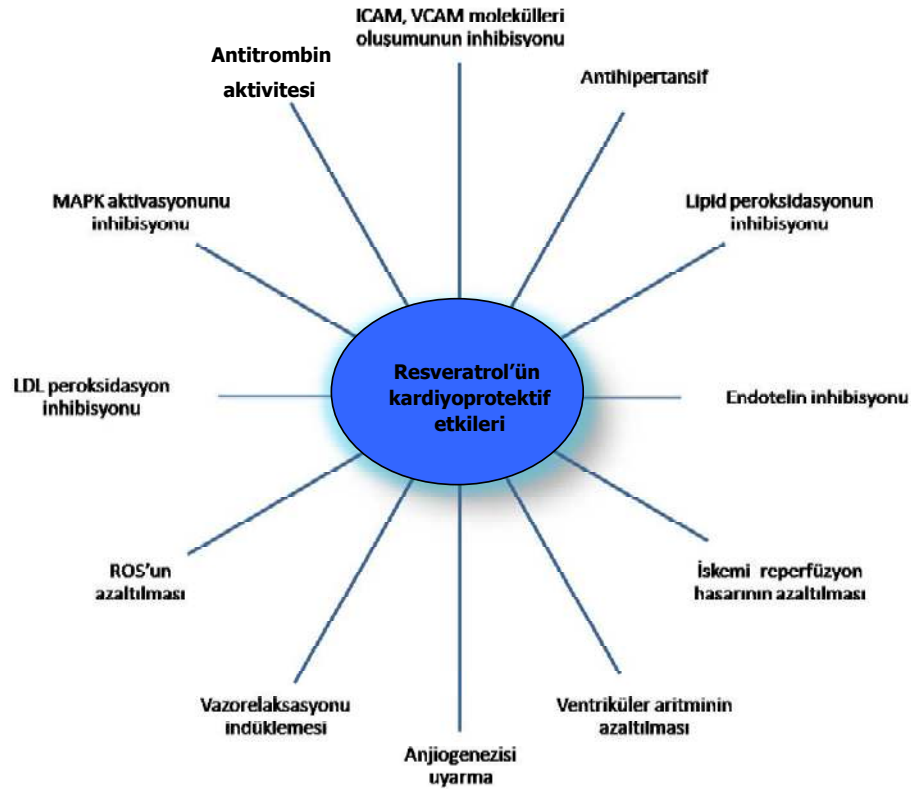
Şekil 16. Resveratrolün moleküler hedefleri (45)

1.6.2.1.8. Resveratrolün Kardioprotektif Etkileri

Kırmızı şarabın kardioprotektif özelliğinin olduğuna işaret eden ilk söylemler epidemiyolojik çalışmalarda yer aldı. 1992’de ilk kez “Fransız paradoksu” olarak Renaud ve Lorgeil tarafından tanımlanmış, daha sonra izole sıçan kalbinde ilk kez resveratrolün koruyucu özelliği deneysel çalışmada gösterilmiştir. Resveratrol kardiyovasküler sistemi birçok yolla korumaktadır. En önemli etkisi apoptotik hücre ölümünü inhibe etmesidir, bu sayede ventriküler aritmi, ateroskleroz ve myokardial iskemi reperfüzyon hasarı gibi hastalıklardan korur. ROS, kalp hastalıkları oluşumunda önemli bir faktördür. Kalbin sağlıklı işlev görebilmesi için ROS ve endojen antioksidanlar arasında denge olmalıdır. Bu dengenin ROS lehine bozulması oksidatif stresi artırır ve kalp yetmezliğine ve kardiyomyopatiye neden olan hücresel değişiklikleri başlatır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün kardioprotektif özelliği tespit edilmiştir (şekil 17). Kardiyak hasarın akut ve kronik deneysel modellerinde, resveratrol miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Resveratrol iskemi-reperfüzyon hasarından kalp hücrelerinin yanı sıra böbrek ve beyin hücrelerini de korumaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarından böbrekleri korumada resveratrolün nitrik oksit üretimini uyarmasının önemli olduğu düşünülmektedir. Resveratrolün beyin, böbrek ve kalp hücrelerini korumasına karşın, kanser hücreleri üzerinde öldürücü etkisi vardır. Örneğin resveratrolün sıçan tümör modelinde intraperitoneal verilmesi

apoptozu artırır, tümör büyümesini inhibe etmektedir. Oral skuamöz karsinoma hücrelerinde tümör büyümesini inhibe eder. Sıçan kolon karsinogenez modelinde proapoptotik Bax proteininin ekspresyonunu indüklemektedir (45).

Bitkilerde bulunan polifenoller; hastalıkların önlenmesinde pek çok yararlı etkileri olan fitokimyasallardır. Resveratrol hem serbest radikal yakalayıcısıdır hem de çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesini artırma yeteneği olduğu için potansiyel antioksidandır. Polifenolik bileşiklerin antioksidan olarak rol oynaması bu bileşiklerin yapılarında bulunan fenolik hidroksi gruplarının redoks durumuna ve kimyasal yapısında elektronların delokalizasyonu bağlı olmaktadır. ROS'un zararlı etkilerine karşı dokuları korumada hücreler süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimleri kapsayan savunma mekanizmalarına sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan hücre içi antioksidanların, konsantrasyonunun sürdürülmesini sağlamaktadır (3). Çalışmamız, koroner arter endotel hücreleri üzerine odaklandığından resveratrolün değişik etkileri ve özellikle kardiyoprotektif etkileri konusundaki literatürleri gözden geçirmeyi uygun gördük.



Şekil 17. Resveratrolün kardiyoprotektif etkileri (45)

2.6.2.1.8.1. Vazorelaksasyon

Üzüm ya da şarap ekstraktı, damar duvarında cGMP (guanozin 3',5'-monofosfat) miktarını arttırmaktadır. Üzümdeki ürünlerin indüklediği vazorelaksasyonda NO-cGMP yolu aracılık etmektedir. Vazorelaksasyonda NO'nın direkt rolü resveratrol ile muamele edilen pulmoner arter endotel hücre kültüründe artmış nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi bulunduğu da gösterilmiştir. Resveratrolün NOS üretimini etkileyerek kardiyoprotektif etki gösterdiği de saptanmıştır (45). Shen ve ark. (46) sıçanlarda iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında resveratrolün kardiyoprotektif etkisini nitrik oksit'i (NO) arttırarak gösterdiğini saptamışlardır. Resveratrol, I/R hasarı uygulanan ratlarda kalbi korumaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda resveratrolce zengin Akdeniz diyetinin azalmış koroner arter hastalık riski ile birlikte olduğu ileri sürülmektedir.

2.6.2.1.8.2. Anti-enflamatuvar etkileri

İskemik bir kalpte resveratrolün kardiyoprotektif özelliği onun antienflamatuvar fonksiyonundan da kaynaklanmaktadır. Resveratrol ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, resveratrolün miyokardiyal infarkt büyüklüğünü azalttığı ve iskemi sonrası ventriküler fonksiyonda önemli iyileştirmeler yaptığı gözlenmiştir. Resveratrol ile muamele edilen grupta proadezif moleküllerde [hücre içi adezyon molekül-1 (ICAM-1), endoteliyal lökosit adezyon molekül-1 (E-Selectin) ve vasküler adezyon molekül -1 (VCAM-1)] reperfüzyon esnasında önemli bir azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda NO blokeri nitro-L-arjinin metil esterinin (L-NAME), resveratrolün yararlı etkilerini tamamen elimine ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar resveratrolün antienflamatuvar etkisini NO'ye bağlı mekanizma aracılığı ile gerçekleştirdiğini desteklemektedir (45).

2.6.2.1.8.3. ROS yakalayıcısı olarak resveratrol

Resveratrolün kardiyoprotektif etkilerine miyokardiyumdaki katalaz etkinliğini artırma yeteneği de katılmaktadır. Resveratrol *in vivo* antioksidan olarak fonksiyon görmekte ve kalpte peroksil radikalini yakalayabilmektedir. Böylece iskemi-reperfüzyon hasarından kalbi korumaktadır (47). Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu özellik diğer pek çok güçlü antioksidandan daha zayıftır. Resveratrolün hidroksi radikalini yakalayabilmesi, $9.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ tepkime hızı ile, askorbik asit gibi potent bir radikal yakalayıcısından daha yavaştır. Resveratrol *in vitro* koşullarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen *in vivo* olarak güçlü bir antioksidan işlevini görmektedir. Resveratrolün *in vivo* antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini artırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada *in vivo* antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır. Resveratrolün hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde glutatyon miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da insan lenfositlerinde resveratrolün glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz gibi glutatyon metabolizması ile ilgili enzimlerin düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (45).

2.6.2.1.8.4. Anti-apoptotik etki

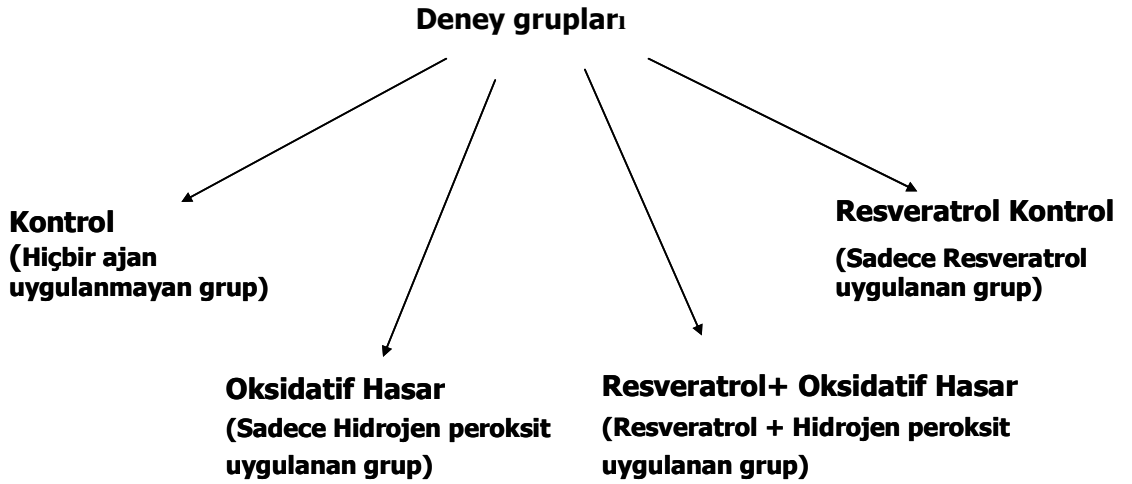
Resveratrol kalbi korumada antiapoptotik sinyali indüklemektedir. Domuz koroner arterlerinde, resveratrol ile kısa süreli muamelede MAPK etkinliğini inhibe edilmekte; ERK1/2, Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK'ın fosforilasyonu azalmaktadır. Benzer bir çalışmada resveratrolün endotelin-1'in aracılık ettiği protein tirozin fosforilasyonunu azalttığı bulunmuştur. Resveratrolün iskemik-reperfüze kalpte apoptotik kardiyomiyositleri azalttığı gösterilmiş ve antiapoptotik etkili olduğu desteklenmiştir (45).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMANIN PLANI VE DENEY GRUPLARI

Bu çalışmada önce *in vitro* insan koroner arter endotel hücre kültüründe hidrojen peroksitle oksidatif hasar modeli oluşturuldu; bu amaçla hücre sitotoksitesi ve reaktif oksijen türleri oluşumu ölçüldü, daha sonra resveratrolün olası koruyucu etkisi test edildi. Bu kapsamda glutatyon ve döngüsünde yer alan γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonu değerlendirildi. Şekil 18’de deney grupları gösterilmektedir:



Şekil 18. Çalışmada oluşturduğumuz deney grupları

Tüm deney gruplarında, gerek H_2O_2 gerekse resveratrol için değişik koşullar (konsantrasyon ve inkübasyon süresi) denendi ve aşağıdaki analizler uygulandı:

- Sitotoksitenin laktat dehidrogenaz (LDH) ile ölçümü
- Reaktif oksijen türlerinin hidroksifenil floresin fluoresans (HPF) prob ile ölçümü
- γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarının Western blot ile belirlenmesi
- Glutatyon düzeyinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kantitasyonu

3.2. GEREÇ

Çalışmalarımız, Dokuz Eylül Üniversitesi ilgili Etik Kurul'ndan onay alındıktan sonra başlatılmıştır. EK 1'de Etik kurulu onay raporu verilmektedir (19.10.2007/342).

Araştırma materyali ticari olarak satın alınan İnsan Koroner Arter Endotel Kültür hücreleridir (Human Coronary Artery Endothelial Cell=HCAEC)(Clonetics Lonza USA, CC-2585). Kültür ortamı olarak EGM-2MV Bullet Kit (Clonetics Lonza USA, CC-3202) kullanıldı. EGM-2MV bullet kit; EBM-2 (CC-3156) ve EGM-2 MV büyüme faktörlerinden (CC-4147) oluşmaktadır. Kültürlerin pasajlanmasında Reagent Pack (Cambrex, CC-5034) kullanıldı. Reagent pack; Tripsini nötralize edici çözelti, Tripsin/EDTA ve HEPES tamponundan oluşmaktadır. Çalışmalara başlayıncaya kadar hücre hattı sıvı nitrojen tankında (-180 °C'de) saklandı. Çalışmaya başlama gününde bölüm 3.3.1.'de tanımlanan uygulama basamakları doğrultusunda hücreler çözüldü. Hücreler için önerilen ekim yoğunluğu 2500-5000 hücre/cm²'dir. 37 °C'de, % 5 CO₂ sağlayan inkübatörde (Heraeus, Hera Cell) yukarıda tanımlanan EGM-2MV kültür ortamında hücreler üretildiler. Hücrelerin sayımında ve canlılığın değerlendirilmesinde tripan mavisi kullanıldı (48). Kültürler yaklaşık % 80 sıklıkla eriştiğinde tripsin/EDTA çözeltisi ile kültür kaplarından kaldırılarak 1:3 oranında pasajlandı. Tüm deneyler için hücrelerin 5-7. pasajları kullanıldı. Western blot analizi için 75 cm²'lik kültür flasklarına ekilen hücreler, diğer deneyler için 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler kullanıldı.

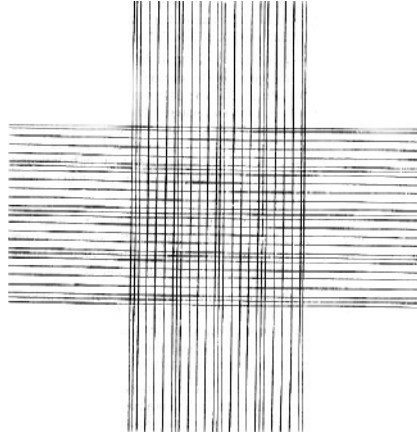
3.3. YÖNTEM

3.3.1. Hücrelerin Çözülmesi

- Ekimden önce 1 ml/5 cm² hacimde kültür ortamı 37 °C' de, %5 CO₂ inkübatöründe en az 30 dakika süreyle bekletildi.
- HCAE hücreleri 37°C su banyosunda çözüldü.
- Hücre süspansiyonu üzerine serumlu ortam eklenerek pipetaj yapıldı.
- Hücre sayımı yapıldıktan sonra, önceden kültür ortamı konmuş bulunan kültür kaplarına 2500-5000/cm² yoğunlukta ekim yapıldı.
- Faz-kontrast mikroskopunda (Olympus,CK40) incelenen hücreler inkübatöre alındı.
- Kültür ortamı ekimin ertesi günü ve ardından iki günde bir taze kültür ortamıyla değiştirildi.

3.3.2. Hücre Sayımı ve Tripan Mavisi Canlılık Testi

Hücre sayımı için "Tripan mavisi canlılık testi" kullanıldı. Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisini geçirmezler. Hücre membranının zarar görmesi durumunda tripan mavisi hücre içine girer ve sitoplazmayı boyar. Canlı hücreler sarı renkte görülürken, ölü hücreler mavi renkte görülürler (48). Hücre sayımı "Thoma" lamında yapıldı. Thoma lamında, 0.1 mm^3 hacimde sayım yapılmaktadır. Thoma lamında 1 mm^2 'ye karşılık gelen 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Şekil 19'da 16 büyük kare ile her birinde 25 küçük kare gösterilmiştir.



Şekil 19. Hücre sayımında kullanılan Thoma lamı

Hücre sayımı için izlenen aşamalar aşağıda özetlenmektedir:

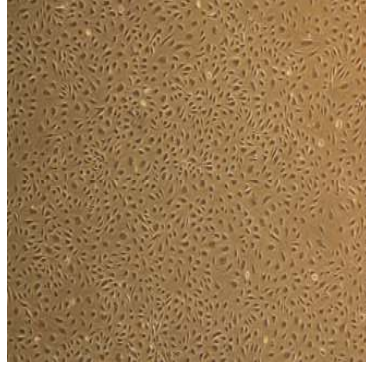
- Hücre ortamı hücre kabından uzaklaştırıldı.
- 25 cm^2 lik flask için: 4 ml HEPES tampon (CC-5022) ile hücreler yıkandı.
- 2 ml Tripsin (CC-5012) eklendi. 37°C 'de inkübatörde 2-3 dakika tripsin aktivasyonu için bekletildi.
- Tripsin, Tripsini nötralize edici çözelti (CC-5002) ile nötralize edildi.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj (Eppendorf, 5810R) edildi.
- Çöken hücrelere taze ortam eklendi
- Thoma lamı hazırlandı. Lam üzerine lamel kapatıldı.
- Eppendorf tüpüne 1:1 oranında % 0.4 lük tripan mavisi (Sigma T-6146) solüsyonundan eklendi. Homojenize edildi.

- Homojenize solusyondan 25 µl alınarak lam ile lamel arasına sızdırıldı.
- 20-30 saniye bekletildi.
- Faz-kontrast mikroskobu (Olympus, CK40) yardımıyla canlı hücreler ve ölü hücreler sayıldı. Mililitredeki ölü ve canlı hücre sayılarını belirlemek için "sayılan hücre miktarı x dilüsyon oranı x 10000" formülü kullanıldı (10000 sayısı, 0.1 mm³ deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart veri elde etmek için kullanılan bir değişmezdir).

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması Cambrex firmasının önerdiği şekilde aşağıdaki gibi yapıldı (Şekil 20'de pasaja hazır HCAE P4 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü verilmektedir):

- Kültür kabındaki kültür ortamı steril bir pipetle çekildi.
- Hücreler tripsinin etkisini inhibe edebilecek serumu uzaklaştırmak amacıyla HEPES tampon ile yıkandı.
- Hücre yüzeyini kaplayacak kadar Trypsin eklendi.
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olmak amacıyla mikroskopta kontrol edildi.
- Trypsin aktivitesini inhibe etmek amacıyla Trypsin nötralize edici çözelti eklendi.
- Hücreler mavi kapaklı tüpe aktarıldı.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında üst faz atıldı.
- Hücre peleti 1ml ortamda dilüe edildi.
- Hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı. Tripan mavisi canlılık testi ile hücrelerin sayımı yapıldı.
- 2500-5000/cm² olacak şekilde hücre ekimi yapıldı (49).
- İnkübatöre kondu ve ortamları iki günde bir değiştirildi.



Şekil 20. Pasaja hazır HCAE P4 hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüsü (4X)

3.4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Araştırmamızda önce sitotoksisite deneyleri yapıldı. Resveratrolün çeşitli konsantrasyonlarının HCAE hücrelerine etkisi araştırıldı. Sonra hidrojen peroksit hasar modeli olarak hidrojen peroksit derişimi optimize edildi. Optimize koşullarda resveratrolün olası koruyucu etkisi sınıandı. Tüm bu araştırmalarda sitotoksisite değerdendirme testi olan laktat dehidrogenaz (LDH) kullanıldı.

Daha sonra reaktif oksijen türleri oluşumu değerdendirildi. Hidrojen peroksit hasar modelinde reaktif oksijen türleri oluşumu ve sonrasında resveratrolün reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisi floresans prob hidoksifenil floresin (HPF) ile değerdendirildi.

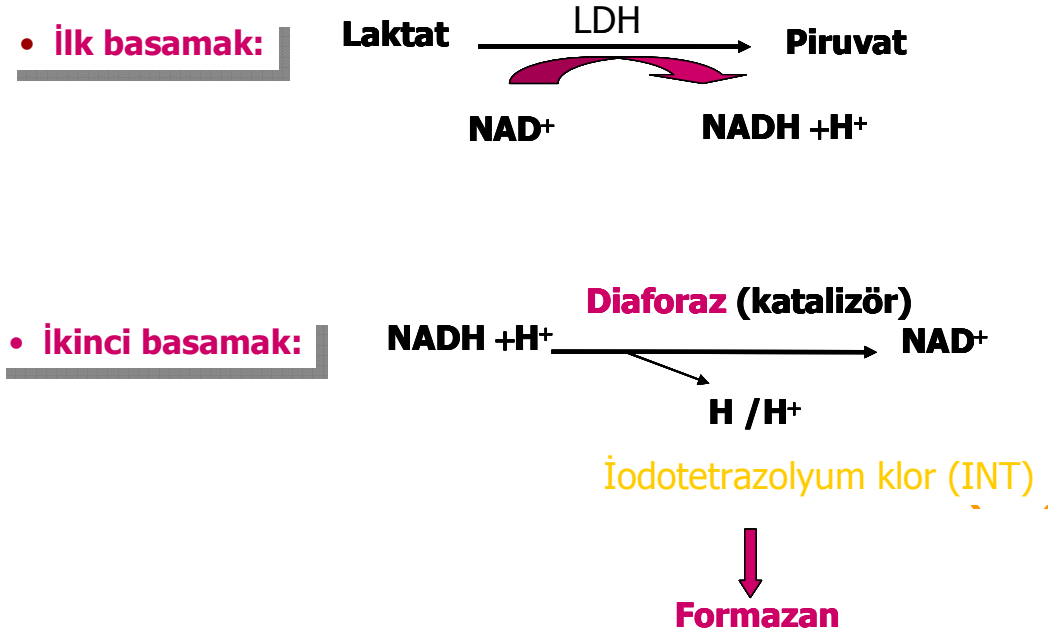
Çalışmanın son aşamasında hidrojen peroksit ile oluşturulan hasar ve resveratrolün hasar modelinde olası koruyucu etkisi glutatyon ve döngüsünde yer alan γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri ile değerdendirildi. Bu amaçla glutatyon düzeyi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile enzimlerin ekspresyonu Western blot ile belirlendi.

Standardizasyonun sağlanması amacıyla, aynı deney düzeneğinde sitotoksisite ve ROS deneyleri 4'lü gruplar formatında, glutatyon ve γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin analizine ilişkin deneyler 3'lü gruplar formatında çalışılmış ve her deney düzeneği üçer kez tekrarlanmıştır.

3.4.1. SİTOTOKSİSİTENİN LAKTAT DEHİDROGENAZ (LDH; EC 1.1.1.27) İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Resveratrolün değişik konsantrasyonlarının hücrelerde etkisinin değerlendirilmesi, H_2O_2 ile oluşturulan hasar modelinde hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesi ve resveratrolün hasar modelinde oluşan hücre sitotoksitesine olası etkisinin değerlendirilmesi Laktat Dehidrogenaz (LDH) testi ile yapıldı.

LDH bütün hücrelerde bulunan stabil bir sitoplazmik enzimdir. Bu enzim plazma membranı hasara uğradığında hücre dışına salınmakta ve kültür süpernatantlarında saptanmaktadır. Bu nedenle LDH, sitotoksitesinin değerlendirilmesinde yararlı bir göstergedir. Sitotoksite kiti kullanımıyla kültür süpernatantlarında LDH aktivitesi bir zaman noktasında tek bir ölçümle belirlenebilmektedir (50). Yöntemde ilk basamakta LDH, laktatın pirüvata dönüşmesini katalizlerken NAD, $NADH/H^+$ 'a indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör (diaforaz) $NADH/H^+$ 'dan H/H^+ 'ı sarı tetrazolyum tuzu iodo-tetrazolyum klor (INT) transfer etmekte ve INT' da formazana indirgenmektedir (Şekil 21).



Şekil 21. LDH yönteminin enzimatik denklemi (50)

Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Süpernatantta LDH enzim aktivitesinin artışı belli bir zaman diliminde oluşan formazan ile ilişkilidir. Bu nedenle testte oluşan rengin şiddeti lizise uğrayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Formazan boyası suda çözünürdür ve yaklaşık 500 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir. Oysa tetrazolium tuzu INT bu dalga boylarında önemli bir absorpsiyon göstermemektedir. Deneylerde LDH "Cytotoxicity Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH) kullanıldı. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

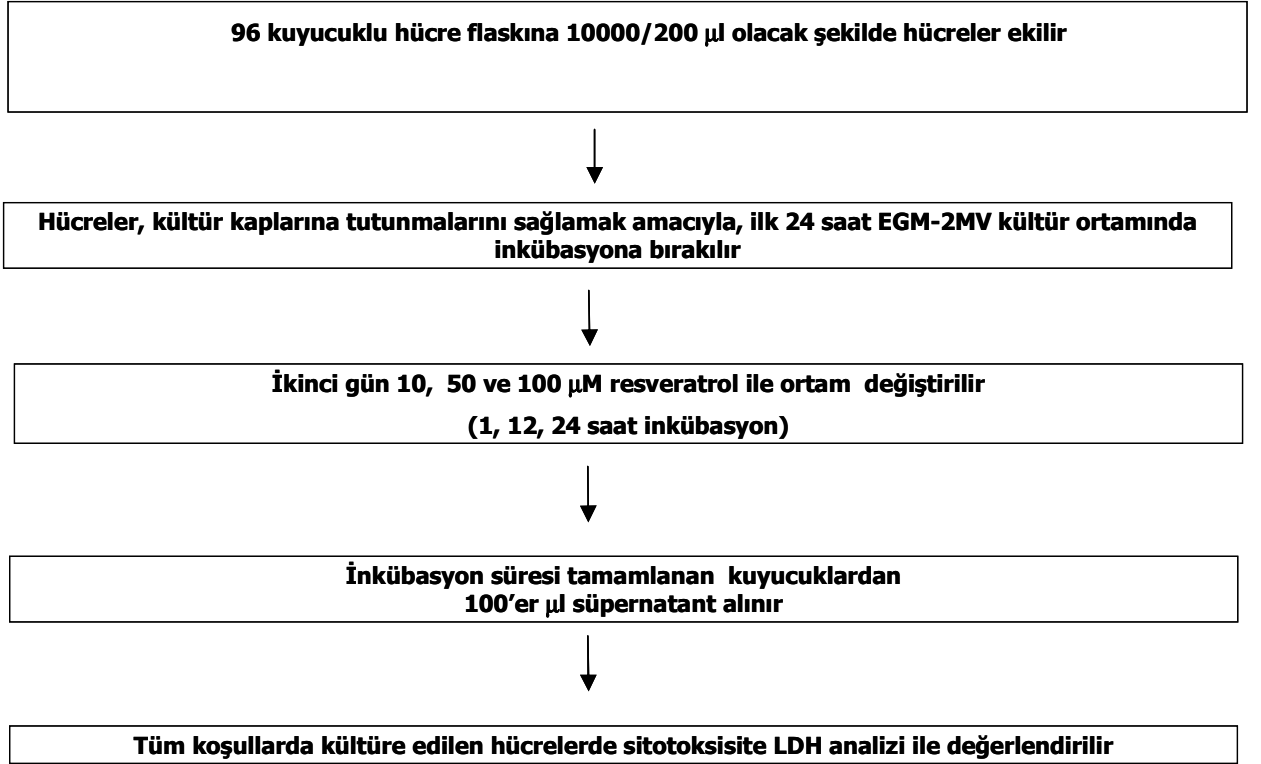
- LDH (Roche, Cytotoxicity Detection Kit Roche Diagnostics GmbH, Kat. No. 11 644 793 001) çözeltisi hazırlandı.
- Liyofilize halde bulunan (Katalizör; diaforaz/ NAD^+) karışıma katalogdaki hazırlanma kılavuzuna göre 1 mL distile su eklendi ve çözülmesi sağlandı. Sıvı halde bulunan boya çözeltisi [İodotetrazolyum klor (INT) ve sodyum laktat] ile katalizör çözeltisi aşağıdaki şekilde kullanıldı:
- 100 test için 250 μL katalizör çözeltisi ve 11.25 ml boya çözeltisi karıştırılarak reaksiyon karışımı testten hemen önce hazırlandı (kit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanmaktadır. Katalizör ve boya çözeltileri çözüldüğünde $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta birkaç hafta stabilitesini korumaktadır).
- Deney koşulları; H_2O_2 ya da resveratrol ile muamele edilmeyen kontrol grubu, H_2O_2 ile hasar modeli oluşturulan grup ve resveratrol ile preinkübe edildikten sonra H_2O_2 hasar modeli uygulanan gruplardan oluşmaktadır.
- Maksimal LDH salınımının belirlenmesi için ise % 1'lik Triton X-100 deterjan maddesi eklenen örnekler kullanıldı.
- Blank (Kör) absorbans değeri hücre içermeyen yalnızca optimem solusyonunun eklendiği kuyucuklarda okutulan absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasıdır.
- Deney koşulları, maksimal örneklerden ve körden 100 μL süpernatant örneği alınarak ELISA plağına aktarıldı ve üzerine 100 μL hacimde ve taze hazırlanan LDH reaksiyon karışımı eklendi. Reaksiyon karışımı eklendikten sonraki 30 dakika içinde ELISA plak okuyucusuna yerleştirilen plaktan 492 nm dalga boyunda Eliza Plak Okuyucu (Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK) ile okutma yapıldı.

- Deney koşullarına ait absorbands değerinden, ortalama kör absorbands değeri çıkartılarak net absorbands değerleri elde edildi.
- Daha sonra net absorbandslar maksimal ortalama absorbandsa bölünerek % sitotoksosite hesaplandı.
- Her bir deney koşulu için % sitotoksosite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\begin{aligned} &\text{Koşulun absorbandsı (Ortalama)} - \text{Blank (kör) absorbandsı (ortalama)} = \text{Koşulun net absorbands} \\ &(\text{Koşulun net absorbands} / \text{maksimal (en yüksek) ortalama absorbands}) \times 100 = \% \text{ sitotoksosite} \end{aligned}$$

3.4.1.1. Resveratrolün HCAE Hücrelerinde *İn Vitro* Etkisi

Resveratrolün HCAE hücrelerinde *in vitro* etkisinin incelenmesi amacıyla, 10000/200µL olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra hücreler 10, 50 ve 100 µM resveratrol (8,51) ile 1, 12, ve 24 saat inkübe edildi (Şekil 22). Resveratrolün olası etkileri, toplanan süpernatantlarda LDH analizi ile değerlendirildi. LDH analizine ilişkin uygulama basamakları bölüm 3.4.1’de sitotoksitenin laktat dehidrogenaz (LDH) ile değerlendirilmesi başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.



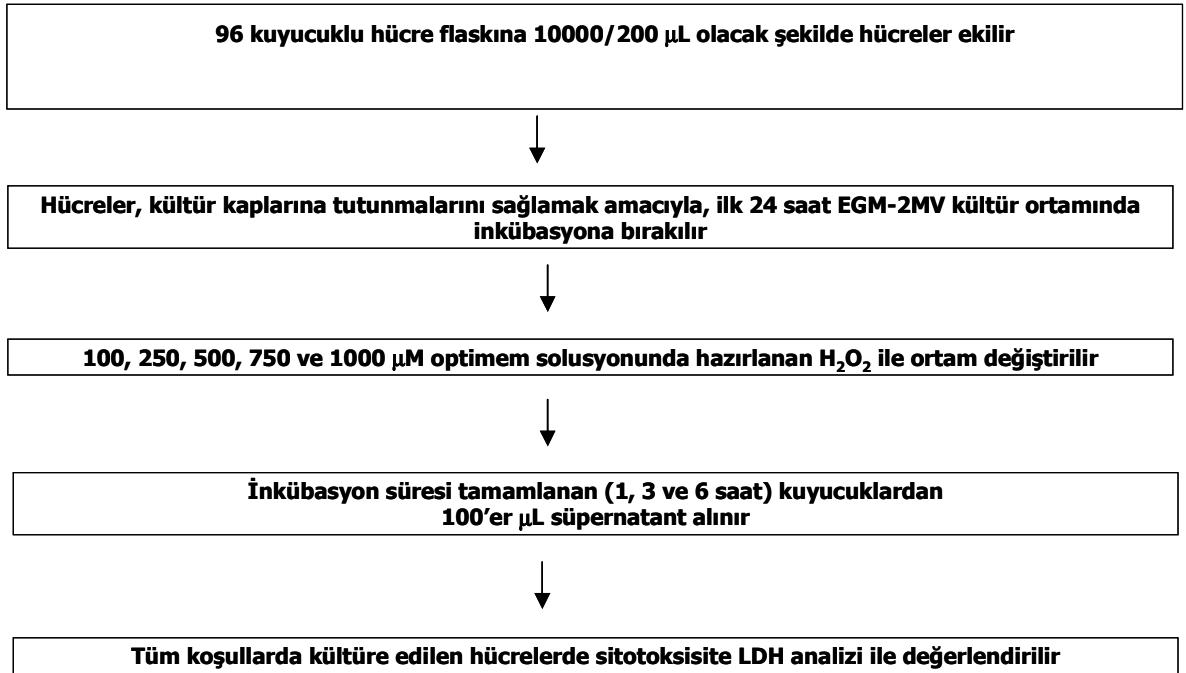
Şekil 22. Akış çizelgesi: Resveratrolün hücre canlılığına *in vitro* etkisinin değerlendirilmesi

3.4.1.2. Hücrelerde H₂O₂ İle Optimum Hasar Modeli Oluşturma

Literatür taraması yapılarak endotel hücrelerinde hasar modeli olarak H₂O₂ deney modelini kullanan literatürler temel alındı. Literatürle uyumlu olarak H₂O₂ 1 saat (52), 3 saat (53) ve 6 saat (54) inkübasyon sürelerinde ve 100 µM H₂O₂, 250 µM H₂O₂ (55, 53), 500 µM H₂O₂ (53), 750 ve 1000 µM (52) konsantrasyonlarında uygulandı ve H₂O₂'nin hasar oluşturacak optimum konsantrasyonu ve süresi belirlendi.

H₂O₂ uygulamasından 24 saat önce HCAE hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 200 µl'de 10000 hücre olacak şekilde ekildi. Şekil 23'de deney akış şeması ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Buna göre hücrelerin kültür kaplarına tutunmasını sağlamak amacıyla hücreler, ilk 24 saat EGM-2MV kültür ortamında kültüre edildiler. İkinci gün 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM optimum solusyonunda hazırlanan H₂O₂ (stok 11.6 M) ile ortam değiştirildi. Optimum renksiz ve fetal siğir serum yüzdesi düşük olduğundan, LDH solusyonunu interfere etmeyen bir ortamdır. H₂O₂'e ya da resveratrol'e maruz bırakılmayan hücreler "kontrol grubu"

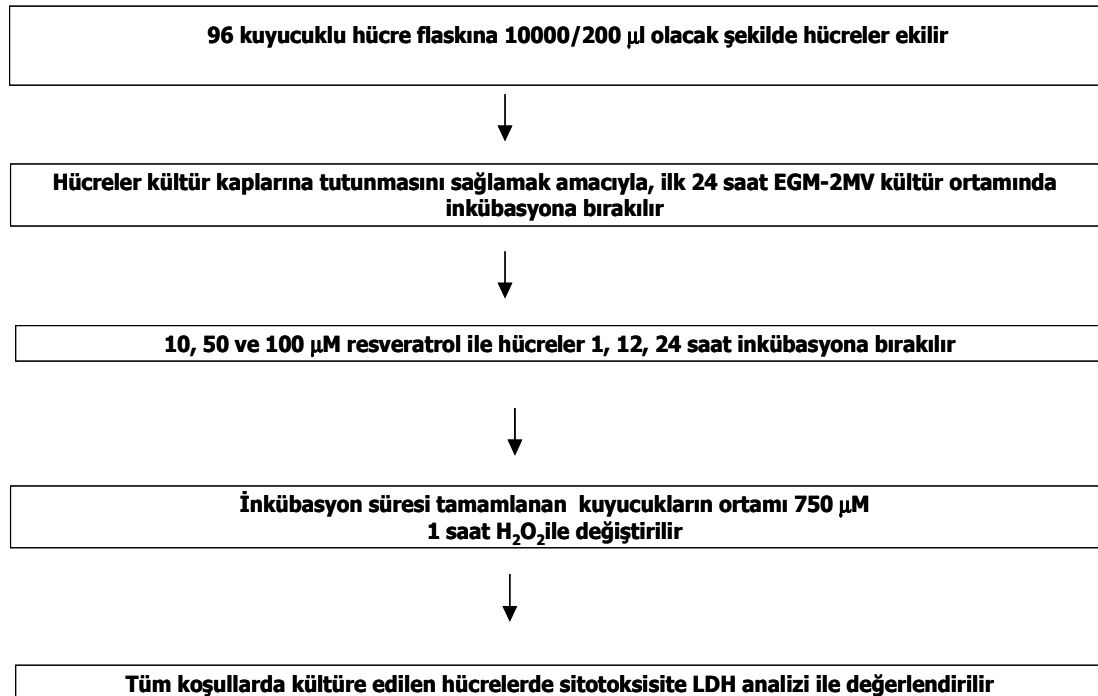
olarak tanımlandı. Bu hücrelerin ortamı sadece optimem ile değiştirildi. Hücreler inkübasyona bırakıldı. 1, 3 ve 6 saat inkübasyon süresi tamamlanan kuyucuklardan 100'er µl süpernatant alındı. 5 saat sonra maksimum kuyucuklara Triton X-100 eklendi. 1 saat inkübasyona devam edildi. Toplanan süpernatantlarda hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacıyla LDH analizi yapıldı. LDH analizine ilişkin uygulama basamakları bölüm 3.4.1'de sitotoksitenin laktat dehidrogenaz (LDH) ile değerlendirilmesi başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Tüm deneyler 6. ve 7. pasajda gerçekleştirildi.



Şekil 23. Akış çizelgesi: Hidrojen peroksit hasar modelinin *in vitro* uygulaması

3.4.1.3. Resveratrolün H₂O₂ Uygulanan Endotel Hücrelerinde Olası Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi

Koruyuculuk deneyleri için kullanılacak resveratrol konsantrasyonu literatür desteği ile belirlendi (8, 51, 56). Çalışmanın bu aşamasında HCAE hücrelerinde H₂O₂ hasarında resveratrolün olası koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlandı. 10 mg resveratrol (Sigma R 5010, Stok 5 mM) tartılarak 8.77 mL etanolde çözüldü. 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında hazırlandı. 96 kuyucuklu plaklarda çalışılan deneylerde kuyucuk başına 10000 hücre ekildi. Hücreler 24 saat inkübasyona alındı. İkinci gün 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda resveratrol içeren ortam ile hücreler 1, 12, 24 saat inkübasyona bırakıldılar. Bu inkübasyon süreleri bitiminde 750 µM 1 saat H₂O₂'e maruz bırakılan insan koroner arter endotel hücrelerinden süpernatantlar alındı. Toplanan süpernatantlarda hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacıyla LDH analizi yapıldı. LDH analizine ilişkin uygulama basamakları bölüm 3.4.1'de sitotoksitenin laktat dehidrogenaz (LDH) ile değerlendirilmesi başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Deney akış şeması aşağıda ayrıntılı olarak Şekil 24'te gösterilmektedir:



Şekil 24. Akış çizelgesi: Resveratrolün, H₂O₂ hasarlı HCAE hücrelerine *in vitro* etkisinin değerlendirilmesi

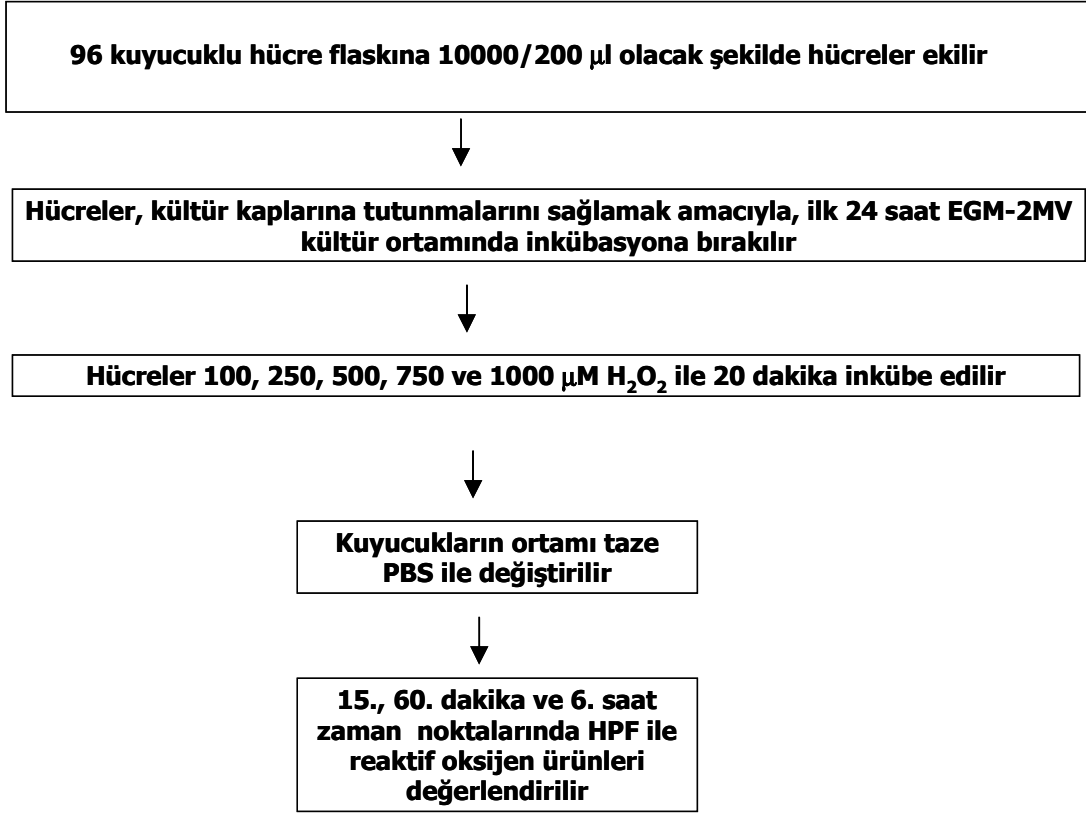
3.4.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ANALİZİ

Hidrojen peroksitin değişik konsantrasyonlarında ve sürelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve resveratrolün reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna etkisinin değerlendirilmesinde hidroksifenil floresin [3'- (p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF), Invitrogen Molecular probe; HPF H36004] fluoresans probu kullanıldı ve fluorometrik ölçüm yapıldı (57). Yöntem; fluoresans olmayan HPF'nin özellikle hidroksil, peroksinitrit ve hipoklorit radikalleri ile tepkimeye girerek oluşan parlak yeşil fluoresansın 490 eksitasyon; 515 emisyon dalga boylarında ölçümü esasına dayanmaktadır. Deney basamakları aşağıda verilmektedir:

- 5 mM'lık stok HPF çözeltisi, PBS ile son konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde dilüe edildi.
- Deney koşulları; H_2O_2 ya da resveratrol ile muamele edilmeyen kontrol grubu, H_2O_2 ile hasar modeli oluşturulan grup ve resveratrol ile preinkübe edildikten sonra H_2O_2 hasar modeli uygulanan gruplardan oluşmaktadır.
- Her bir deney koşulundaki 200 μ L ortam üzerine 4 μ L 10 μ M HPF eklendi. Plak alüminyum folyo ile kaplandı.
- 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Kuyucuklar 200 μ L PBS ile yıkandı.
- Eksitasyon/Emisyon; 490 nm/515nm dalga boyunda Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK cihazında okundu.

3.4.2.1. H_2O_2 Hasarında Reaktif Oksijen Türleri Oluşumunun Değerlendirilmesi

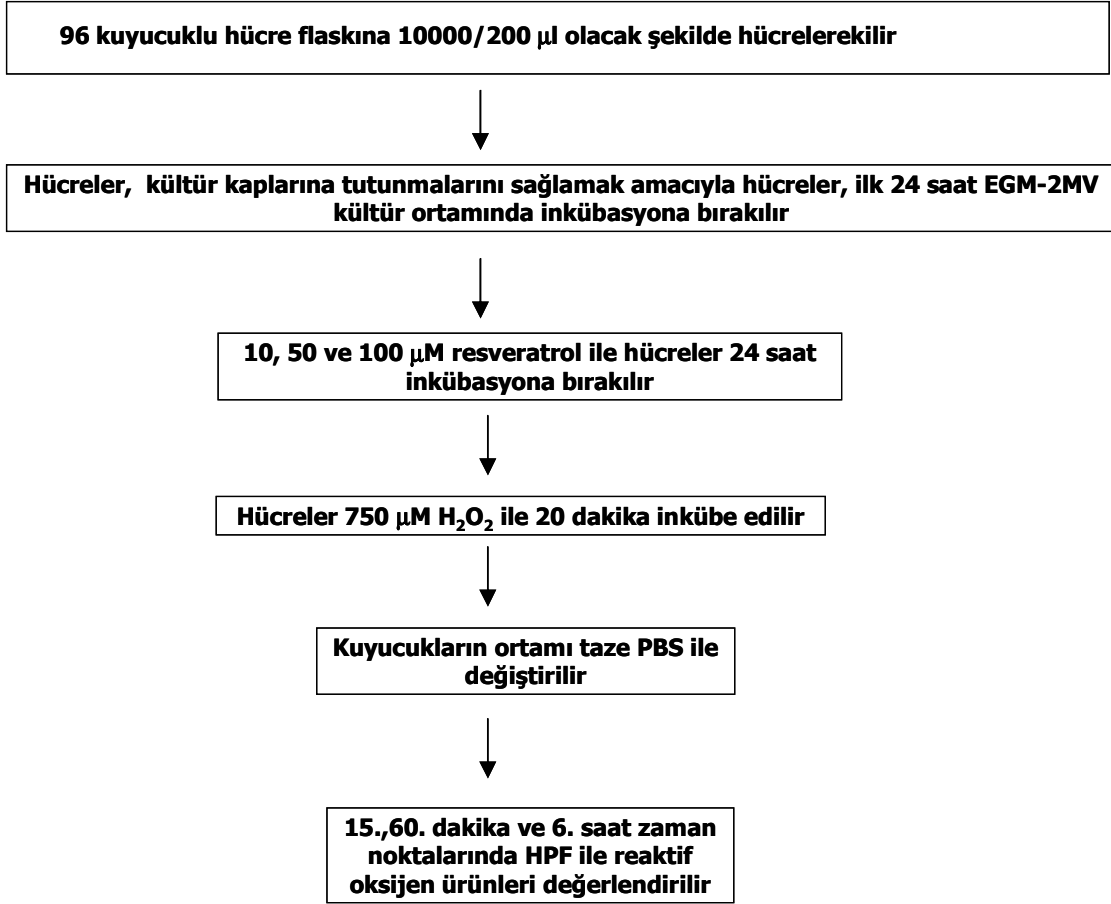
H_2O_2 ile inkübe edilen hücrelerde oluşan reaktif oksijen türleri literatürle uyumlu olarak 15., 60. dakika ve 6. saat zaman noktalarında p-hidroksifenilfloresin probu ile analiz edildi. H_2O_2 uygulamasından 24 saat önce HCAE hücreleri 96 kuyucuklu siyah plaklara her kuyucuğa 200 μ L'de 10 000 hücre olacak şekilde ekildi. Şekil 25'te deney akış şeması ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Buna göre hücrelerin kültür kaplarına tutunmasını sağlamak amacıyla hücreler, ilk 24 saat EGM-2MV kültür ortamında kültüre edildiler. İkinci gün 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M optimum solusyonunda hazırlanan H_2O_2 ile ortam değiştirildi. 15., 60. dak ve 6. saatte HPF ile reaktif oksijen türleri değerlendirildi. Reaktif oksijen türleri oluşumunun analizine ilişkin uygulama basamakları bölüm 3.4.2'de ayrıntılı olarak açıklanmaktadır



Şekil 25. Akış çizelgesi: H₂O₂ hasar modelinde ROS ölçümü

3.4.2.2. Resveratrolün Reaktif Oksijen Türleri Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

HCAE hücrelerinin H₂O₂ hasarında oluşan reaktif oksijen türlerine resveratrolün olası koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 96 kuyucuklu siyah plaklara kuyucuklarda 200 µl'de 10000 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat inkübasyona alındı. İkinci gün 10,50 ve 100 µM konsantrasyonda resveratrol içeren PBS (Ca+Mg) ile hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldılar. 750 µM H₂O₂ ile 20 dakika süre ile inkübe edilen hücrelerin ortamı PBS ile değiştirildi. 15., 60. dak ve 6. saatte HPF ile reaktif oksijen türleri oluşumu değerlendirildi. Reaktif oksijen türleri oluşumunun analizine ilişkin uygulama basamakları bölüm 3.4.2'de ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Şekil 26'da deney akış şeması verilmektedir.



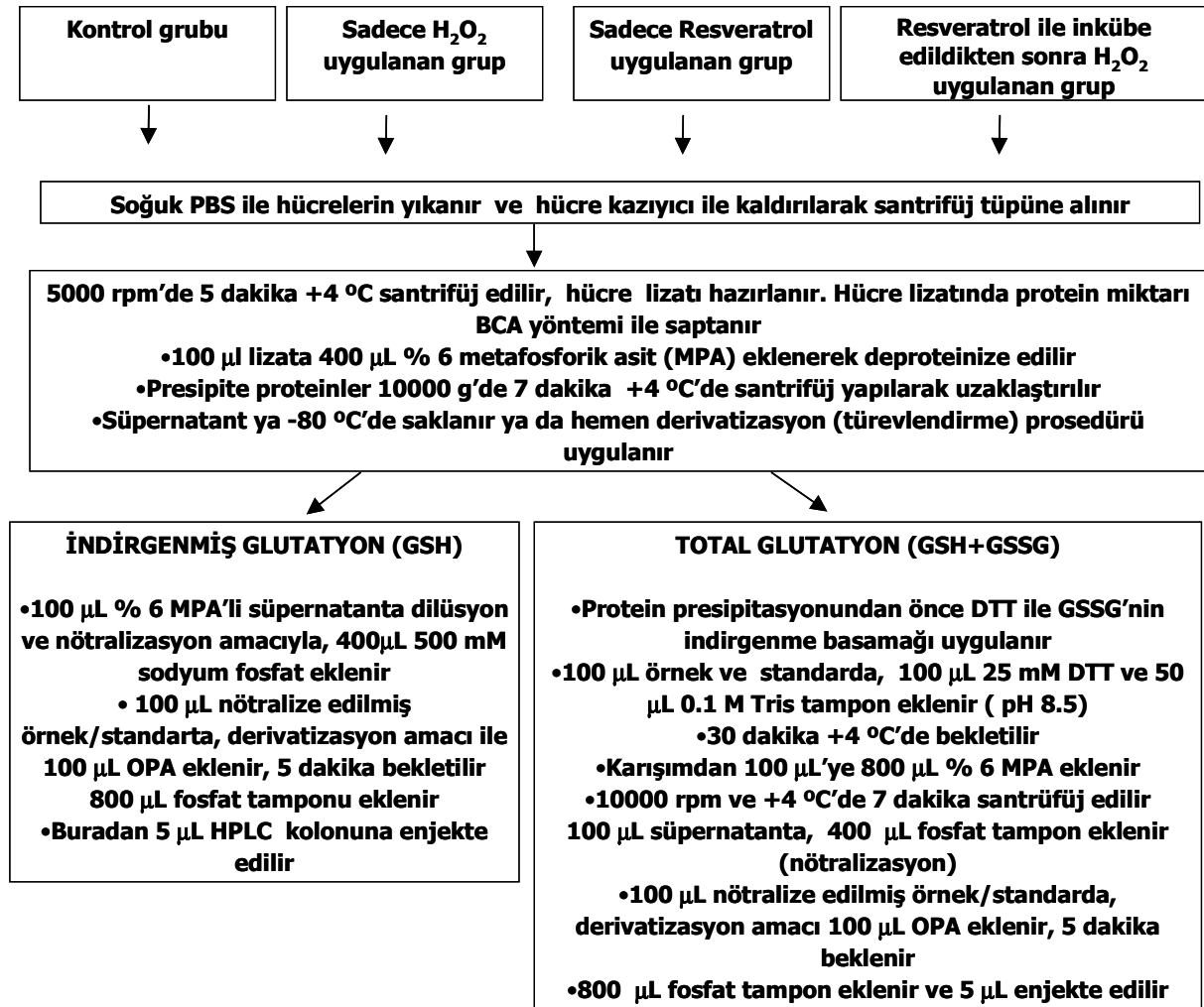
Şekil 26. Akış çizelgesi: Resveratrolün *in vitro* H₂O₂ hasarına etkisinin değerlendirilmesi

3.4.3. İNDİRGENMİŞ VE YÜKSELTGENMİŞ GLUTATYON DÜZEYLERİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

3.4.3.1. Glutasyon Ölçümü İçin Örneklerin Hazırlanması

75 cm² hücre flasklarında hücrelerin % 70-80 sıklığı sağlandıktan sonra kontrol grubu, sadece H₂O₂ uygulanan grup, sadece resveratrol uygulanan grup ve resveratrol + H₂O₂ uygulanan grup olmak üzere 4 grup oluşturuldu. 50 µM resveratrol ile 24 saat inkübasyon ve 750 µM H₂O₂ ile 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde soğuk PBS ile hücreler yıkandı. Soğuk PBS içinde hücre kazıyıcı ile kaldırılarak santrifüj tüpüne alındı. 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C santrifüj edildi, hücre lizatı hazırlandı. Hücre lizatında protein düzeyi biçinkonik asit (BCA) yöntemi ile saptandı. Hücre lizatı hazırlanması bölüm 3.4.4.1.'de, protein ölçümü bölüm 3.4.4.2.'de ayrıntılı olarak verilmektedir. Hazırlanan lizata (100 µl) 400 µL % 6 metafosforik asit (MPA) eklenerek deproteinize edildi. Çöken

proteinler 10000 g'de 7 dakika +4 °C'de santrifüj yapılarak uzaklaştırıldı ve derivatizasyon prosedürü uygulandı. Cereser ve arkadaşlarının (22) geliştirdikleri, Çavdar ve ark. (58) tarafından modifikasyonu yapılmış bu metodun çok sayıda avantajı bulunmaktadır: spesifiktir ve düşük deteksiyon limiti ile çok fazla sensitiftir (50 fmol), deney-içi C.V % 4.2, deneyler arası C.V % 4.9, analitik geri kazanımı % 98'in üzerindedir. GSH'n kalibrasyon eğrisinde korelasyon katsayısı (r): 0.9998'dir. Çalışmamızda OPA ile türevlendirme yapıldı ve HPLC'de floresans detektör kullanılarak indirgenmiş glutatyon ve total glutatyon düzeyi analiz edildi. Total glutatyon değerinden indirgenmiş glutatyon değeri çıkarılarak yükseltgenmiş glutatyon düzeyi hesaplandı. Deney akış şeması Şekil 27'de gösterilmektedir:



Şekil 27. Akış çizelgesi: Değişik deney gruplarında glutatyon ölçümleri öncesinde hücre lizatı hazırlanması ve derivatizasyon işlemleri

3.4.3.2. Glutasyon Düzeyinin HPLC İle Değerlendirilmesi

İndirgenmiş glutasyonun (GSH) ortoftalaldehit (OPA) ile türevlendirilmesi temel alınmaktadır. Tiyol gruplarının fluorojenik reaktiflerle prekolon türevlendirilmesinden sonra, HPLC ile ayırımı en yaygın yöntemdir. OPA; glutasyonun hem sülfidril hem de primer amino grubu ile ileri derecede fluoresans veren türevler oluşturur. Yöntemde, indirgenmiş glutasyon, türevlendirme işleminden sonra doğrudan ölçülmektedir. Total glutasyon (yükseltgenmiş + indirgenmiş glutasyon) ölçümü için ise türevlendirme basamağından önce yükseltgenmiş glutasyonun ditiyotritol (DTT) ile indirgenmesi gerekir. Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) değeri, total glutasyon (tGSH) değerinden indirgenmiş glutasyon değerinin (GSH) çıkarılması ile hesaplanır. Asetonitril ve sodyum asetat karışımı, glutasyon türlerinin HPLC ile analizi için önerilen bir mobil fazdır (22). Konsantrasyonlar mg protein başına nmol olarak ifade edileceğinden protein ölçümü yapıldı. 3.4.4.2.'de protein ölçümü ayrıntılı olarak verilmektedir. Glutasyon ölçümünde kullanılan reaktifler ve hazırlanması detaylı olarak aşağıda verilmektedir:

- **GSH Stok standart çözeltisi**

10 mM GSH (0.030 g) 1 ml 0.01 N HCl içinde çözüldü. -20 °C'de 1 ay stabildir.

- **GSSG stok standart çözeltisi**

10 mM GSSG (0.0607 g) 1 ml 0.01 N HCl içinde çözüldü. -20 °C'de 1 ay stabildir.

- **Borat tamponu**

0.1 M, pH 9.9 borat tampon için, 3.81 gr NaB_4O_7 yaklaşık 90 mL suda çözüldü. 0.1 M NaOH ile pH 9.90 a ayarlandı ve hacim tampon ile 100 ml'ye tamamlandı.

- **Orto fitalaldehid (OPA) reaktifi**

50 mg OPA 0.5 ml metanolde çözüldü. Hacim borat tampon ile 10 ml'ye tamamladı. -20 °C'de 1 ay stabil.

- **Na-Fosfat tamponu**

50 mM Na_2HPO_4 ve 50 mM NaH_2PO_4 ile pH'sı 7.0 olan tampon hazırlandı.

- **Metafosforik asid (MPA) çözeltisi**

%6'lık MPA kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

- **Ditiyotritol (DTT) çözeltisi**

25 mM olacak biçimde 0.385 g DTT saf suda çözüldü, hacim 100 mL'ye tamamlandı.

- **Tris-HCl tamponu**

0.1 M olacak biçimde Tris baz çözeltisinin hacmi, HCl ile pH 8.5 e ayarlandı.

- **Mobil faz**

50 mM CH₃COONa (3.425 g CH₃COONa alınır saf suda çözüldü ve hacim 500 ml'ye tamamlandı) ve asetronitril ile 70:30 oranında karışım hazırlandı. Karışımın pH'sı 50 mM asetik asit (1.525 ml asetik asit 500 ml suya tamamlanır) ile 6.20 ye ayarlandı. Son karışım 0.2 µM çapında filtreden geçirilerek süzüldü.

- **Kolon**

Inertsil C-18 reversed-phase ODS-2 silica column (250X4.6 mm; 5 µm particle size) (Chrompack, Les Ulis, France)

- **Standartların hazırlanması**

10 mM GSH, GSSG ve glutatyon etil esteri 0.01 N HCl'de hazırlandı (-20 °C'de 1 ay stabil).

3.4.3.2.1. İndirgenmiş Glutatyon Ölçümü İçin Örneklerin Hazırlanması

- 100 µL %6 MPA'li süpernatanta dilüe ve nötralizasyon amacıyla, 400 µL 500 mM sodyum fosfat eklendi.
- 100 µL nötrale edilmiş örnek/standarta, 100 µL OPA eklendi.
- 5 dakika bekletildi.
- 800 µL fosfat tamponu eklendi.
- Buradan 5 µL kolona enjekte edildi.

3.4.3.2.2. Total Glutatyon Ölçümü İçin Örneklerin Hazırlanması

- Protein presipitasyonundan önce DTT ile GSSG'nin indirgenme basamağı uygulandı
- 100 µL örnek (lizat) veya standarda, 100 µL 25mM DTT ve 50 µL 0.1 M Tris tampon eklendi pH 8.5 ve vortekslendi.
- 30 dakika +4 °C'de (buzdolabında) bekletildi.
- Karışımdan 100 µL'ye 800 µL % 6 MPA eklendi ve vortekslendi.
- 10000 rpm ve +4 °C'de 7 dakika santrüfuj edildi.
- 100 µL süpernatanta, 400 µL fosfat tampon eklendi (nötralizasyon).
- 100 µL nötrale edilmiş örnek/standarta, 100 µL OPA eklendi, 5 dakika bekletildi.
- 800 µL fosfat tampon eklendi ve 5 µL enjekte edildi.

3.4.3.2.3. HPLC Kolonuna Enjeksiyon

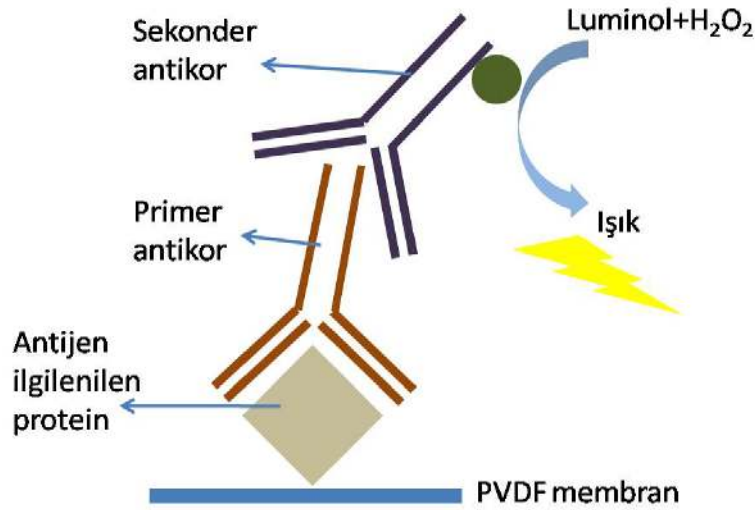
- Örnek enjeksiyon hacmi 5 µL olarak standardize edildi.
- C18 kolon için (C18, 25/4.6 mm, 5 µm) akış hızı 0,7 mL/dakikaya ayarlandı.
- Kolonda mobil faz için; 50 mM CH₃COONa ve asetoneitrilin 70:30 oranında karışımı (pH 6.2) kullanıldı. Örnek pikleri Ex.340/Em.420 dalga boylarında detekte edilerek standart grafiği ile kantite edildi.
- Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.4.3.2.4. Yükseltgenmiş Glutasyon

Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) değeri, total glutasyon (tGSH) değerinden indirgenmiş glutasyon değerinin (GSH) çıkarılması ve sonucun ikiye bölünmesi ile hesaplanır.

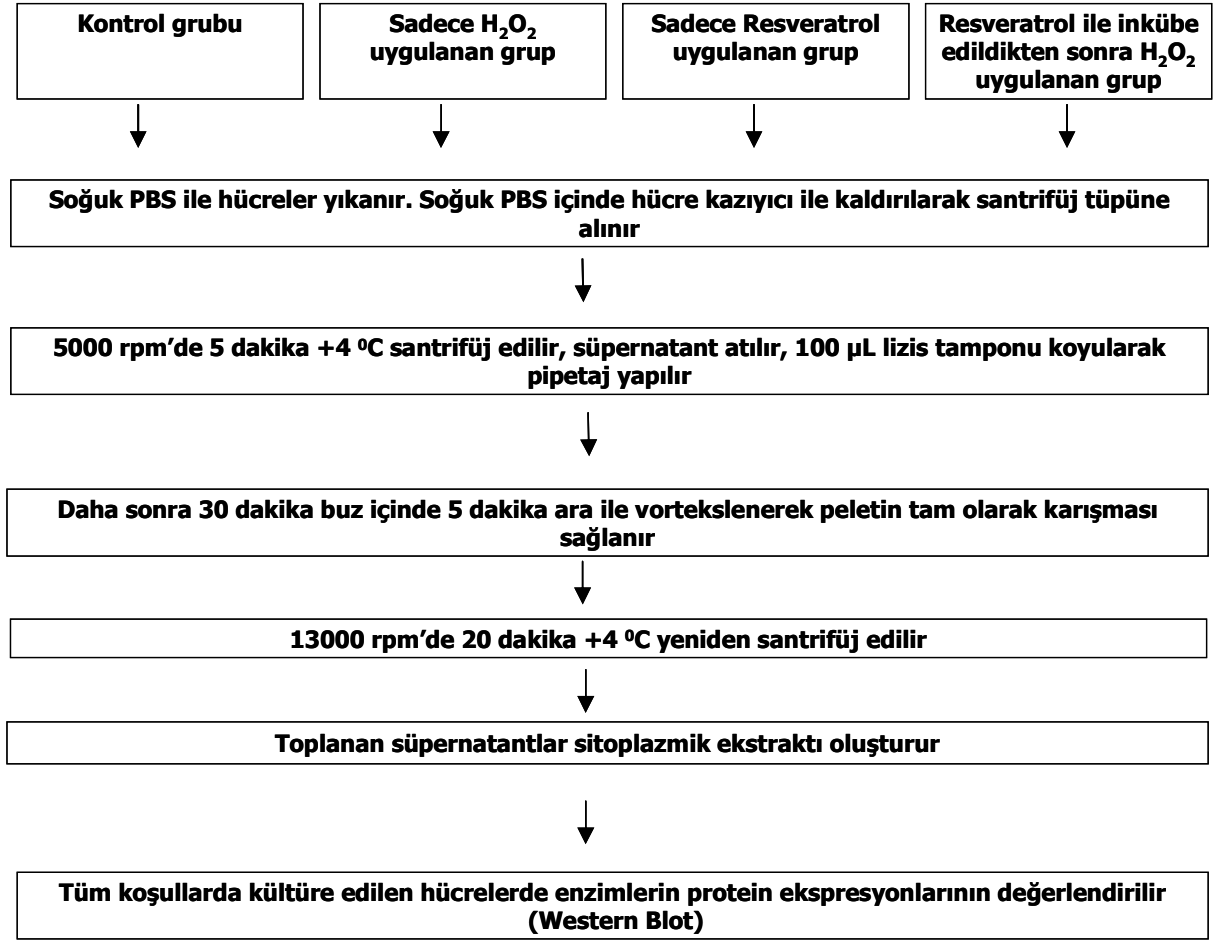
3.4.4. γ -GLUTAMİL SİSTEİN SENTETAZ (EC 6.3.2.2), GLUTATYON PEROKSİDAZ-1 (EC 1.11.1.9) VE GLUTATYON REDÜKTAZ (EC 1.6.4.2) ENZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

Hücre kültür lizatındaki γ -glutamil sistein sentetaz (73 kDa), glutatyon peroksidaz-1 (23 kDa) ve glutatyon redüktaz (65 kDa) enzimlerinin protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla Western blot yapıldı. Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein karışımının içinde düzeyini ölçmeyi planladığımız proteinin buna özgül antikorunun kullanılması ve bu proteinin düzeyinin belirtimi amacıyla yapılmaktadır. Western blot analizi; poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi ve ilgili proteinlerin görünür ve düzeyi ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 28)(59,60).



Şekil 28. Western Blot aşamalarının gösterimi (59, 60)

75 cm² hücre flasklarında hücrelerin flaskı % 70-80 kaplaması sağlandıktan sonra kontrol grubu (H₂O₂ ya da resveratrol uygulanmayan grup), sadece H₂O₂ uygulanan grup (750 μ M H₂O₂ ile 1 saat inkübasyon), sadece resveratrol uygulanan grup (50 μ M resveratrol ile 24 saat inkübasyon) ve resveratrol (50 μ M resveratrol ile 24 saat inkübasyon ve 750 μ M H₂O₂ ile 1 saat inkübasyon) uygulanan grup olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Hücre lizatı hazırlandı Hücre lizatı hazırlanması bölüm 3.4.4.1.'de, protein ölçümü bölüm 3.4.4.2.'de ayrıntılı olarak verilmektedir. Deney akış çizelgesi Şekil 29'da verilmektedir.



Şekil 29. Akış çizelgesi: Değişik koşullardaki hücrelerden Western-blot için lizat hazırlanması

3.4.4.1. Hücre Lizatı Hazırlanması

Tüm koşullardaki hücrelerden lizatlar hazırlandı (Şekil 29). Bu amaçla önce ortamlar çekildi. Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler soğuk PBS içinde kazıyıcı ile kazındı ve 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. 100 µL lizis tamponu (Tablo 1) eklendi. Peletin süspansiyonu için pipetaj yapıldı. Daha sonra 30 dakika buz içinde 5 dakika ara ile vortekslenerek peletin tam olarak karışması sağlandı. 13000 rpm'de 20 dakika +4 °C yeniden santrifüj edildi. Toplanan süpernatantlar sitoplazmik ekstraktı oluşturdu. Protein ölçümü yapıldı. Sitoplazmik ekstraktlar çalışılncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Tablo 1. Hücre lizatı hazırlamada kullanılan lizis tamponu içeriği

Stok	Final	Hacim
NP-40	%1	10 µl
3 M NaCl	150 mM	50 µl
1 M Tris pH 7.4	50 mM	50 µl
20 mM EDTA	1 mM	50 µl
Proteaz inhibitörleri (7x)	1x	142.8 µl
ddH ₂ O		697.2 µl

3.4.4.2. Protein Ölçümü

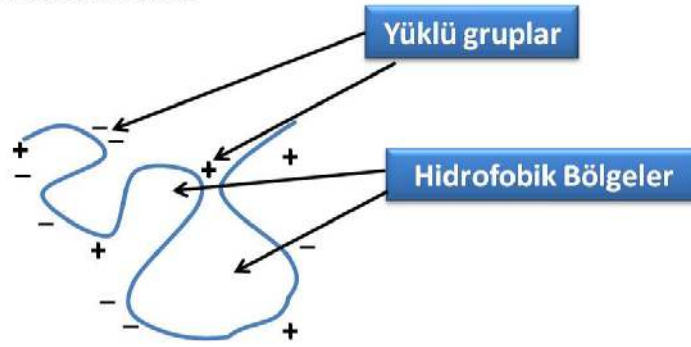
Hücre lizatlarındaki protein ölçümünde biçinkonik (BCA) protein ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemde, bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde elma yeşili renk oluşturmakta; bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında iki değerlikli Cu^{2+} iyonları bir değerlikli Cu^+ iyonlarına indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

- Protein standartı olarak bidistile su içinde 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı.
- Standartlardan ve örneklerden 25'er µl 96 kuyucuklu plağa konuldu.
- Çalışma çözeltisi; A reaktifi (biçinkonik asit solusyonu, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkonik asit ve sodyum tartarat) ve B reaktifinin (bakır sülfat solusyonu) 1:20 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- 200 µl çalışma çözeltisinden her kuyucuğa eklendi.
- 37 °C'de 30 dakika bekletildi.
- Örnek absorbansları 562 nm'de okundu.
- Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µg/mL olarak ifade edildi.

3.4.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi olarak adlandırılan elektroforezde; sodyum dodesil sülfat (SDS), bir indirgeyici ajan ve ısı ile birlikte denatüran olarak kullanılmaktadır. Proteinler küçük molekül ağırlıklı ditiyotritol (DTT) ve SDS'in varlığında ısıtılarak denatüre edilmektedir (Şekil 30). SDS, proteinleri denatüre ederek primer yapıda kalmalarını sağlayan anyonik deterjandır. Proteinler SDS'e sabit ağırlık oranında bağlanırlar böylece denatüre proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olmaktadır. SDS-protein kompleksi poliakrilamid jelinde yüklerine göre değil büyüklüklerine göre hareket etmektedirler. SDS ile muamele edilen proteinler negatif yüklendiklerinden dolayı elektriksel alanda pozitif yüke doğru göç etme özelliği gösterirler (60).

SDS uygulamasından önce



SDS uygulamasından sonra



Şekil 30. Proteinlerin SDS'e bağlanması sonucu denatürasyonu (60)

Atto marka vertikal elektroforez sistemi, AE-6220 Dual Slab Chamber elektroforez tankı ve Atto marka AE 6210 2 adet Slab Gel Cast jel kalıbı (ikişer adet 1mm'lik cam plaka, 12 kuyulu tarak ve conta) ve AE-8450 1000V güç kaynağından oluşmaktadır.

- Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. 16x16 cm boyutlarında iki cam düzlemin arasına silikonlar yerleştirilip sıkıştırılarak jel kalıbı hazırlandı.
- Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildikten sonra bir pipet yardımıyla Tablo 2'de gösterildiği gibi ayırıcı jel monomer karışımının polimerizasyonu amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi ve pipet yardımıyla

hazırlanan jel çözeltisi iki cam arasındaki boşluğa camın bir kenarından sızdırılarak döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu APS'nin eklenmesi ile başlatılmaktadır. Reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılmaktadır.

- Jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine propanol eklendi.
- Jel polimerize olduktan sonra üstteki propanol boşaltılıp su ile yıkandı.
- Paketleyici jel çözeltisi Tablo 3'te belirtildiği gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üstüne boşaltıldı. 12 kuyulu tarak 45 °C açılı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına yerleştirildi. Polimerizasyona bırakıldı.

Tablo 2. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%10) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	MİKTAR
Saf su	12.5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	10 mL
4x Tris-HCl / SDS (pH 8.8) (1.5 M Tris-HCl, % 0.4 SDS)	7.5 mL
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0.1 mL
TEMED	0.02 mL
Total karışım	30.12 mL

Tablo 3. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	MİKTAR
Saf su	6.1 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.3 mL
4x Tris-HCl (pH 6.8) (0.5 M Tris-HCl, % 0.4 SDS)	2.5 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.05 mL
TEMED	0.01 mL
Total karışım	9.96 mL

3.4.4.4. Örnek Hazırlanması

Protein örnekleri kuyucuk başına 50 µL’de yaklaşık 40 µg olacak biçimde hazırlandı ve 95 °C’de 5 dakika tutuldu.

3.4.4.5. Jelin Yükleneşi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. İki cam arasında bulunan contalar çıkartılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi ve 1 L running tamponu (Running stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH₂O 1000 ml’de) ile dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Fermantes Sm 0441) yüklendi.

3.4.4.6. Elektroforetik Yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve Atto Cell üzerine elektrotlar bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 100 Volt gerilim uygulandı. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 150 Volt’a çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

3.4.4.7. Proteinlerin Membrana Transferi

Çalışmamızda yarı-kuru transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, ATTO marka elektroblotlama sistemi (AE-6675 HorizBlot ve AE-8450 1000VC güç kaynağı) kullanıldı.

- Transferde kullanılacak polivinilidendiflorid (PVDF) membran metanol ile doyuruldu. Filtre kağıtları (1703956 Thick blot paper 15x20cm) transfer tamponu (Transfer stok solusyonu: Tris 30.3 g, Glisin 14 g, dH₂O, Total hacim 1000 ml) ile ıslatıldı.
- Western sandviçi hazırlandı: 2 adet filtre kağıtları (+) yüklü bloğa yerleştirildi, üzerine membran (Millipore, İmmobilon P, Kat No: IPVH09120; Sigma) ardından poliakrilamid jel yerleştirildi. Daha sonra filtre kağıtları transfer solusyonu ile ıslatılarak en üste yerleştirildi. Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. (-) yüklü blok kapatılarak 200 mAmp sabit akımda 2 saat süre ile transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemlerini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı. Membran dikkatlice alındı.

3.4.4.8. Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Değişik süt tozu konsantrasyonları (glutasyon peroksidaz için % 1, γ-glutamil sistein sentetaz için % 2 glutasyon redüktaz için % 3) denenerek en uygun konsantrasyonlar (sırasıyla % 3, % 4 ve % 5) seçildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi (glutasyon peroksidaz-1 ve aktin için % 3, γ-glutamil sistein sentetaz % 4 ve glutasyon redüktaz için % 5'lik süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi) içinde 30 dakika oda sıcaklığında bloke edildi. Bu süre sonunda membran üç kez % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 10 dakika süre ile yıkandı.

3.4.4.9. Primer Antikor İle İnkübasyon

Bloklama sonrasında membran, %1'lik süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/500 oranında dilüe edilmiş γ-glutamil sistein sentetaz (Santa Cruz, sc-22667), 1/200 oranında dilüe edilmiş glutasyon peroksidaz-1 (Santa Cruz, sc-22145), 1/500 oranında dilüe edilmiş glutasyon redüktaz (Santa Cruz, sc-32408) ve 1/500 oranında dilüe edilmiş aktin (Santa Cruz, sc-1615)'e karşı kullanılan primer antikor ile +4 °C'de gece boyu

inkübe edildi. Bu süre sonunda ortamdaki bağlanmamış antikor 3 kez yıkama çözeltisi (% 0.05 NP-40 içeren % 10 PBS) ile 10 dakika süre ile oda sıcaklığında yıkandı.

3.4.5.0. Sekonder antikor ile inkübasyon

Yıkama sonrasında membran primer antikorunu tanıyan sekonder antikorlarla (donkey anti-goat IgG-Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified Antibody, Santa cruise, sc-2020) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar glutatyon peroksidaz ve γ -glutamil sistein sentetaz için % 3 süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/3500 oranında, glutatyon redüktaz için % 1 süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/5000 oranında, aktin için ise % 3 süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/3500 oranında hazırlandı. Bu sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı. Çalışma Şekil 31'de kısaca özetlenmektedir.

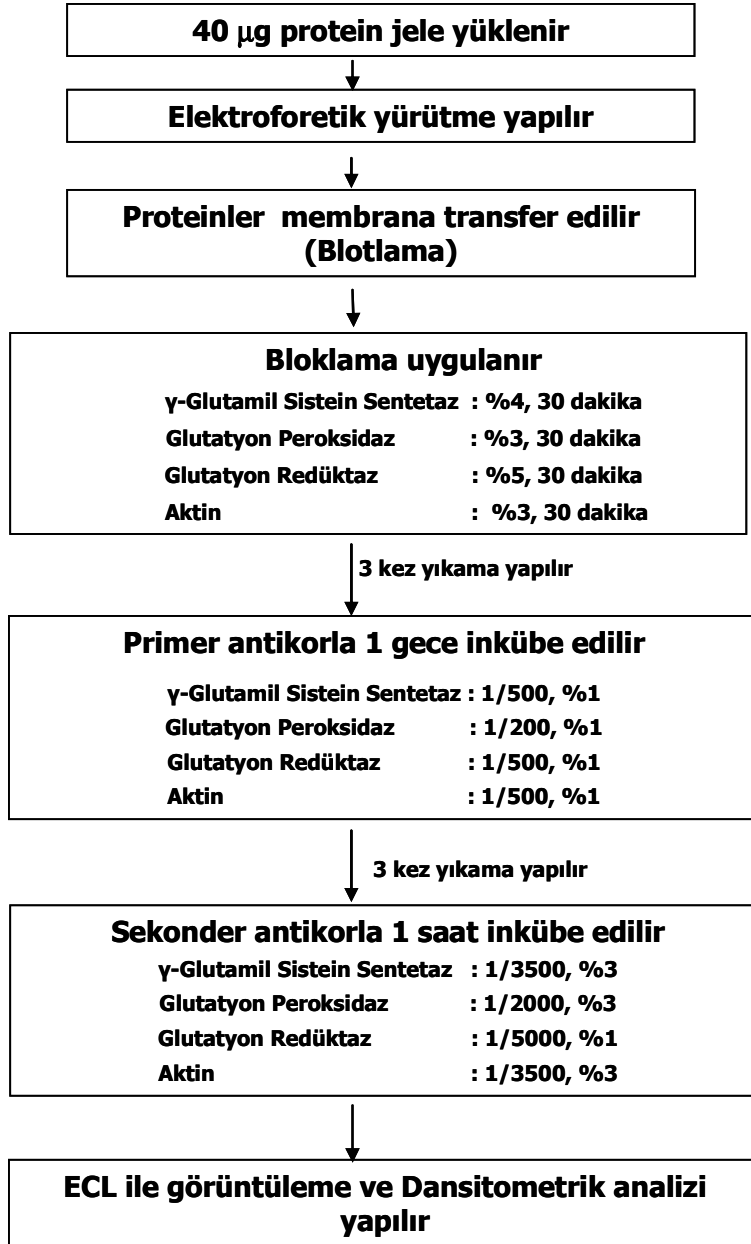
3.4.5.1. Görüntüleme

Deteksiyon aşaması: Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla Amersham marka (RPN 2132) ECL plus kiti kullanıldı (sinyal oluşturma solusyonu: kit içindeki peroksit ve enhancer solüsyonları 1ml:1ml oranında karıştırılarak hazırlandı) Kit, horseradish peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesi ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken film üzerinde kemilüminesans ışımı oluşturmaya ilkesine dayanmaktadır. Bu filmlerin dansitometrik incelenmesi, protein düzeyinin belirtilmesini sağlamaktadır.

Film aşaması: Kaset içine şeffaf dosya yerleştirildi ve bu dosyanın içine membran konuldu. Üzerine sinyal oluşturma çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) yerleştirildi. Film banyosunda (Konica SRX-101) görüntü alındı.

3.4.5.2. Dansitometrik analiz

Bant yoğunlukları Bio-Rad Quantity One 1-D Analysis Software programında değerlendirildi. Veriler β -aktine oranlanarak standardize edildi.



Şekil 31. Protein ekspresyonlarının Western blot yöntemi ile incelenmesi basamakları

3.5. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package of Social Science) Software 11.0 programında değerlendirildi. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanıldı. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. $p < 0.05$ bulunması anlamlı olarak kabul edildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

4.1.1. Resveratrolün HCAE Hücrelerine *in vitro* Etkisi

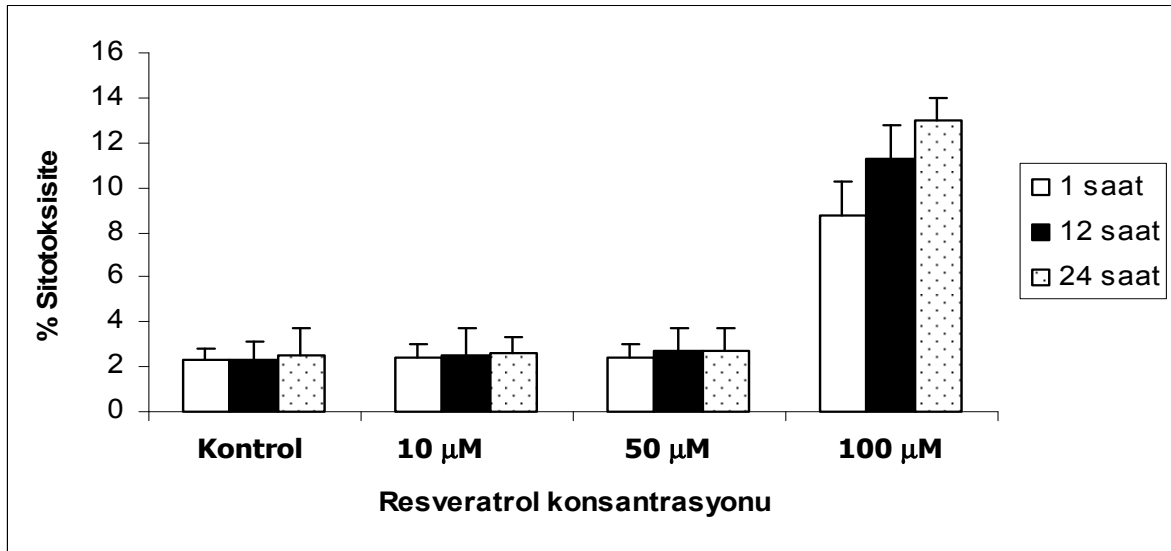
10, 50 ve 100 μ M resveratrol ile 1,12 ve 24 saat inkübasyona bırakılan insan koroner arter endotel hücrelerinde, 10 ve 50 μ M resveratrol tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak anlamlı bir hücre sitotoksitesine neden olmamaktadır. 100 μ M resveratrol ise tüm inkübasyon noktalarında % 15 civarında LDH salınımına neden olmaktadır. Elde edilen net absorbans bulguları Tablo 4'te, sitotoksitesite bulguları Tablo 5'te ve Şekil 32'de gösterilmektedir. Resveratrolün 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarının 1,12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde kontrole göre anlamlılık düzeyleri Tablo 6'da verilmektedir. 10 ve 50 μ M resveratrolle 1, 12 ve 24 saat inkübasyonda kontrole benzer değerler elde edildi. 10 ve 50 μ M konsantrasyonlarda resveratrolün hücrelerde oluşturduğu sitotoksitede anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). 100 μ M resveratrol ile tüm inkübasyon sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). 100 μ M resveratrol insan koroner arter endotel hücrelerinde oluşturduğu sitotoksitesite kontrol grubuna göre anlamlı bulundu.

Tablo 4. Resveratrolün HCAE hücrelerine *in vitro* etkisinin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbans bulguları (492 nm). Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
Kontrol	0.025 $\pm$ 0.006	0.024 $\pm$ 0.006	0.027 $\pm$ 0.006
10 μ M RSV	0.026 $\pm$ 0.006	0.028 $\pm$ 0.012	0.032 $\pm$ 0.006
50 μ M RSV	0.030 $\pm$ 0.006	0.033 $\pm$ 0.010	0.036 $\pm$ 0.010
100 μ M RSV	0.090 $\pm$ 0.016	0.125 $\pm$ 0.016	0.131 $\pm$ 0.010

Tablo 5. Resveratrolün HCAE hücrelerine etkisinin LDH ile değerlendirildiği deneyde % sitotoksite bulguları. Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
Kontrol	2.2 $\pm$ 0.56	2.3 $\pm$ 0.68	2.5 $\pm$ 0.54
10 μM RSV	2.4 $\pm$ 0.56	2.5 $\pm$ 1.21	2.6 $\pm$ 0.70
50 μM RSV	2.4 $\pm$ 0.62	2.7 $\pm$ 1.00	2.7 $\pm$ 1.00
100 μM RSV	8.7 $\pm$ 1.54	11.3 $\pm$ 1.50	13.0 $\pm$ 0.96



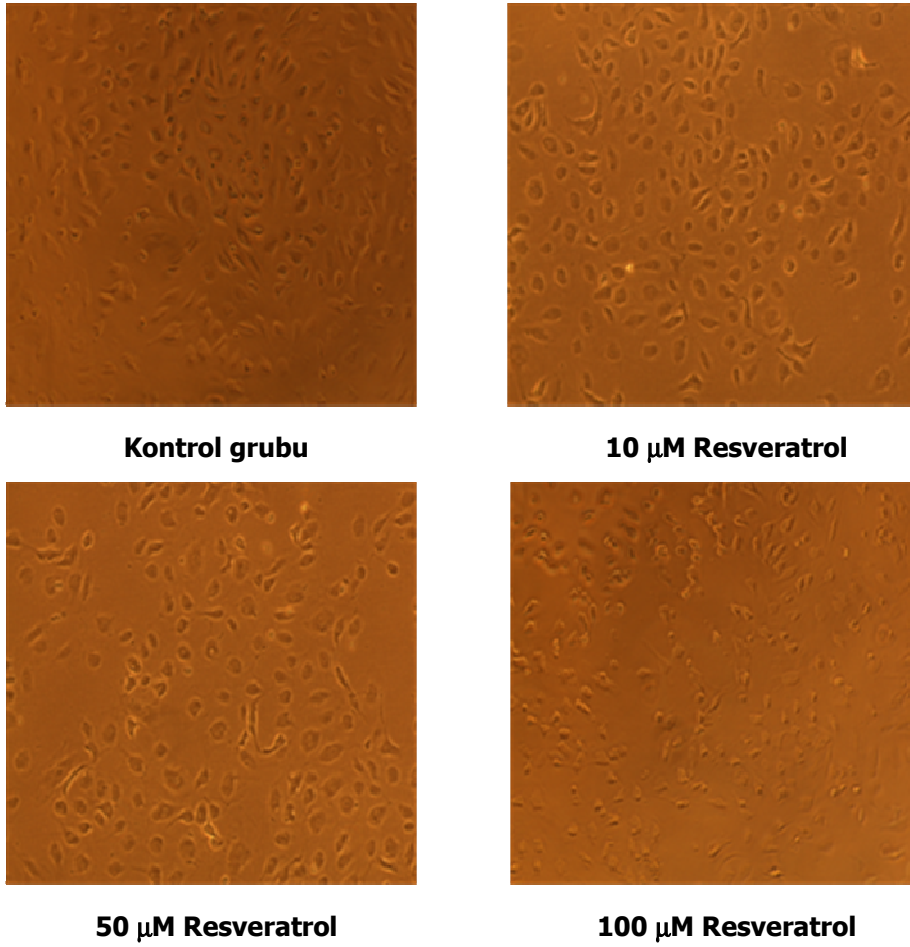
Şekil 32. HCAE hücrelerinde 10, 50 ve 100 μ M resveratrolün 1, 12 ve 24 saat inkübasyonları ile elde edilen % sitotoksiste değerlerinin grafikte gösterimi (Kontrol grubu resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Tablo 6. Resveratrolün 10,50 ve 100 μ M konsantrasyonlarının 1,12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde kontrole göre "p" değerleri. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmektedir (Kontrol grubu resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
Kontrol-10 μM RSV	0.663	0.772	0.559
Kontrol-50 μM RSV	0.773	0.564	0.564
Kontrol-100 μM RSV	0.021	0.021	0.021

4.1.1.1. Resveratrolün HCAE Hücrelerine Etkisinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

2500-5000 hücre /cm² ekilen HCAE hücreleri 5-9 gün içerisinde %80 oranında kültür kabını kaplayarak pasaja hazır hale geldiler. Şekil 33'te kontrol hücreleri ve 10, 50 ve 100 µM resveratrol ile 24 saat inkübe edilen hücelere ilişkin görüntüler gösterilmektedir. Hücre ölümündeki artış hücrelerin mikroskopik görünümü ile de desteklenmektedir.



Şekil 33. 10, 50 ve 100 µM resveratrol ile 24 saat inkübe edilen HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri (20X büyütme) (Kontrol grubu resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

4.1.2. H₂O₂ Hasar Modelinin Oluşturulması

100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H₂O₂ ile 1 saat, 3 saat ve 6 saat inkübasyona bırakılan insan koroner arter endotel hücrelerinde sitotoksosite tüm zaman noktalarında ve sürelerinde kontrol hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0.05$). Sitotoksitedeki artış hücrelerin mikroskopik görünüşleri ile de desteklendi. Hücrelerin 1 saat H₂O₂ ile inkübasyonuna ilişkin görüntüler 4.1.2.1. başlığı altında gösterilmektedir. LDH ile net absorbans ve sitotoksosite bulguları Tablo 7 ve Tablo 8'de; % sitotoksosite bulguları konsantrasyonlara bağlı olarak Şekil 34'te gösterilmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırmada elde edilen p değerleri Tablo 9'da görülmektedir.

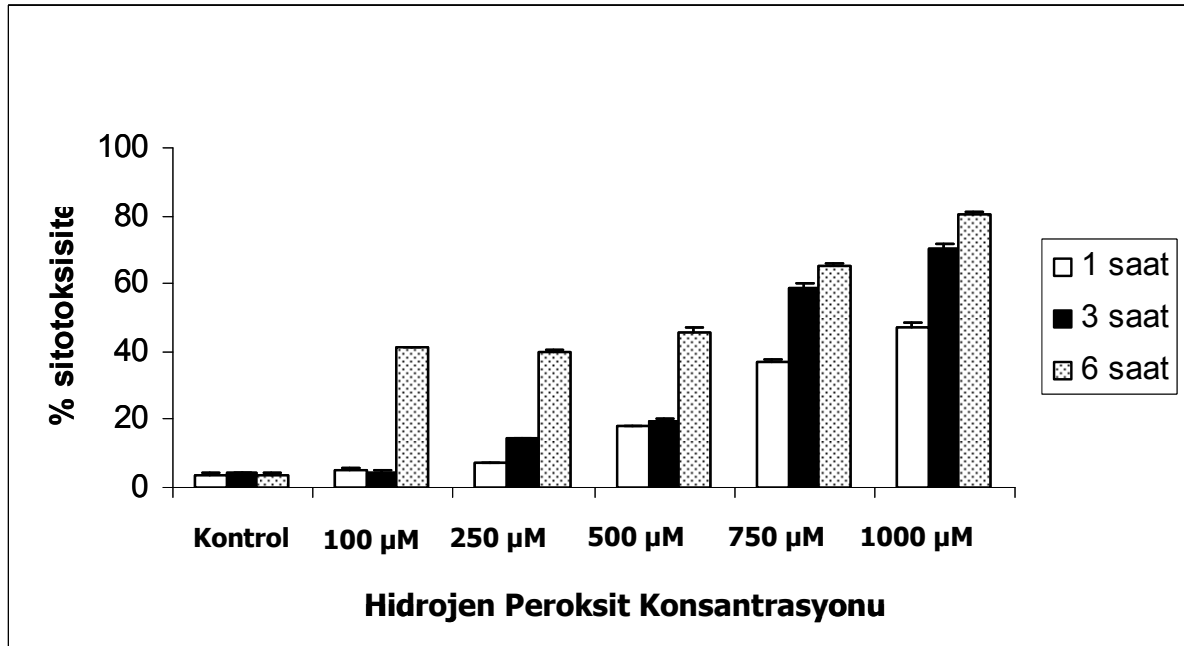
H₂O₂ ile 100, 250, 500, 750 μM konsantrasyonlarında ve 1, 3, 6 saat inkübasyon sürelerinde yapılan tüm deneylerde 750 μM H₂O₂'in 1 saat inkübasyona bırakılan insan koroner arter endotel hücre hattında % 30-40 arasında hücre ölümüne yol açtığı görüldü.

Tablo 7. H₂O₂ hasar modelinde sitotoksitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbans bulguları (492 nm). Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	3 saat	6 saat
Kontrol	0.039 $\pm$ 0.001	0.040 $\pm$ 0.001	0.039 $\pm$ 0.001
100 μM H ₂ O ₂	0.056 $\pm$ 0.001	0.050 $\pm$ 0.009	0.412 $\pm$ 0.002
250 μM H ₂ O ₂	0.070 $\pm$ 0.003	0.150 $\pm$ 0.001	0.427 $\pm$ 0.002
500 μM H ₂ O ₂	0.182 $\pm$ 0.003	0.202 $\pm$ 0.003	0.472 $\pm$ 0.001
750 μM H ₂ O ₂	0.373 $\pm$ 0.004	0.614 $\pm$ 0.001	0.645 $\pm$ 0.002
1000 μM H ₂ O ₂	0.478 $\pm$ 0.004	0.732 $\pm$ 0.004	0.815 $\pm$ 0.002

Tablo 8. H₂O₂ hasar modelinde sitotoksitenin LDH ile değeriendirildiği deneyde % sitotoksite bulguları. Bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	3 saat	6 saat
Kontrol	3.9 $\pm$ 0.18	4.0 $\pm$ 0.15	3.9 $\pm$ 0.08
100 μM H₂O₂	5.6 $\pm$ 0.17	5.0 $\pm$ 0.09	41.2 $\pm$ 0.02
250 μM H₂O₂	7.0 $\pm$ 0.30	15.0 $\pm$ 0.17	42.7 $\pm$ 0.08
500 μM H₂O₂	18.3 $\pm$ 0.15	20.2 $\pm$ 0.37	47.2 $\pm$ 0.27
750 μM H₂O₂	37.3 $\pm$ 0.41	61.3 $\pm$ 0.19	64.5 $\pm$ 0.21
1000 μM H₂O₂	47.8 $\pm$ 0.41	73.5 $\pm$ 0.46	81.5 $\pm$ 0.26



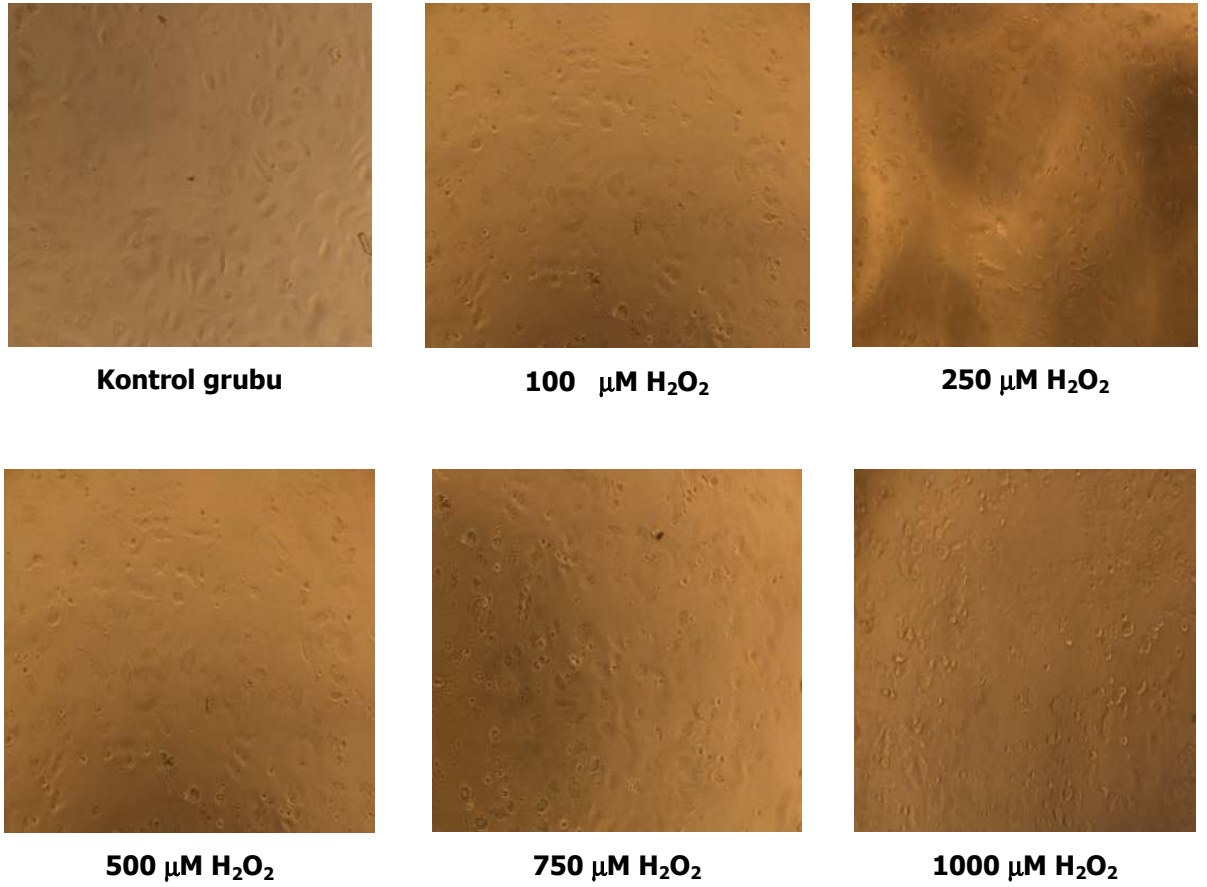
Şekil 34. HCAE hücrelerinde 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M H₂O₂ ve 1, 3 ve 6 saat inkübasyonu ile elde edilen % sitotoksiste değerielerinin grafikte gösterimi (Kontrol grubu H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur).

Tablo 9. H₂O₂'ın değişik konsantrasyonlarının sitotoksosite üzerine etkilerinin kontrole göre tüm zaman noktalarındaki istatistiksel sonuçları. p< 0.05 anlamlı kabul edilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	3 saat	6 saat
Kontrol- 100 µM H₂O₂	p=0.020	p=0.021	p=0.021
Kontrol- 250 µM H₂O₂	p=0.021	p=0.021	p=0.021
Kontrol -500 µM H₂O₂	p=0.020	p=0.021	p=0.021
Kontrol- 750 µM H₂O₂	p=0.021	p=0.021	p=0.021
Kontrol- 1000 µM H₂O₂	p=0.020	p=0.020	p=0.021

4.1.2.1. H₂O₂ Hasar Modeline İlişkin Mikroskopik Görüntüler

2500-5000 hücre /cm² ekilen HCAE hücreleri 5-9 gün içerisinde % 80 oranında kültür kabını kaplayarak pasaja hazır hale geldiler. Şekil 35'te değişik konsantrasyonlarda H₂O₂ ile bir saat inkübasyona bırakılan deney koşulundaki HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri verilmektedir.



Şekil 35. Hasar modeli oluşturma deneyinde: Kontrol grubu (H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur) ve 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM H₂O₂ ile 1 saat inkübasyona bırakılan HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri (20X büyütme).

4.1.3. Resveratrolün H₂O₂ İle Oluşturulan Hasara Etkisi

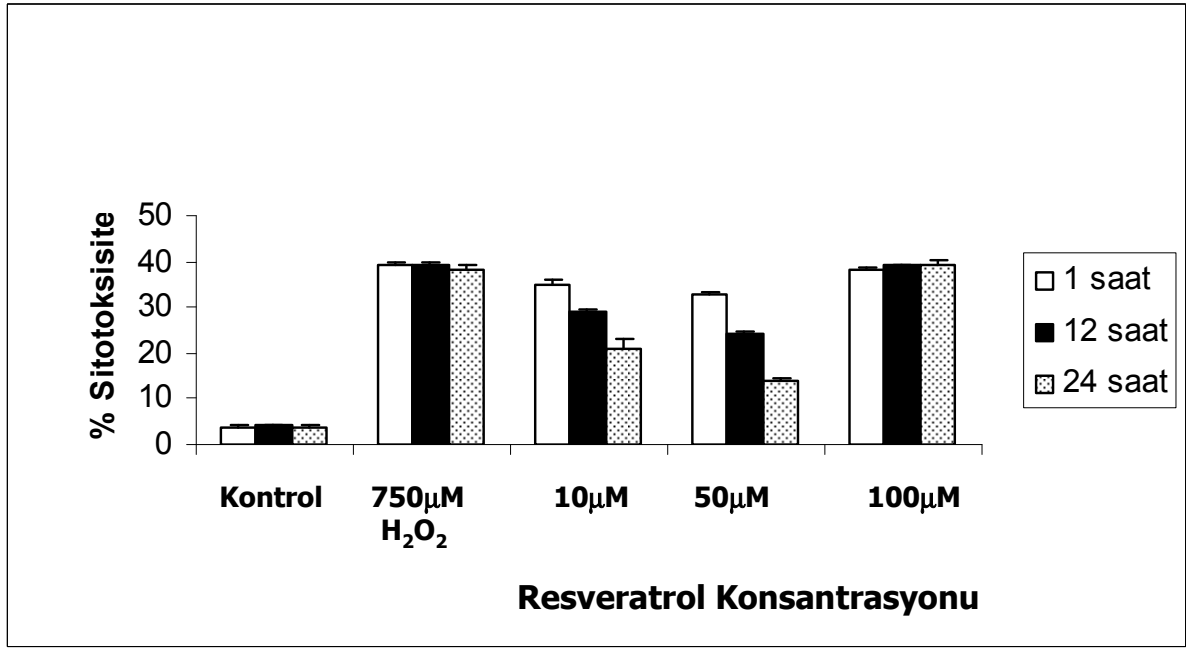
10, 50 ve 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda ortalama net absorbands değerleri ve sitotoksosite yüzdeleri sırasıyla Tablo 10 ve 11’de verilmektedir. 10, 50 ve 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda elde edilen % sitotoksosite değerleri Şekil 36’da gösterilmektedir. Elde edilen sitotoksosite bulgularına göre 10, 50 ve 100 µM resveratrol ile preinkübasyona bırakılan HCAE hücreleri 750 µM H₂O₂ ile bir saat muamele edildiğinde resveratrolün 10 ve 50 µM konsantrasyonlarının 1, 12 ve 24 saat preinkübasyon sürelerinde koruyucu olduğu, 750 µM H₂O₂’in oluşturduğu sitotoksositeyi istatistiksel olarak anlamlı azalttığı saptanmıştır (p<0.05). 10 ve 50 µM resveratrol konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.05). 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyon sürelerinde sitotoksositeyi istatistiksel olarak anlamlı azaltmadığı saptanmıştır (p>0.05) (Tablo 12).

Tablo 10. 10, 50 ve 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda sitotoksitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde ortalama net absorbands bulguları (492 nm). Bulgular ortalama ± standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
Kontrol	0.040 ± 0.008	0.050 ± 0.001	0.046 ± 0.004
750 µM H ₂ O ₂	0.390 ± 0.004	0.391 ± 0.040	0.386 ± 0.006
10 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	0.351 ± 0.004	0.293 ± 0.003	0.219 ± 0.009
50 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	0.330 ± 0.002	0.247 ± 0.001	0.149 ± 0.003
100 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	0.388 ± 0.003	0.391 ± 0.001	0.395 ± 0.002

Tablo 11. 10, 50 ve 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda sitotoksitenin LDH ile değerlendirildiği deneyde % sitotoksosite bulguları. Bulgular ortalama ± standart sapma olarak verilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
Kontrol	4.0 ± 0.16	5.0 ± 0.28	4.6 ± 0.50
750 µM H ₂ O ₂	39.0 ± 0.88	39.1 ± 0.80	38.6 ± 1.20
10 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	35.1 ± 0.96	29.3 ± 0.70	21.9 ± 1.56
50 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	33.0 ± 0.60	24.7 ± 0.60	14.9 ± 0.60
100 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	38.8 ± 0.61	39.1 ± 0.35	39.5 ± 1.20



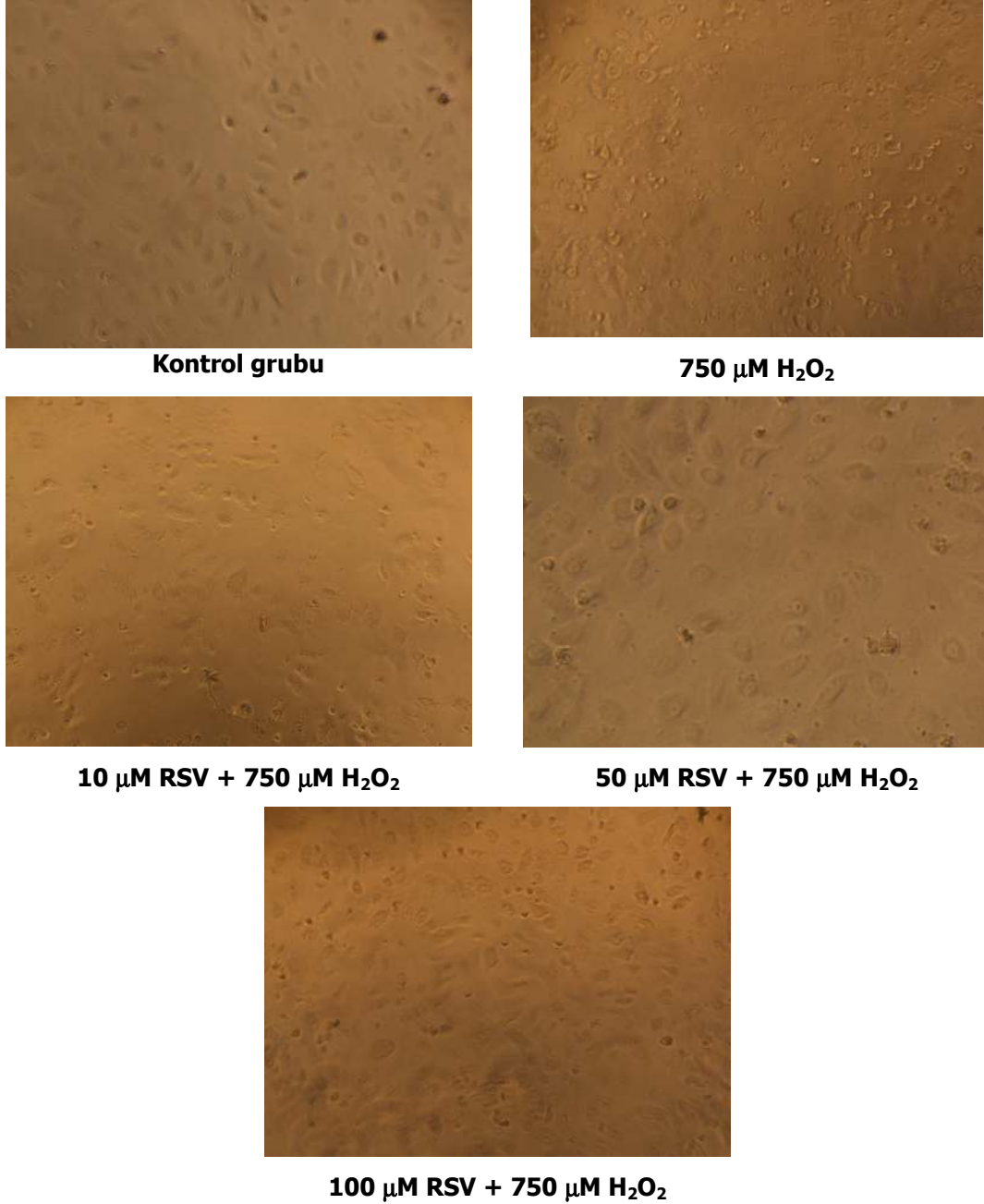
Şekil 36. 10, 50 ve 100 µM resveratrolün 1, 12 ve 24 saat preinkübasyonunda elde edilen % sitotoksiste değerlerinin grafikte gösterimi (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Tablo 12. 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında resveratrolün sitotoksiste üzerine etkilerinin 1,12 ve 24 saat inkübasyon süreleri açısından istatistiksel sonuçları. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir (Karşılaştırma, resveratrolün tüm inkübasyon sürelerinde, 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında preinkübe edilen gruplar ile H₂O₂ grubu arasında; 10 µM ve 50 µM resveratrol ile tüm inkübasyon sürelerinde preinkübe edilen gruplar arasında yapılmıştır).

Koşullar	1 saat	12 saat	24 saat
750 µM H ₂ O ₂ – (10 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂)	p=0.021	p=0.021	p=0.021
750 µM H ₂ O ₂ – (50 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂)	p=0.021	p=0.020	p=0.021
750 µM H ₂ O ₂ – (100 µMRSV+750 µM H ₂ O ₂)	p=0.885	p=0.386	p=0.386
(10 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂) - (50 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂)	p=0.021	p=0.021	p=0.020

4.1.3.1. Resveratrolün H_2O_2 Hasarına Karşı Koruyucu Etkisinin Mikroskopik Olarak Gözlenmesi

10, 50 ve 100 μM resveratrol ile 24 saat preinkübe edildikten sonra 750 μM H_2O_2 ile 1 saat inkübe edilen HCAE hücrelerinin morfolojik görünümü Şekil 37’de verilmektedir.



Şekil 37. Resveratrolün koruyuculuk deneyinde: Kontrol grubu (H_2O_2 ya da resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve 10, 50 ve 100 μM RSV ile preinkübasyona bırakıldıktan sonra 750 μM H_2O_2 ile 1 saat inkübasyona bırakılan HCAE hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri (20X büyütme).

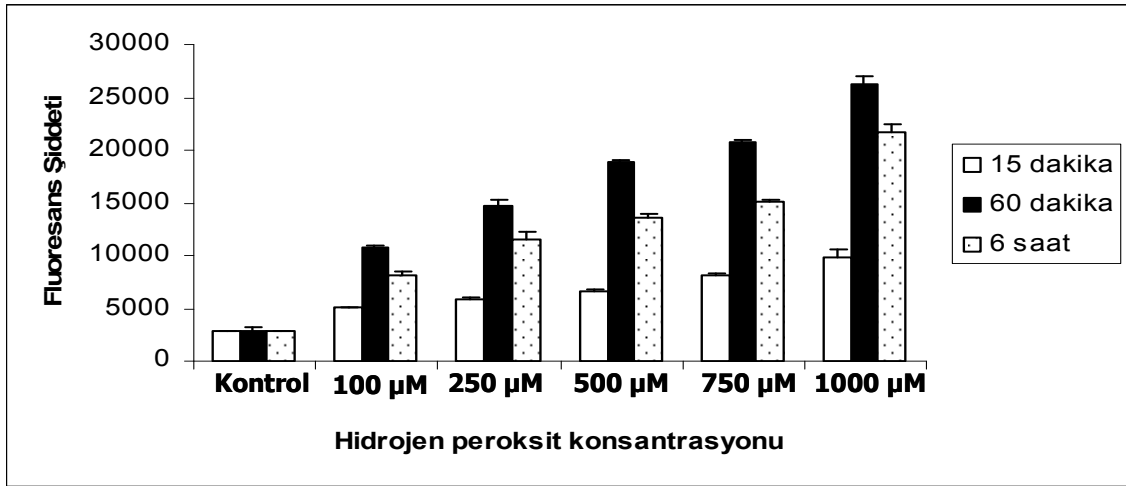
4.2. ROS ANALİZLERİ

4.2.1. H₂O₂ Hasar Modelinde ROS Oluşumunun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

HCAE hücrelerinde farklı H₂O₂ konsantrasyonlarında ve sürelerinde ROS oluşumu (Tablo 13 ve Şekil 38) gösterilmektedir. 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM H₂O₂ konsantrasyonları ile 20 dakika muamele edilen insan koroner arter endotel hücrelerinde 15. dakika, 60. dakika ve 6. saat zaman noktalarında ortalama floresans şiddeti değerleri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermektedir. Farklı sürelerde kontrol grubu ile H₂O₂ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 14).

Tablo 13. HCAE hücrelerinde H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarında ve sürelerinde ROS oluşumu. Değerler grup ortalama floresans şiddeti ± standart sapma olarak verilmiştir (Kontrol grubu H₂O₂ ile muamele edilmeyen gruptur).

	15. dakika	60. dakika	6 .saat
Kontrol	2848 ± 144	2861 ± 380	2842 ± 160
100 µM H₂O₂	5050 ± 137	10696 ± 280	8104 ± 246
250 µM H₂O₂	5825 ± 198	14692 ± 520	11437 ± 950
500 µM H₂O₂	6585 ± 128	18892 ± 126	13567 ± 402
750 µM H₂O₂	8139 ± 274	20751 ± 244	15007 ± 280
1000 µM H₂O₂	9763 ± 915	26209 ± 720	21679 ± 720



Şekil 38. HCAE hücrelerinde H_2O_2 'in farklı konsantrasyonlarının ROS oluşumuna etkisinin grafiksel gösterimi. Değerler fluoresans şiddeti olarak verilmiştir (Kontrol grubu H_2O_2 ile muamele edilmeyen gruptur).

Tablo 14. HCAE hücrelerinde H_2O_2 'in farklı konsantrasyonlarında ve sürelerinde yapılan deneyin kontrol grubuna göre karşılaştırılmasının istatistiksel sonuçları. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir (Kontrol grubu H_2O_2 ile muamele edilmeyen gruptur).

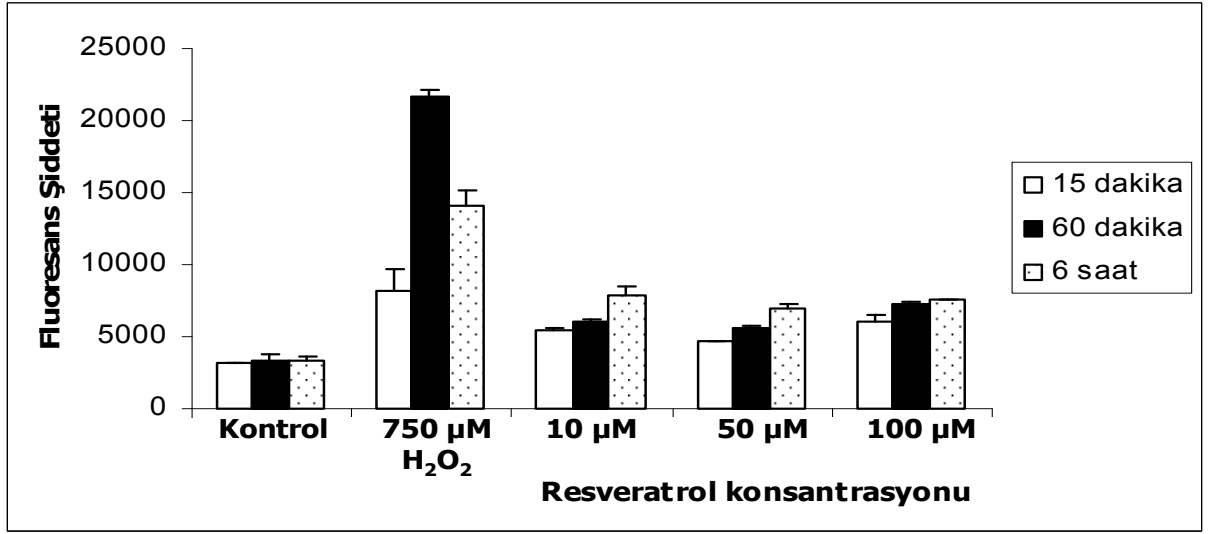
Koşullar	15. dakika	60. dakika	6. saat
Kontrol- 100 µM	0.021	0.021	0.021
Kontrol- 250 µM	0.021	0.021	0.021
Kontrol- 500 µM	0.021	0.021	0.021
Kontrol- 750 µM	0.021	0.021	0.021
Kontrol -1000 µM	0.021	0.021	0.021

4.2.2. Resveratrolün H₂O₂ Hasar Modelinde ROS Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

HCAE hücrelerinde resveratrolün 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonları ile değişik sürelerde inkübasyon sonrasında ROS oluşumuna etkileri verilmektedir (Tablo 15). HCAE hücrelerinde farklı koşullarda resveratrolün etkisi Şekil 39'de gösterilmektedir. 10, 50 ve 100 µM resveratrol ile 24 saat preinkübasyona bırakılan HCAE hücreleri 750 µM H₂O₂ ile 20 dakika muamele edildiğinde 15., 60. dakika ve 6 saat zaman noktalarında resveratrolün tüm konsantrasyonlarının ROS oluşumunu anlamlı olarak azalttığı saptandı (p<0.05) (Tablo 16).

Tablo 15. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarının ROS oluşumuna etkisi. Değerler grup ortalama floresans şiddeti ± standart sapma olarak verilmiştir (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	15. dakika	60. dakika	6. saat
Kontrol	3154 ± 88	3310 ± 490	3264 ± 344
750 µM H ₂ O ₂	8804 ± 1499	21568 ± 420	14047 ± 1088
10 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	5433 ± 180	6078 ± 90	7825 ± 726
50 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	4636 ± 31	5589 ± 208	6964 ± 380
100 µM RSV+750 µM H ₂ O ₂	6086 ± 492	7269 ± 180	7525 ± 88



Şekil 39. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarının ROS oluşumuna etkisinin grafiksel gösterimi. Değerler floresans şiddeti olarak verilmiştir (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

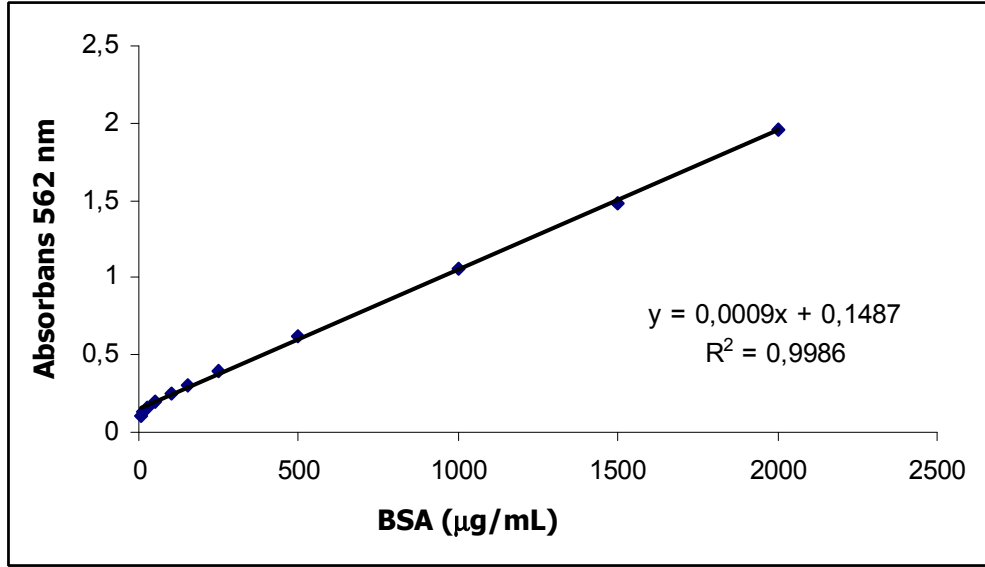
Tablo 16. HCAE hücrelerinde resveratrolün farklı konsantrasyonlarında yapılan deneyin tüm zaman noktalarında H₂O₂ grubuna göre yapılan karşılaştırılmasının istatistiksel sonuçları. p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmektedir (Kontrol grubu H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur).

Koşullar	15. dakika	60. dakika	6. saat
Kontrol-H₂O₂	0.021	0.021	0.020
750 µM H₂O₂- (10 µM RSV+750 µM H₂O₂)	0.021	0.021	0.020
750 µM H₂O₂- (50 µM RSV+750 µM H₂O₂)	0.021	0.021	0.020
750 µM H₂O₂- (100 µM RSV+750 µM H₂O₂)	0.021	0.021	0.020

4.3. İNDİRGENMİŞ VE YÜKSELTGENMİŞ GLUTATYON ANALİZİ

4.3.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Protein Düzeyleri

Şekil 40'da gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney gruplarında hücre lizatında protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 17). Her koşul için saptanan protein düzeyleri glutatyonun mg protein başına oranlaması (nmol/mg protein) için kullanıldı.



Şekil 40. BSA standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 17. Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen grup) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) hücre lizatı ortalama protein düzeyleri

Gruplar	Protein Düzeyleri (µg/mL)
Kontrol grubu	924 ± 20.21
750 µM H ₂ O ₂	954 ± 5.00
50 µM RSV + 750 µM H ₂ O ₂	1314 ± 13.38
50 µM RSV	929 ± 10.41

4.3.2. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Glutasyon Düzeyleri

24 saat 50 μM resveratrol ile inkübe edildikten sonra 750 μM , 1 saat H_2O_2 uygulanan HCAE hücrelerinde indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon düzeyleri HPLC ile örneklerdeki protein düzeyleri BCA ile değerlendirildi (Tablo 18, Tablo 19). Kontrol grubuna göre H_2O_2 grubunda indirgenmiş glutasyon düzeyi anlamlı olarak azalmakta ($p<0.05$), resveratrol H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında indirgenmiş glutasyon düzeyini anlamlı olarak arttırmaktadır ($p<0.05$). Sadece resveratrol uygulamasının, kontrol grubuna göre indirgenmiş glutasyon düzeyini anlamlı olarak arttırdığı saptandı ($p<0.05$) (Şekil 41, Tablo 20).

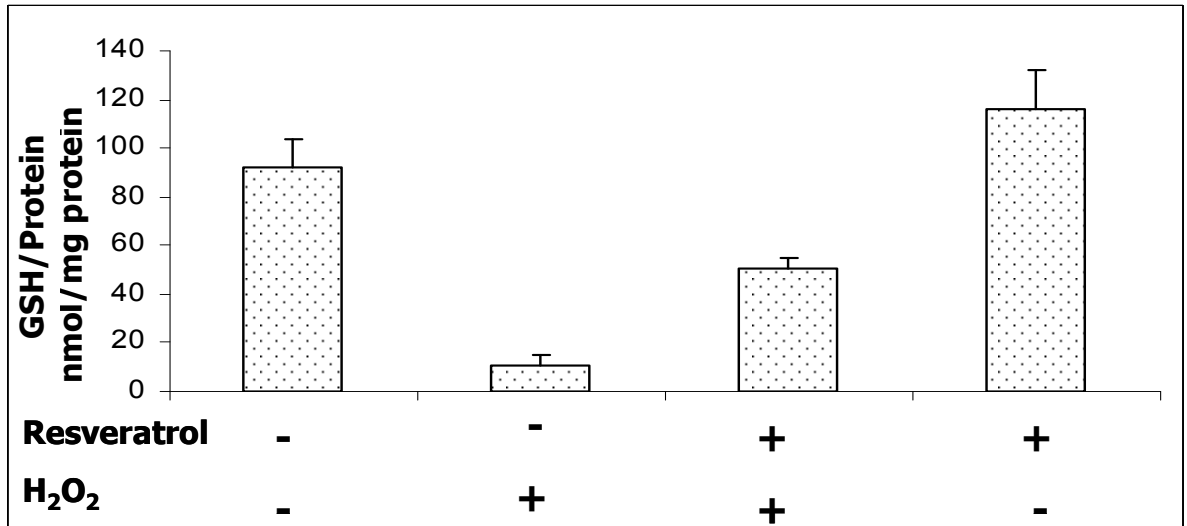
Kontrol grubuna göre H_2O_2 grubunda yükseltgenmiş glutasyon düzeyi anlamlı olarak artmaktadır ($p<0.05$); resveratrol, H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında yükseltgenmiş glutasyon düzeyini anlamlı olarak azaltmamaktadır ($p>0.05$). Sadece resveratrol uygulaması da kontrol grubuna göre yükseltgenmiş glutasyon düzeyini anlamlı olarak azaltmamaktadır ($p>0.05$). (Tablo 21, Şekil 42). İndirgenmiş glutasyon ve yükseltgenmiş glutasyon düzeyleri karşılaştırıldığında, H_2O_2 ile muamelede indirgenmiş glutasyon düzeyindeki azalmaya karşılık gelecek bir artış yükseltgenmiş glutasyonda gözlenmemektedir (Şekil 43).

Tablo 18. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) indirgenmiş glutasyon (GSH) bulguları. Bulgular nmol/mg protein olarak ifade edilmektedir.

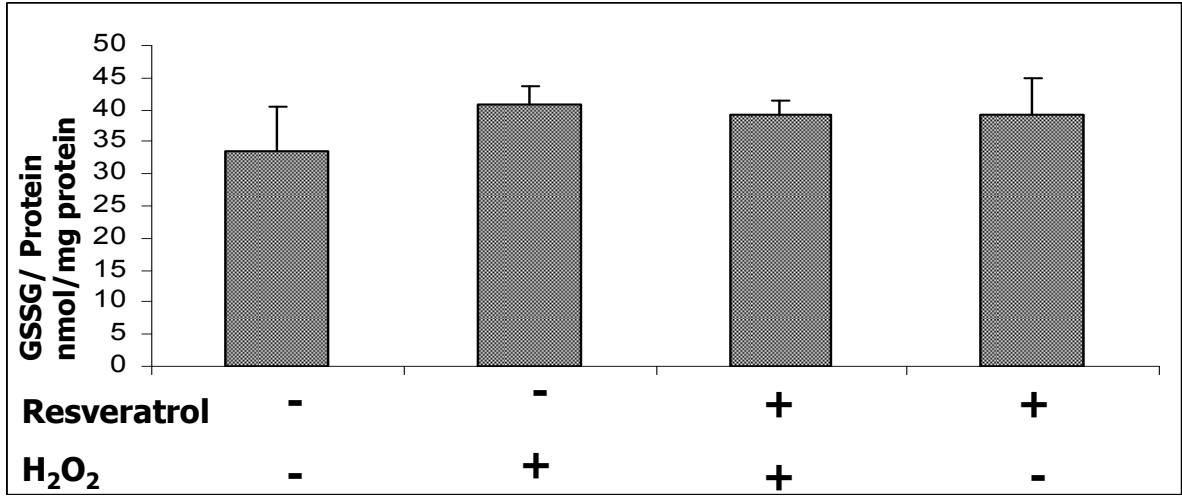
Gruplar	GSH/protein (nmol/mg protein)
Kontrol grubu	82.25 $\pm$ 13.02
750 μM H_2O_2	12.91 $\pm$ 10.38
50 μM RSV + 750 μM H_2O_2	51.50 $\pm$ 16.33
50 μM RSV	100.0 $\pm$ 19.97

Tablo 19. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) bulguları. Bulgular nmol/mg protein olarak ifade edilmektedir.

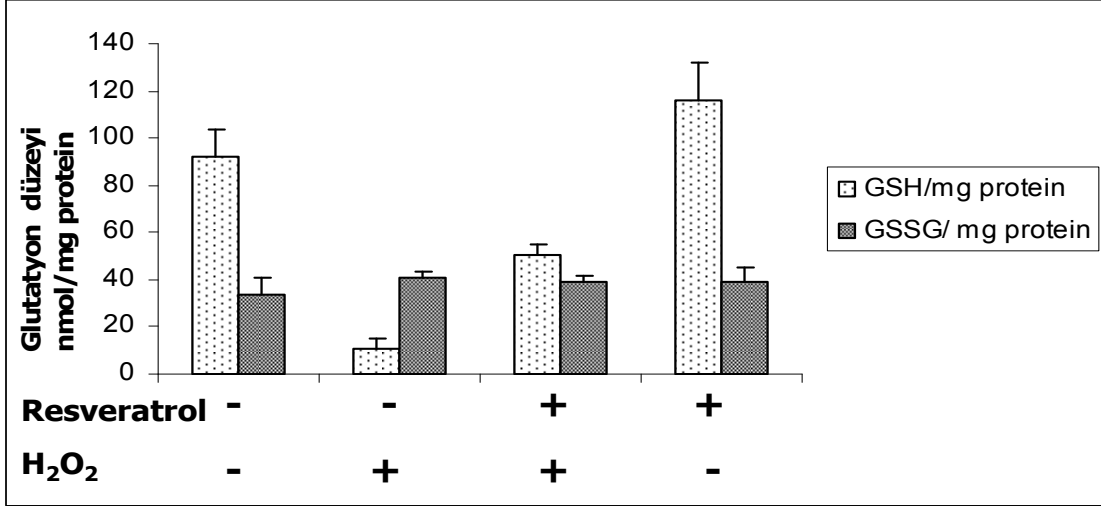
Gruplar	GSSG/protein (nmol/mg protein)
Kontrol grubu	33.60 ± 6.8
750 μM H_2O_2	42.01 ± 2.9
50 μM RSV + 750 μM H_2O_2	39.01 ± 2.0
50 μM RSV	39.32 ± 5.8



Şekil 41. HCAE hücrelerinde Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) indirgenmiş glutatyon düzeylerinin grafiksel gösterimi (bulgular nmol/mg protein olarak ifade edilmektedir).



Şekil 42. HCAE hücrelerinde Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) yükseltgenmiş glutatyon düzeylerinin grafiksel gösterimi (bulgular nmol/mg protein olarak ifade edilmektedir).



Şekil 43. Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) bulgularının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi (bulgular nmol/mg protein olarak ifade edilmektedir).

Tablo 20. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) indirgenmiş glutatyon düzeyi açısından istatistiksel sonuçlar. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Gruplar	p değerleri
Kontrol - H_2O_2	0.004
H_2O_2 - RSV+ H_2O_2	0.004
Kontrol- RSV	0.016

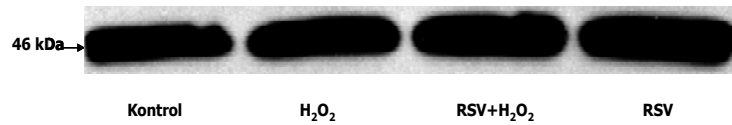
Tablo 21. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) yükseltgenmiş glutatyon düzeyi açısından istatistiksel sonuçlar. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Gruplar	p değerleri
Kontrol - H_2O_2	0.025
H_2O_2 - RSV+ H_2O_2	0.054
Kontrol- RSV	0.150

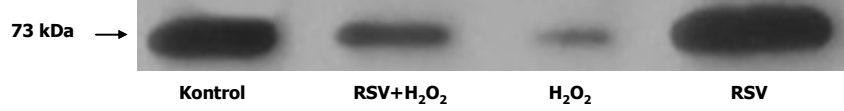
4.4. γ -GLUTAMİL SİSTEİN SENTETAZ (EC 6.3.3.2), GLUTATYON PEROKSİDAZ-1 (EC 1.11.1.9) VE GLUTATYON REDÜKTAZ (EC 1.6.2.4) ENZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ WESTERN BLOT İLE ANALİZİ

4.4.1. Kontrol ve Deney Gruplarında Protein Ekspresyonlarının Western Blot İle Gösterilmesi

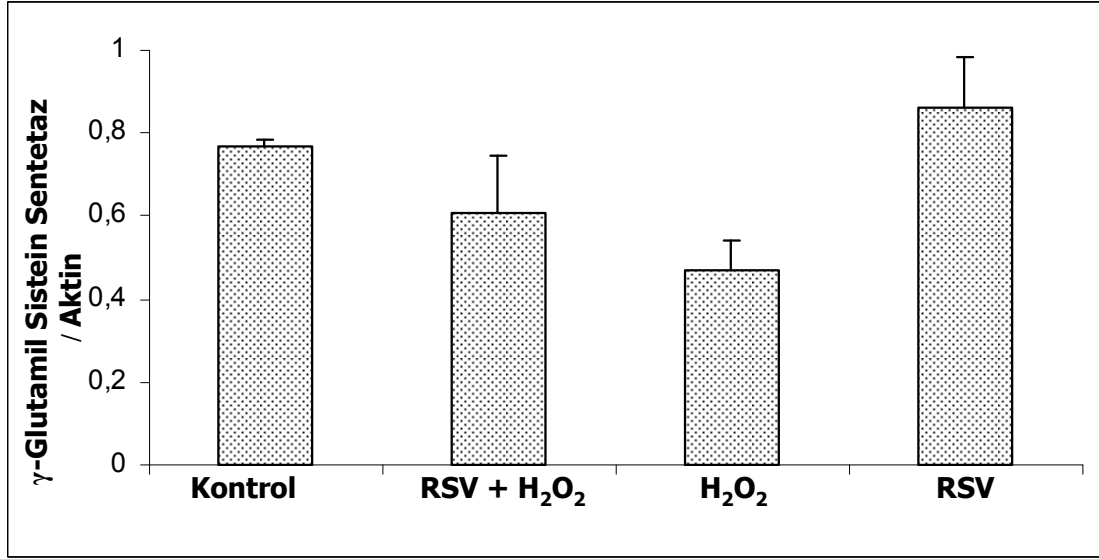
24 saat 50 μ M resveratrol ile inkübe edildikten sonra 750 μ M, 1 saat H_2O_2 uygulanan HCAE hücrelerinde, kontrol ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonları Western blot yöntemi ile değerlendirildi. γ -Glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarının H_2O_2 uygulaması ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptandı ($p<0.05$) (Tablo 22, 23, 24). Resveratrol, γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarını arttırdı. Bu, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Sadece resveratrol ile muamele edilen grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$). Temsili film görüntüleri β -aktin için Şekil 44'te verilmektedir. γ -glutamil sistein sentetazın temsili film görüntüleri Şekil 45'te, glutatyon peroksidazın temsili film görüntüleri Şekil 47'te, glutatyon redüktazın temsili film görüntüleri Şekil 48'de verilmektedir. Bulgular enzimlerin protein ekspresyonları β - aktin'e oranlanarak verilmektedir (Şekil 46, 48, 50).



Şekil 44. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) β -aktin ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



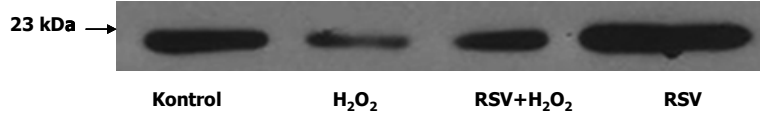
Şekil 45. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) γ -glutamil sistein sentetaz ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



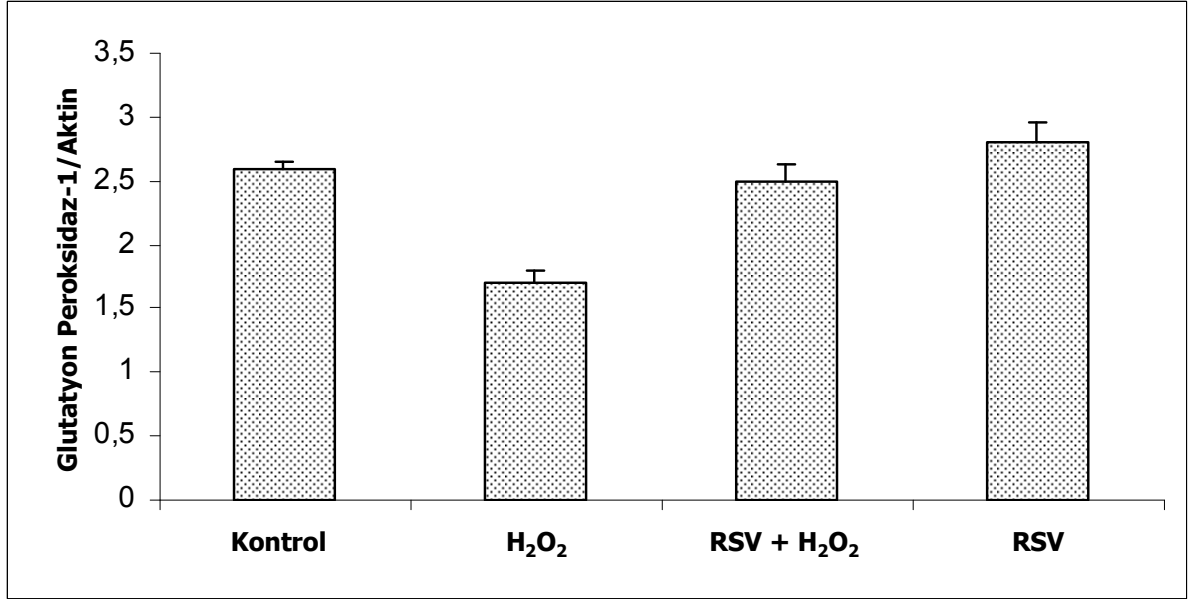
Şekil 46. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) γ -glutamil sistein sentetaz Western Blot spotlarının dansitometrik analizi. Bulgular γ - glutamil sistein sentetaz enziminin dansitometrik ölçümünün β -aktine oranı şeklinde verilmiştir.

Tablo 22. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) γ -glutamil sistein sentetaz'ın dansitometrik bulgularının istatistiksel analiz sonuçları. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Gruplar	p değerleri
Kontrol - H_2O_2	0.049
H_2O_2 - RSV+ H_2O_2	0.049
Kontrol-RSV	0.049



Şekil 47. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) glutatyon peroksidaz-1 ekspresyonunun temsili Western blot bulguları.



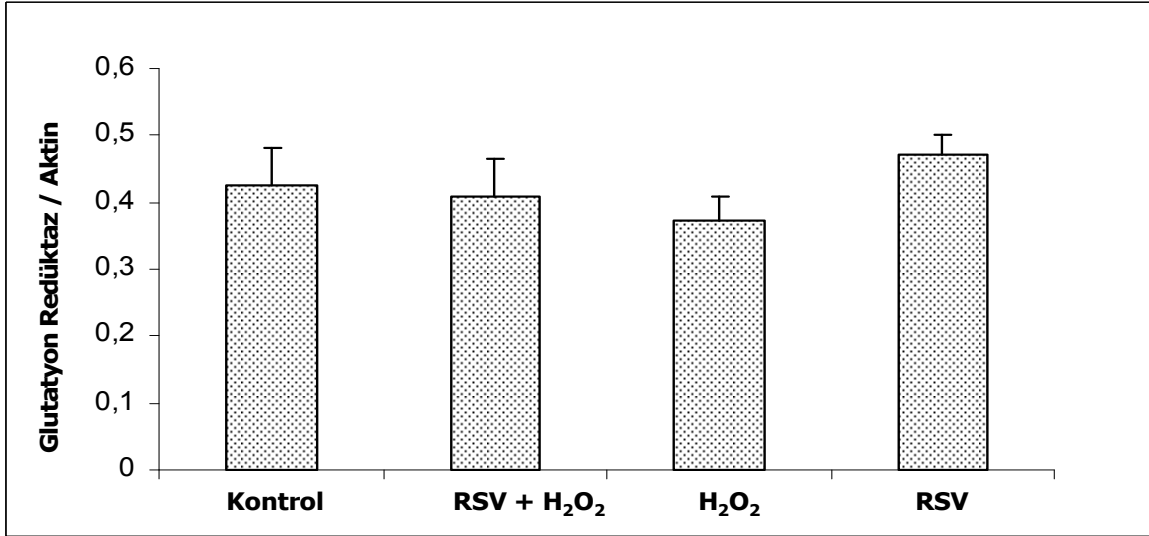
Şekil 48. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) glutatyon peroksidaz-1 Western Blot spotlarının dansitometrik analizi. Bulgular glutatyon peroksidaz enziminin dansitometrik ölçümünün β -aktine oranı şeklinde verilmiştir.

Tablo 23. Kontrol grubu (H_2O_2 ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H_2O_2 , RSV+ H_2O_2 ve RSV) glutatyon peroksidaz-1'in dansitometrik bulgularının istatistiksel analiz sonuçları. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Gruplar	p değerleri
Kontrol - H_2O_2	0.049
H_2O_2 - RSV+ H_2O_2	0.049
Kontrol-RSV	0.049



Şekil 49. Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) glutatyon redüktaz ekspresyonunun temsili Western blot bulguları



Şekil 50. Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) glutatyon redüktaz Western Blot spotlarının dansitometrik analizi. Bulgular glutatyon redüktaz enziminin dansitometrik ölçümünün β-aktine oranı şeklinde verilmiştir.

Tablo 24. Kontrol grubu (H₂O₂ ve resveratrol ile muamele edilmeyen grup) ve deney gruplarında (H₂O₂, RSV+ H₂O₂ ve RSV) glutatyon redüktaz'ın dansitometrik bulgularının istatistiksel analiz sonuçları. p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Gruplar	p değerleri
Kontrol -H ₂ O ₂	0.049
H ₂ O ₂ - RSV+H ₂ O ₂	0.049
Kontrol-RSV	0.049

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA

Süper oksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin endojen üretiminde artış ile karakterize olan oksidatif stres, endotel tabakasının işlev bozukluğunun temel nedenidir. Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet, yaşlanma ve diğer pek çok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları; bu mekanizmaların engellenmesi, onarımı, fiziksel savunma ve antioksidan savunmayı kapsamaktadır. Enzimatik antioksidan savunma süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğerleridir. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında denge bulunmaktadır. Bu denge, organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir. Resveratrol, stilbenlerin alt grubunda bulunan polifenolik bir bileşiktir. Anti-inflamatuvar, antioksidan, sitoprotektif, antikanser ve kardioprotektif etkileri bulunmaktadır (10).

Bu çalışmada insan koroner arter endotel hücreleri seçilmiştir. Çünkü kan damarları içinde önemli anatomik bir yerleşimde bulunan endotel; kan ve vasküler düz kas hücreleri arasında bariyer görevi üstlenmektedir (15, 16). Endotel hücreleri kardiyovasküler sistemin fizyolojik fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemlidir. Kanın pıhtılaşmasında, immun cevapta, metabolik transportta, biyoaktif maddelerin salınmasında vs. görev almaktadır. Vasküler endotel hasarı çeşitli hastalıkların oluşmasında önemlidir. Kardiyovasküler hastalıklara neden olan hipertansiyon, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz, vasküler hasarla sonuçlanan apoptoz ya da nekroza cevap sürecinde meydana gelmektedir. Patolojik durumlarda vasküler endotel hücrelerin yapı ve fonksiyonu değişmektedir. Bu nedenle biyomedikal araştırmalarda endotel tabakasının yeniden yapılanmasını hedef alan farmakolojik girişimler önem kazanmaktadır (61).

Bu çalışmada hidrojen peroksit oksidatif stres modeli oluşturmak amacıyla tercih edilmiştir. Hidrojen peroksit uygulaması, oksidatif stres modeli olarak sıklıkla araştırmalarda kullanılmaktadır (62, 12, 63, 15, 16, 52). Hidrojen peroksitin kültüre hücreler süpernatantında yarı ömrü 10-20 dakikadır ve 2-5 saat içinde tamamen yıkılmaktadır (64). Hidrojen peroksitin seçilmesinin nedeni diğer *in vitro* oksidatif stres modellerinden (hipoksi-reoksijenasyon, tersiyer bütül hidroperoksit) daha iyi standardize edilebilir olmasıdır. Hidrojen peroksit antioksidatif çalışmalarda, başlıca oksidatif stres uyarıcılardan biridir (60). Oksidatif streste santral bir rol oynamakta, hücresel antioksidan fonksiyonuyla ilgili sinyal iletimine katılmaktadır. Hidrojen peroksit, fizyolojik koşullarda stabildir ve konsantrasyonunun kontrol edilmesi hücrenin normal fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemlidir. Hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonları fizyolojik hücresel fonksiyonların sürdürülmesini sağlarken yüksek konsantrasyonları reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olmakta böylece hücre membranları, DNA, protein ve lipidler gibi hücre moleküllerine ve yapılarına zarar vermektedir (12).

Kültürlerde uygulanan H_2O_2 konsantrasyonu önemlidir. Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'te görülen mitojenik etki ve proliferasyon etkisinin tersine, yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 (50 μ M-1 mM) hücre kültüründe hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmelerine neden olmaktadır. Genelde memeli hücrelerinde hücre içi H_2O_2 konsantrasyonu 700 nM'ın altında olduğu sürece H_2O_2 proliferatif etki gösterir. Hücre içi konsantrasyonu 1 μ M üzerinde olduğunda, hücrelerin büyümesi durmakta ya da hücre ölümü gerçekleşmektedir. H_2O_2 'in hücre içi konsantrasyonu ve uygulanan konsantrasyonu arasındaki farklılıklar H_2O_2 'in plazma membranından geçerken kolayca difüze olabilmesine rağmen, kültürle uygulandığında plazma membranında bir gradient oluşmasına bağlanabilir. Bu gradient H_2O_2 'i yakalayan enzimlerin (katalaz, glutatyon peroksidaz gibi) sonucudur ve hücre içi kararlı konsantrasyonunun, hücre dışı uygulanan konsantrasyonundan 7-10 kat daha az olması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle uygulamalarda düşük konsantrasyonda H_2O_2 seçilmesi hücrede proliferasyon sinyali için uygulanmakta, halbuki yüksek (50 μ M- 1mM) konsantrasyonda H_2O_2 hücreler oksidatif stres oluşturmakta kullanılmaktadır (13). Bu nedenlerle, bu çalışmada hücrelerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla insan koroner arter endotel hücre kültüründe H_2O_2 'in 100, 250, 500, 750 ve 1000 μ M gibi yüksek konsantrasyonları uygulanmıştır.

Hücrelerden boyanın atılması ve hücrelere alınmasına, hücrelerden salınan enzim aktivitelerinin ölçümüne ve hücrelerde kolorimetrik 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid'in (MTT) indirgenmesi esasına dayalı testler olmak üzere hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesinde birkaç değişik yöntem kullanılmaktadır. Tripan mavisi ve floresans boyaları (propidyum iyodid gibi) fonksiyonel hücre membranı olan canlı hücrelerden dışarı atılmakta, membran hasarlı olduğunda boya penetre olmaktadır. Memeli hücrelerinde temel olarak eksprese edilen ve hasarlı hücrelerden salınan giseraldehit-3- fosfat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz gibi enzim aktivitelerinin ölçümü hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. MTT testi ise, MTT'nin hücrelere endositoz yoluyla girmesine ve canlı hücrelerdeki mitokondride MTT'nin formazana indirgenmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada hücre hasarı, hücre kültür ortamına LDH salınımının ölçülmesi ile değerlendirildi (65). Çalışmada kullanılan LDH "Cytotoxicity Detection Kit" (Roche Diagnostics GmbH)'inde önerilen optimum hücre sayısı ve önceki çalışmalarda insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) optimize hücre sayısından yola çıkılarak 96 kuyucuklu plaklara 200 µl/10000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Bu hücre sayısı, spontan LDH salınımı/ maksimum LDH salınımı oranının en düşük olduğu değeri ifade etmektedir. Nekrotik hücre ölümü için uyguladığımız H₂O₂ konsantrasyonu ve zaman noktalarını literatürdeki çalışmalara göre belirledik ve kendi laboratuvarımızdaki hücrelerimize göre optimize ettik. Çalışmada, oksidatif stres modeli olarak hidrojen peroksitin 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM konsantrasyonlarını kullandık. H₂O₂'in tüm konsantrasyon ve sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksite artışı saptadık (p<0.05). İnsan koroner arter endotel hücre kültüründe optimum hücre hasarını 750 µM ve 1 saat hidrojen peroksit koşullarında elde ettik. Optimum hücre hasarını, "maksimal olmayan" ancak ölçülebilir düzeylerde (% 40 civarında) seyreden bir hasar olarak tanımladık. Resveratrolün olası koruyuculuğunu test ettiğimiz deneylerde, hasar oluşturmak amacıyla 750 µM ve 1 saat hidrojen peroksit koşullarını kullandık.

Literatür incelendiğinde değişik hücre tiplerinde farklı hidrojen peroksit konsantrasyonu ve inkübasyon süresi uygulayan araştırmacılar bulunmaktadır. Wang ve arkadaşları (15, 16) 750 µM hidrojen peroksit konsantrasyonu ve 18 saat inkübasyon süresinde (% 100 hücre hasarı) *in vitro* insan umbilikal ven endotel hücrelerinde doğal bir antioksidan olan icariin ve silibin flavonoidlerinin etkilerini LDH salınımı ile değerlendirmişlerdir. Cortese ve ark. (62) *in vitro* rat aort endotel hücrelerinde 1mM ve 24 saat inkübasyon süresinde hidrojen peroksit uygulayarak (% 50 civarında hücre canlılığı)

Çinko desteğinin oksidatif hasar üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Shimisu ve ark. (53) sığır toraks aort endotel hücrelerinde N^G-nitro-L-arginin analoglarının, H₂O₂'in indüklediği hücre hasarına etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, % 40-50 arasında hasar oluşturdukları 500 μM H₂O₂ konsantrasyonu ve 3 saatlik inkübasyon süresini kullanmışlardır.

Resveratrol iki farklı hücre koruyucu mekanizma ile antioksidan etkisini göstermektedir: Resveratrol, direkt olarak serbest radikal (hidroksil radikali, süperoksit anyonu radikali) yakalayıcı özelliğe sahiptir. Resveratrolün hidroksil fenolik gruplarının denge durumu ve elektronların delokalizasyonuna bağlı olarak kimyasal yapısından kaynaklanan bir antioksidan kapasitesi bulunmaktadır (66). Resveratrol diğer antioksidan etkisini hücre koruyucu ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak göstermektedir (6, 66). Lopez ve ark. (66) doğal antioksidan olarak şarapta bulunan gallic acid, trans-resveratrol, quercetin ve pentahidroksiflavon- 3-rutinozid fenolik bileşiklerinde total fenol miktarını (spektrofotometrik, fluorometrik ve kromatografik) ve total antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ve fenol yapıları arasındaki ilişki incelendiğinde, fenolik asitlerin hidroksil ve metil grupları arttıkça aktivitenin iyileştiğini bildirmişlerdir. Trans-resveratrolün antioksidan aktivitesi için kriter: (1) kateşol yapısının ya da B halkasında 4' hidroksil bulunması (2) A halkasında meta-hidroksi yapısının bulunmasıdır. Polifenoller serbest radikal yakalayıcı aktiviteleri için ideal bir kimyasal yapıya sahiptirler (66, 67, 68).

Çalışmada amacımız resveratrolün hücre içi antioksidanlar üzerindeki etkilerini araştırmak olduğundan resveratrol ile inkübasyon süresi bitiminde hücre kültür ortamını tamamen uzaklaştırarak 750 μM,1 saat hidrojen peroksit hasar modelini uyguladık. Böylece resveratrolün direkt radikal yakalayıcı etkisini ekarte etmiş olduk. Ungvari ve ark. (56) resveratrolün direkt serbest radikal yakalayıcı etkisini, resveratrolün 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarının hidrojen peroksitin neden olduğu floresans artışıni engellediğini göstermişlerdir.

Resveratrolün endotel hücrelerinde biyoyoyarlanımı ve metabolizmasına ilişkin bir araştırma mevcut değildir. Çalışmamızda resveratrolün stok 5 mM konsantrasyonundan 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonları optimem ile hazırlandı. Optimem renksiz ve fetal sığır serum yüzdesi düşük olduğundan, LDH solusyonunu interfere etmeyen bir ortamdır. Diğer bir avantajı ise albumin yüzdesi düşük olduğundan, resveratrolün albumine bağlanarak hücre içine girişini azaltılmamasıdır. Resveratrolün plazma proteinlerine bağlanma hızı ve miktarının sadece hücre kültür ortamı ile değerlendirildiği bir çalışmada; 5 μM resveratrolün % 10 serum içeren kültür ortamı ile inkübe edildikten sonra, bağlanmayan resveratrol etil asetat ile

ekstrakte edilmiş ve HPLC'de analizi yapılmıştır. Sonuçta bağlanmamış resveratrolün 2 saat içinde % 50 azaldığı ve 24 saatte 0'a doğru yaklaştığı görülmüştür. Böylece tüm inkübe edilen resveratrolün 24 saat sonra proteinlere bağlandığı gözlemlenmiştir (42).

Günümüzde, *in vitro* ve hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar resveratrolün insan sağlığı yönünden bir çok yararlı etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu bulguların klinikte uygulanabilmesi için insanda biyoyararlanımı ve farmakokinetik çalışmalarına daha sonra da klinik deneylere gerek duyulmaktadır. Sınırlı sayıda kişilerde yapılan çalışmada resveratrol ağızdan alındıktan sonra rodentlerde olduğu gibi sülfat ve glukuronat konjugatlarına dönüştüğü gösterilmiştir. Sülfat ve glukuronat konjugatların hedef dokularda resveratrole dönüştüğü ya da bu konjugatların bizzat aktif molekül olduğu ileri sürülmektedir. Aktif molekül ister resveratrol ister konjugatları olsun, resveratrol faz 1 ve faz 2 klinik deneylerde, kolon kanserli hastalarda kullanılmaya başlanmıştır (69).

Çalışmamızda, önce resveratrolün normal hücrelere olası etkilerini incelemek amacıyla bir dizi deney gerçekleştirildi. Çalışmamızda 10 ve 50 μM resveratrol ile 1, 12 ve 24 saat inkübasyonlarda kontrole benzer değerler saptadık ($p < 0.05$). Buna karşın 100 μM resveratrol, 1, 12 ve 24 saat inkübasyonda % 15 LDH salınımına neden olmaktadır. Kontrolla karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Resveratrol ile (25, 50 ve 75 μM) primer rat hepatositlerinin inkübasyonunda, 75 μM resveratrol (25 saat inkübasyon) % 5 LDH salınımına neden olmaktadır (70). Çalışmalar arasındaki farklılık resveratrolün konsantrasyonundan ve hücre tiplerinden kaynaklanabilmektedir.

Resveratrolle ilgili çalışmamızın hasar modeli üzerine etkilerinin incelendiği ikinci bölümünde 1, 12 ve 24 saat preinkübe edilen 10 ve 50 μM resveratrolün *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde oksidatif stresin indüklediği hücre sitotoksitesini istatistiksel olarak anlamlı azalttığını ($p < 0.05$) saptadık. Resveratrolün 100 μM konsantrasyonunda ise tüm inkübasyon sürelerinde hücre sitotoksitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptayamadık ($p > 0.05$). Bulgularımız 10, 50 ve 100 μM resveratrol ile 24 saat preinkübe edildikten sonra 750 μM H_2O_2 ile 1 saat inkübe edilen HCAE hücrelerinin morfolojik görünüşleri ile de örtüşmektedir (Şekil 6). Rubiolo ve ark. (70) resveratrol ile inkübasyon sonrasında, tersiyer butil hidroperoksit ile oksidatif stres oluşturdukları primer rat hepatositlerinde resveratrolün 24 saate kadar hücre ölümünü azalttığı, 48 saat sonra bu etkilerinin görülmediğini saptamışlardır. Resveratrol direkt antioksidan etkisini tersiyer butil hidroperoksit ile reaksiyona girerek göstermekte, sonrasında geri kalan tersiyer butil hidroperoksit hücrelere zarar vermekte ve 48. saatte görülen nekrozu indüklemektedir.

Resveratrol primer rat hepatositlerinde 24. saate kadar Nrf2 gibi transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir. 48. saatte bu transkripsiyon faktörünün azalması sonucu 75 μ M resveratrol sitotoksik etki meydana getirmektedir. Normalde nükleer transkripsiyon faktör eritroid 2p45 (NF-E2)-ilgili faktör 2 (Nrf2), represör proteini Keap-1 (Kelch-like ECH associated protein 1) ile inaktif kompleks halinde sitoplazmada bulunur. Oksidatif stres ve elektrofilik bileşikler, Nrf2/Keap 1 üzerinde tiyol gruplarını okside ederek konformasyonel değişime neden olmaktadır. Böylece Nrf2 /Keap 1'den ayrılır, nükleusa transloke olur ve antioksidan genlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır. Rubiolo ve ark. (70) 75 μ M resveratrolün hücrelere sitotoksik olduğu fakat oksidatif stresi indükleyici ajanla birlikte bu konsantrasyonda kullanıldığında, yalnız oksidatif stres indükleyen ajanla görülen nekrozdan daha az nekrozla sonuçlandığını göstermişlerdir. Çalışmamızda 100 μ M resveratrolün tüm inkübasyon sürelerinde herhangi bir koruyucu etkisini saptayamadık. Bu farklılıklar hücrelerden, resveratrol konsantrasyonundan ve oksidatif stres modelinden kaynaklanıyor olabilmektedir.

Literatürde resveratrolün değişik konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri kullanılarak koruyucu etkileri araştırılmıştır. H9c2 kalp kas hücrelerinde resveratrolün (50 μ M, 30 dakika inkübasyon) hidrojen peroksitin (500 μ M; 6, 12, 24 ve 48 saat) indüklediği hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (71). Brito ve ark. (48) sığır aort endotel hücrelerinde resveratrolün 50 μ M konsantrasyonunun ve 14 saat inkübasyon süresinin koruyucu olarak göstermişlerdir. Vieira de Almeida ve ark. (51) resveratrolün 50 μ M konsantrasyonu ve 30 dakika inkübasyon süresinde primer korteks astrosit hücrelerinde koruyucu etkilerini göstermişlerdir.

Çalışmamızda 24 saatten uzun inkübasyon süresinde resveratrolün koruyucu etkisinin rapor edilmediği dikkate alınarak maksimum inkübasyon süresini 24 saat olarak belirledik.

Hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri biyolojik moleküllere zarar vermekte ve apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır (72). Apoptoz; piknoziz, nükleer fragmentasyon, apoptotik cisimciklerin oluşması ile karakterizedir. ATP bağımlıdır; plazma membran bütünlüğü bozulmaz; DNA düzenli şekilde yıkılır. Fagositler tarafından apoptotik hücrelerin içine alınmasını kolaylaştırmak amacıyla fosfotidil serin gibi moleküller plazma membranının üzerinde açığa çıkar. İmmun cevabı baskılamak için lizofosfotidil kolin gibi moleküller salınır. Nekrozda ise düzenli olmayan ölüm şekli söz konusudur. Hücre organelleri şişer, plazma membranın bütünlüğü kaybolur. Bu olaylar sonunda hücrede ATP üretimi bozulur. Programlanmış ve aktif hücre ölümü olan apoptozun tersine, nekrozda kontrol edilmemiş ya da patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Nekrotik hücre ölümünün ısı, soğuk, mekanik kuvvet gibi fizyolojik olmayan

koşullarda meydana gelmesi nekrozun programlanmamış hücre ölümü görüşünü desteklemektedir. Aerob bir çevrede hücreler devamlı olarak ROS oluşturlar. ROS'un artması oksidatif strese neden olur, hücre içi moleküllere ve organellere zarar verir ve nekrozla sonuçlanır. ROS'un ana kaynağı mitokondridir ve nekrozu başlatabilir. Mitokondrial ROS'un artması DNA'ya zarar verebilir (DNA ipliklerini ayırır, DNA-protein çapraz bağlanması ve pürinlerin oksidasyonuna neden olabilir). ROS lipidleri de modifiye eder. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar ROS'un hedefidir. Lipid oksidasyonu hem plazma membranının hem de hücre içi membranların (lizozom, endoplazmik retikulum gibi) bütünlüğünün kaybına ve bu da proteazların hücre içine sızmasına ya da Ca^{+2} nun girişine neden olmaktadır. ROS'un diğer bir hedefi sülfidril bağlı proteinler ya da sülfür içeren aminoasit kalıntılarıdır. ROS disülfid bağlarına atak yapabilir ya da sülfidril bağlantılarını yıkabilir; böylece proteinlerin fonksiyonu değişmektedir. ROS'un aracılık ettiği protein modifikasyonları Ca^{+2} kanallarında değişiklik yaparak nekroza neden olabilmektedir. Hem endoplazmik retikulum hem de plazma membranı Ca^{+2} kanalları ROS'la etkilenmekte, Ca^{+2} akışı sonucunda nekroz tetiklenmektedir (73).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçümünde elektron spin rezonans, kemilüminesans ve floresans ölçümleri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Floresans ölçümü, duyarlılığı ve deneysel uygunluğu açısından bütün yöntemlerin üstünde gelmektedir. Floresans prob olarak aminofenil floresin [3'- (*p*-aminophenyl) fluorescein (APF)], hidroksifenil floresin [3'- (*p*-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)], diklorofloresin diasetat (dichloro fluorescein diacetate, H_2DCFDA) ve dihidrorodamin [dihydrorhodamine 123] kullanılmaktadır. APF ve HPF floresans probu rutinde en sık kullanılan diklorofloresin diasetat probundan daha fazla spesifik ve stabildir. H_2DCFDA hücre içi ROS'un ölçümünde yaygın olarak kullanılmakla birlikte nonspesifiktir ve kendiliğinden okside olmaktadır. Floresans olmayan H_2DCFDA 'nin ROS skalası geniştir; peroksil, hidroksil, peroksinitrit anyonu vs. APF ve HPF floresans problemleri nitrik oksitten hidroksil radikalini ayırt edebilmektedir. APF ve HPF problemlerinin reaksiyonu daha sınırlıdır ve ışığa maruz kaldığında otooksidasyona daha dirençlidir. Her iki prob; hidroksil radikali, hipoklorit ya da peroksinitrit radikali ile reaksiyona girinceye kadar floresans özellik göstermemekte, oksidasyon sonucu hem HPF hem de APF parlak yeşil floresans vermektedir (Eksitasyon/Emisyon, 490/515) (57, 74).

Laboratuvarımızda insan umbilikal ven endotel hücrelerinde yaptığımız deneylerde HPF probunun APF probuna göre daha stabil olduğunu tespit ettik. Bu nedenle HCAE hücre kültürü çalışmalarında hidroksifenilfloresin fluoresans probu ile reaktif oksijen türleri oluşumunu değerlendirdik.

ROS ölçümüne hazırlık olarak, insan koroner arter endotel hücreleri H_2O_2 ile 20 dakika inkübe edildi ve sonrasında da PBS tampon ile yıkama yapıldı. Yıkama yapmamızda amacımız: H_2O_2 'i hücre kültür ortamından uzaklaştırarak HPF probun sadece hücre içi oluşan reaktif oksijen türleri oluşumunu ölçmesini sağlamak idi. Bir çalışmada insan dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde H_2O_2 'in değişik süre (15, 30 dak, 1, 4 ve 24 saat) ve konsantrasyonlarında (100, 200, 400 ve 800 μM) hücre içi ROS oluşumu diklorofenil diasetat probu değerlendirilmiştir. İnsan dermal mikrovasküler endotel hücrelerini H_2O_2 ile 20 dakika inkübe ettiklerinde zamana ve H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak ROS oluşumunda bir artış gözlemlenmiştir; uzun inkübasyon süresinde ise zamana ve konsantrasyona bağlı ROS oluşumunda bir artış saptamamışlardır (74). Bu nedenle çalışmamızda insan koroner arter endotel hücreleri H_2O_2 ile 20 dakika inkübe edildi.

100, 250, 500, 750 ve 1000 μM H_2O_2 konsantrasyonları ile muamele edilen insan koroner arter endotel hücrelerinde 15. dakika, 60. dakika ve 6. saat zaman noktalarında ortalama fluoresans şiddeti değerleri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermektedir. Farklı sürelerde kontrol grubu ile H_2O_2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). 10, 50 ve 100 μM resveratrol ile 24 saat preinkübasyona bırakılan HCAE hücreleri 750 μM H_2O_2 ile muamele edildiğinde 15., 60. dakika ve 6 saat zaman noktalarında resveratrolün tüm konsantrasyonlarının ROS oluşumunu anlamlı olarak azalttığı saptandı ($p < 0.05$). Bu durum bize resveratrolün ROS'u yakalama kapasitesinin hücre sitotoksitesini azaltması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Değişik hücre tiplerinde ve değişik hasar modelinde resveratrolün ROS oluşumunu azaltıcı etkileri gösterilmektedir. Rubiolo ve ark. (70) tersiyer-bütil hidroperoksit ile primer rat hepatositlerde oluşturdukları oksidatif stres modelinde 50 μM resveratrolün, fluoresans şiddetinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Rat aort düz kas hücrelerinde 100 μM resveratrol ile 72 saat preinkübe edildikten sonra ksantin oksidaz ile oluşturulan oksidatif streste, resveratrolün hücre içi ROS oluşumunu azalttığı göstermiştir (7). Vieira de Almeida ve ark. (51) 50 μM resveratrolün, primer korteks astrosit hücrelerini hidrojen peroksitin (100 μM H_2O_2 ; 30 dak) indüklediği oksidatif stresten hücre içi ROS oluşumunu azaltarak koruduğunu göstermişlerdir. İnsan akciğer epitelyum hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 10 μM resveratrol (24 saat inkübasyon)

sigara ekstraktına karşı ROS oluşumunu azaltmaktadır (75). Bu çalışmalarda resveratrolün ROS oluşumu azaltması yönündeki sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla örtüşmektedir. Bu sonuçlar resveratrolün ROS oluşumunu azaltıcı etkisinin serbest radikal yakalama yeteneği ile olabileceğini göstermektedir. Resveratrol gibi polifenolik bileşiklerin 4' ve 5 pozisyonlarındaki hidroksil grupları serbest radikal yakalayıcı potansiyele sahiptir. Bu nedenle, çalışmamızda da hidrojen peroksidin indüklediği oksidatif strese oluşan serbest radikaller ile resveratrolün direkt etkileşime girmesi muhtemeldir. Çalışmamızda resveratrolün ROS oluşumunu azaltıcı yönünde elde ettiğimiz bulgu, resveratrolün süper oksit ve hidroksil gibi serbest radikalleri yakalama ve antioksidan özelliğinin olmasına ilişkin özelliği ile uyusmaktadır. Resveratrolün hücre sitotoksitesini azaltması serbest radikal yakalayıcı özelliğinin yanı sıra antioksidan kapasitesi ile de ilgili olabilir.

Bu düşünceden yola çıkarak antioksidan kapasiteyi glutatyon ile ve glutatyon döngüsünde yer alan enzimlerle değerlendirdik. Çalışmamızda antioksidan glutatyonun analizi HPLC'yi takiben floresan detektör kullanılarak yapılmıştır. Biyolojik örneklerde glutatyonun analizinde çeşitli teknikler kullanılmaktadır. İlk zamanlarda kullanılan enzimatik, fluorometrik ve kolorimetrik tekniklerin tekrarlanabilirliği düşük ve deteksiyon sınırları yetersizdi. Bu metodta 5,5-ditiyobenzoik asit (DNTB, Ellman's reagent) ya da 2,4- dinitrofluorobenzen ile derivatize edildikten sonra UV absorbans ile değerlendirme ya da monobromobimane ortho-phthalaldehyde (OPA) 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride (dansyl chloride), ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3- diazole-4-sulfonate (SBD-F) ya da N-(1-pyrenyl)maleimide (NPM) ile derivatize edilerek floresans ölçüm kullanılmaktadır. Günümüzde HPLC'de OPA ile GSH'nin türevlendirilmesi temel alınmıştır. OPA fazla miktarda floresans ürünler oluşturmak üzere GSH'nin amino ve sülfidril grupları ile reaksiyona girmektedir. Bu metodta total glutatyon ve indirgenmiş glutatyon ölçümü yapılmakta, türevlendirme basamağından önce ditiyotreitöl (DTT) ile yükseltgenmiş glutatyonun disülfid grupları indirgenerek uygulanmaktadır. Bu yöntem hızlı, uygulanabilirliği kolay ve spesifitesi yüksektir (25).

Projemizde γ -glutamat sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonları Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ribozimler dışında bilinen bütün enzimler kimyasal olarak proteindir. Proteinin tanımlanmasında elektroforetik, kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Elektroforetik yöntem olan Western blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi, ilgili proteinlerin görünür hale getirilmesi olarak üç aşamada gerçekleştirilmektedir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayrımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Proteinler küçük molekül ağırlıklı bir tiyol (2-merkaptoetanol ya da DTT) ve SDS'in varlığında ısıtılarak denatüre edilir. Proteinlerin çoğu SDS'e sabit ağırlık oranında bağlanır ve bu nedenle denatüre proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olurlar. Böylece SDS-protein kompleksleri poliakriamid jelinde yüklerine göre değil büyüklüklerine göre hareket ederler. Western blot yönteminde enzim değerlendirilmesinin dezavantajı, denatürasyon aşamasında enzimler denatüre olduğundan enzim aktivitesinin gösterilmemesidir. Zahmetli ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajı protein ekspresyonunun saptanmasıdır (60). Literatür incelendiğinde γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin Western blot yöntemi ile değerlendirildiği çalışmalar çok az sayıdadır (76, 77). İnsan koroner arter endotel hücrelerinde bu enzimlerin Western blot yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışma ise bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda literatüre yenilik katacağı düşüncesiyle γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri Western blot yöntemi ile değerlendirildi.

Çalışmamızda; 24 saat 50 μ M resveratrol ile inkübe edildikten sonra 750 μ M, 1 saat H_2O_2 uygulanan HCAE hücrelerinde γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri değerlendirildi. Kontrol grubuna göre H_2O_2 grubunda indirgenmiş glutatyon düzeyi anlamlı olarak azalmakta ($p<0.05$), resveratrol H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında indirgenmiş glutatyon düzeyini anlamlı olarak arttırmaktadır ($p<0.05$). Sadece resveratrol uygulamasının kontrol grubuna göre indirgenmiş glutatyon düzeyini anlamlı olarak arttırdığı saptandı ($p<0.05$). H_2O_2 grubunda kontrol grubuna göre yükseltgenmiş glutatyon düzeyi anlamlı olarak artmaktadır ($p<0.05$); resveratrol H_2O_2 grubu ile karşılaştırıldığında yükseltgenmiş glutatyon düzeyini anlamlı olarak azaltmamaktadır ($p>0.05$). Sadece resveratrol uygulaması da kontrol grubuna göre yükseltgenmiş glutatyon düzeyini anlamlı olarak azaltmamaktadır ($p>0.05$). γ -Glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarının H_2O_2 uygulaması ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptandı ($p<0.05$). Resveratrol, γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı arttırdı ($p<0.05$). Sadece resveratrol ile muamele edilen grupta da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$).

Glutasyon hücresel antioksidan savunmada görev alan başlıca protein olmayan tiyol (sülfidril) bileşiğidir. Glutasyon serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı hücreleri koruyarak hücrenin redoks durumunun sürdürülmesini sağlar (8). Normal şartlarda hücrede indirgenmiş glutasyon düzeyi iki mekanizma ile düzenlenmektedir: sentez oranı ve hücre dışına eksportu ile. GSH düzeyi hücrenin tiyol denge durumunun değişmesinden ya da çeşitli ajanlardan da etkilenmektedir (28). GSH tüm hücre tiplerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur (çekirdek, endoplazmik retikulum mitokondri arasında dağılmıştır). Glutasyon ya proton vericisi ya da nükleofilik konjugatların kofaktörü olarak antioksidan yollara katkıda bulunan güçlü bir indirgeyici ajandır. Elektronca zengin olan GSH, bir antioksidan olarak, elektron donörü ve serbest radikal indirgeyici formu, okside glutatona (GSSG) dönüşmektedir. GSH reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerini kapsayan reaktif ürünleri yakalayıcısıdır. Bu yolda GSH elektron vererek direkt süperoksit anyonu, hidroksil radikali, peroksinitrit ve singlet oksijeni etkisizleştirmektedir. Glutasyon, enzimlerin kofaktörü olarak hidroperoksit, peroksinitrit ve lipid peroksitleri glutasyon peroksidazlar, peroksiredoksinlerin yer aldığı katalitik reaksiyonlarla da detoksifiye etmektedir (24).

Çalışmamızın, oksidatif stres ile antioksidan dengesinin önemli bir komponentleri olan indirgenmiş glutasyon ile yükseltgenmiş glutasyon bulguları karşılaştırıldığında, H_2O_2 ile muamelede, indirgenmiş glutasyon düzeyindeki azalmaya karşılık gelecek bir artış yükseltgenmiş glutasyonda gözlenmemektedir ($p>0.05$). Bu durum oksidatif stres ile indirgenmiş glutasyonun, yükseltgenmiş glutasyondan çok, glutasyon konjugatlarına dönüşmüş olma ihtimali ile açıklanabilir. Çalışmamızda hidrojen peroksitle oluşturduğumuz hasar modelinde hücre içi glutasyon düzeyinde azalma saptadık. Bu durum GSH'ın hücre dışına çıkmasından, glutasyon-S-konjugatları oluşturmamasından ya da GSH'ın GSSG'ye okside olmasından kaynaklanabilmektedir. GSSG daha sonra NADPH bağımlı glutasyon redüktaz ile GSH'a indirgenmektedir. Sadece resveratrol uyguladığımız grupta ve resveratrol'le preinkübe ettikten sonra hidrojen peroksit hasar uyguladığımız grupta hücre içi GSH düzeyinde anlamlı artış gözlemledik. Resveratrol, hücre içi GSH havuzunda artışı uyarmaktadır Bu durum, resveratrolün direkt hücre içi etkisine bağlıdır. Çünkü hücreler hidrojen peroksitle muamele edilmeden önce resveratrol ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Çalışmamızda resveratrol ile preinkübasyonda γ -glutamil sistein sentetaz ve glutasyon redüktaz protein ekspresyonlarında artış saptadık. Bu durum resveratrolün aracılık ettiği GSH düzeyindeki artışı γ -GCS ve glutasyon redüktaz indüksiyonu ile yaptığını düşündürmektedir.

Literatürde resveratrolün *in vitro* değişik hücre tiplerinde koruyucu etkisi glutatyon düzeyi ve glutatyon döngüsünde yer alan enzimlerin mRNA ekspresyonu ve/veya enzim aktiviteleri ile gösterilmektedir. Sıçan aort düz kas hücrelerinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24, 48 ve 72 saat preinkübasyonunda GSH düzeyini indüklediği; glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz-1 aktivitelerini arttırdığı gösterilmiş ve sonuçta resveratrolün kardiyoprotektif etkilerine katkısı olabileceği düşünülmüştür (7). Sıçan kardiyomyosit hücrelerinde resveratrolün antioksidan enzimleri (glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-S-transferaz ve NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz) indüklediği ve oksidatif strese direnci arttırdığı bulunmuştur (6). Ungvari Z ve ark. (56) sıçan aort segmentinde yaptıkları çalışmada resveratrolün konsantrasyona bağlı olarak GPx-1 ve katalaz ekspresyonunu arttırdığını ve kaspaz aktivitesini azalttığını göstermişlerdir. Bu bulguları ile resveratrolün antienflamatuvar etkileri ile birlikte, antiapoptotik ve antioksidan etkilerinin kardiyoprotektif etkilerinden sorumlu olabileceğini ileri sürmektedirler. Rubiolo ve ark. (78) resveratrolün preinkübasyonunda (25, 50 ve 75 µM; 6, 24 ve 48 saat) süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz, NADPH:kinon oksidoredüktaz 1 aktivitelerini arttırarak primer sıçan hepatositleri oksidatif stresten koruduğunu saptamışlardır. Kontrol hücreleri ile karşılaştırdıklarında resveratrol (50 µM; 6, 24 ve 48 saat) ile muamele ettikleri hücrelerde Nrf2 transkripsiyon faktöründe bir artış gözlemlenmiştir. Nrf2 protein ekspresyonu ve mRNA'sındaki artışın, resveratrol ile preinkübasyondan sonra antioksidan ve faz II enzimlerinde gözlenen daha yüksek enzim aktiviteleri ile uyumunu saptamışlardır. PC12 hücrelerinde resveratrolün (15 µM, 6 saat) hidrojen peroksidin indüklediği toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Resveratrol (15 µM, 6 saat) antioksidan etkisini hem oksijenaz-1 ve γ-glutamat sistein sentetaz ağır zincir mRNA ekspresyonundaki artış ile göstermektedir. Resveratrol ile γ-glutamat sistein sentetaz ağır zincir mRNA ekspresyonu zamana bağlı olarak (3, 6, 12 ve 24 saat) artmaktadır (79). Brito ve ark. (8) siğir aort endotel hücrelerinde 50 µM resveratrolün (14 saat inkübasyon) kalp koruyucu etkilerini klasik antioksidan etkisinin ötesinde, hücrenin redoks durumu üzerine düzenleyici görev alarak (hücre içi GSH seviyelerini attırarak peroksinitriti indirgeme şeklindeki mekanizma ile) gerçekleştirdiğini ortaya koymuşlardır. Primer korteks astrosit hücrelerinde resveratrol (50 µM, 30 dakika) hidrojen peroksit (100 µM H₂O₂; 30 dakika) ile oluşan total glutatyon düşüşünü geri döndürmektedir (51). Kode ve ark. (75) insan akciğer epitelium hücrelerinin sigara tütün ekstraktı ile muamele edildiğinde GSH düzeyinin ve γ-GGS

aktivitesinin azaldığını, 10 µM resveratrolün görülen bu etkileri ters çevirdiğini göstermişlerdir. Sigara tütün ekstraktı ile akciğer epitelyum hücrelerinin muamelesinde γ-GGS ağır altbirimi mRNA ekspresyonunun azaldığı, resveratrolün (10 µM, 24 saat) bu etkileri anlamlı olarak ters çevirdiği ve sadece resveratrol uygulamasının da γ-GGS ağır altbiriminin mRNA ekspresyonunun indüklediğini göstermişlerdir. Resveratrol γ-GGS ağır altbiriminin mRNA ekspresyonunu indükleyerek sigara tütün ekstraktının azalttığı glutasyon düzeyini restore etmektedir. Bu bulgular bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle örtüşmektedir.

Çalışmamızda, hidrojen peroksit uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre γ-glutamil sistein sentetaz, glutasyon peroksidaz-1 ve glutasyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarında anlamlı bir azalma saptadık ($p<0.05$). Oysa ki hidrojen peroksitle oksidatif stres oluşturduğumuz grupta, bir oksidan olarak hidrojen peroksinin γ-glutamil sistein sentetaz, glutasyon peroksidaz-1 ve glutasyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonunu arttırmasını beklemekteydik. Oksidatif stres ve elektrofili bileşikler, Nrf2/Keap 1 üzerinde tiyol gruplarını okside ederek konformasyonel değişime neden olmaktadır. Böylece Nrf2/Keap 1'den ayrılır, nükleusa transloke olur ve antioksidan genlerin transkripsiyonunu arttırır. Çalışmamızda hidrojen peroksit oksidatif stres modeli γ-glutamil sistein sentetaz, glutasyon peroksidaz-1 ve glutasyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonunu indükleyemedi. Bu durum, Kode ve ark.'nın (75) çalışmalarında sigara tütün ekstraktının γ-GGS mRNA ekspresyonunu indükleyemediği durumda yapılan açıklamaya benzer bir açıklama ile anlaşılabilir:

Araştırmacılar göre; sigara tütün ekstraktı nükleer transkripsiyon faktör eritroid 2p45 (NF-E2)-ilgili faktör 2 (Nrf2) ve represör proteini Keap-1 (Kelch-like ECH associated protein 1)'in postranslasyonel modifikasyonlarına neden olarak Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu önlemekte ve dolayısıyla Nrf2'nin proteozomlar tarafından hızla yıkılmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada da kuvvetli oksidatif özelliği barındıran hidrojen peroksit, Nrf2'nin postranslasyonel modifikasyonlar ile (özellikle sülfidril gruplarının modifikasyonlarının sonucu Nrf2-Keap1 kompleksinin ayrılmasını inhibe ederek) nükleusa translokasyonunu önlemiş ve proteozomlar tarafından hızla yıkılmasına neden olmuş olabilir. Hidrojen peroksit hasarında antioksidan enzimlerin protein ekspresyonlarının artmamış olması bu şekilde açıklanabilir. Bu olası ilişki, daha ileri çalışmalarla aydınlatılabilir.

Literatürde farklı ajanlar uygulanarak endotel hücrelerini koruyucu etkileri glutatyon düzeyi ve glutatyon döngüsünde yer alan enzimlerin aktiviteleri ile değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Hou ve ark. (80) *Ligusticum chuanxiong* ve *Angelica sinensis*'in (Çin tıbbında ateroskleroz da kullanılan ilaç) insan ven endotel hücrelerinde SOD, katalaz ve GPx enzimlerinin aktivitelerini arttırdığını ve ROS oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. İnsan ven endotel hücreleri 12 saat; 300 μM H_2O_2 ile muamele edildiğinde hücre canlılığında azalma, LDH aktivitesinde ve fluoresans şiddetinde artış olduğu saptanmış, sitozan oligosakkaritlerinin, GPx, SOD enzim aktivitelerini, nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS) düzeyini arttırarak, malondialdehid (MDA) düzeyini azaltarak H_2O_2 'in indüklediği oksidatif stresten insan ven endotel hücrelerini koruduğu gösterilmiştir. Bu etkiler hücre içi ROS oluşumunun azalması ile birliktedir (63). Wang ve ark. (16) HUVE hücrelerini (ECV-304), hidrojen peroksit (750 μM , 18 saat) ile inkübe ettiklerinde GPx aktivitesinin azaldığını, silibin antioksidanının nitrik oksit miktarını ve GPx aktivitesini attırarak, LDH ve MDA düzeylerini azaltarak ECV-304 hücrelerini hidrojen peroksitin indüklediği oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermişlerdir. Glutatyon, reaktif oksijen metabolitlerinin ve reaktif elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. 750 μM hidrojen peroksit GPx aktivitesini azalmakta; silibin GPx aktivitesindeki azalmayı inhibe etmektedir. Bu durum endotel hücrelerinde H_2O_2 detoksifikasyonunda GSH döngüsünün önemli olduğunu göstermektedir. Başka bir ajan *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid (STF) flavonoidinin, ECV-304 hücrelerinde SOD, katalaz ve GPx aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Burada STF'nin koruyucu mekanizmasının hidrojen peroksiti yakalama yeteneğindeki artış ile olabileceği ileri sürülmektedir. STF bu hücrelerde malondialdehit miktarını azaltarak ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırarak hidrojen peroksit (1 mM, 1 saat) hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir (52). Kweon ve ark. (81) insan umbilikal ven endotel hücrelerini yalnızca 3-O-caffeoil-1-methylquinic asid (MCGA3) antioksidanı ile inkübe ettiklerinde glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve γ -glutamil sistein sentetaz enzimlerinin mRNA ekspresyonlarının Nrf2 nükleer translokasyonuna bağlı mekanizma ile arttığını ve böylece tersiyer bütül hidroperoksit oksidatif hasarına karşı korunma sağladığını göstermişlerdir. Liu ve ark. (63) HUVE hücrelerinde hidrojen peroksit hasarına karşı siitozan oligosakkaridinin etkisini antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve nitrik oksit sentaz'ın aktiviteleri ile değerlendirdiklerinde; bu enzimlerin aktivitelerinin hidrojen peroksit uyguladıklarında azaldığını; sitozan ile bu etkilerin ters çevrildiğini gözlemlemişlerdir. Hücreler, serbest radikal hasarını önlemek için çeşitli antioksidanlar ile donanımlıdır. ROS oluşumunun neden olduğu hücre hasarını önlemede glutatyon peroksidaz ve süperoksit

dismutaz, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar önemli rol oynamaktadır. GPx, SOD ve endojen antioksidanlar birlikte hücre içi ROS'u elimine edilebilir ve bu da okside olan membran komponentleri için onarım mekanizmalarını sağlamaktadır. Liu ve ark. (63) HUVE hücrelerine hidrojen peroksitle (300 μ M, 12 saat) oksidatif stres uyguladıkları çalışmalarında, SOD ve GPx enzimlerinin aktivitelerinde antioksidan savunma sisteminin bozulmasına işaret eden anlamlı bir azalmayı ve sitozan oligosakkariti ile inkübasyonda ise bu etkilerin ters çevrildiğini gözlemlemişlerdir. Sitozanın koruyucu etkisinin mekanizması hücre içi ROS oluşumunu inhibe etmesi ve endojen antioksidanların aktivitelerini restore etmesi şeklindedir. Cortese ve ark. (62) çinko desteğinin rat aort endotel hücrelerinde GSH düzeyini, γ -glutamat sistein sentetaz ağır zincir transkripsiyonunu ve protein düzeyini arttırdığını ve hidrojen peroksitin indüklediği (1 mM H₂O₂, 24 saat) oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermişlerdir. Yine Cortese ve ark. (64) nitrik oksitin rat aort endotel hücrelerinde hidrojen peroksitle (1 mM H₂O₂, 24 saat) karşı GSH düzeyini ve γ -glutamat sistein sentetaz ağır zincir mRNA ve protein düzeyini arttırarak koruduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada EA.hy926 hücrelerinin genistein flavonoidi ile preinkübasyonunda glutatyon peroksidaz mRNA'sı ve aktivitesinde bir artış saptamışlar; bu artışın Nrf1 transkripsiyon faktörünün sitoplazmik ve nükleer artışı ile birlikte olduğunu göstermişlerdir (54).

Çalışmamızda, 10 ve 50 μ M resveratrol konsantrasyonları arasında 1, 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde sitotoksosite açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$). Resveratrolün 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarının 24 saat preinkübasyonu sonucu elde edilen mikroskopik görüntülerle de en iyi korumanın resveratrolün 50 μ M konsantrasyonda olduğunu saptadık. Mikroskopik bulgular sitotoksosite bulgularımızı büyük ölçüde destekledi. Bu nedenle çalışmamızda, γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonları ve glutatyon düzeyini değerlendirirken HCAE hücreleri 50 μ M resveratrol ile 24 saat preinkübe edildi.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve yıkılımı arasında dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif strese, reaktif oksijen türlerinin enzimatik inaktivasyonu glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimlerle olmaktadır. Memeli hücrelerinde glutatyon ve glutatyon peroksidaz antioksidan savunma sisteminde yer almaktadır (82). Glutatyon peroksidazlar selenosistin içeren proteinlerdir. H₂O₂'i, organik hidroperoksitleri indirgeyerek oksidatif strese karşı korurlar (76). İnsan endotel hücreleri çok fazla miktarda sitoplazmik glutatyon peroksidaz (GPx-1) ve fosfolipid hidroperoksit (GPx-4) eksprese etmektedir.

Sitoplazmada GPx-1 hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri indirgerken, GPx-4 lipid hidroperoksitleri ve kolesterol ester hidroperoksitleri hücre membranında indirgemektedir (83). GPx-1, endoteli de kapsayan bir çok hücrede anahtar antioksidan enzim olarak hücre içinde bulunmaktadır (82). GPx-1; ROS'dan hücreleri korumada önemli rol oynamaktadır. GPx-1 eksikliği hücrelerde oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. GPx-1'in H_2O_2 'nin detoksifiye edilmesi ile ilgili katalaz gibi enzimden, daha yüksek Michaelis-Menten sabitine sahiptir. Endotel hücrelerinde aktive polimorf nükleer lökositlerden oluşan H_2O_2 'in % 70'i GPx-1 ile detoksifiye edilmektedir (84). GPx-1'in endotel hücresindeki böyle önemli yerinin olmasından dolayı çalışmamızda glutatyon peroksidaz ailesinden, GPx-1'i seçmeyi uygun gördük.

Literatür incelendiğinde resveratrolün kardiyoprotektif etkileri *in vivo* çeşitli çalışmalarla gösterilmektedir (85, 86, 87, 88, 46). Sıçanlarda resveratrol hem oksijenaz-1 indüksiyonu ve p38 MAP kinaz ve Akt aktivasyonu ile iskemi sonrasında ventriküler iyileştirme sağlayarak kardiyoprotektif etkisini göstermektedir (89). Yine sıçanlarda resveratrolün nitrik oksit düzeyini arttırdığı ve malondialdehit düzeyini azalttığı, böylece iskemik-reperfüze sıçanlarda kardiyoprotektif etki gösterdiği saptanmıştır (46). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada resveratrol kardiyoprotektif etkisini indüklenabilir nitrik oksit sentaz, endotelial nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz-1 ve 2, hem oksijenaz-1 proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek göstermektedir (90).

Literatürde resveratrolün antioksidan etkilerinin glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve γ -glutamil sistein sentetaz enzimlerinin protein ekspresyonları ile değerlendirildiği ve *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde resveratrolün glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve γ -glutamil sistein sentetaz enzimlerinin protein ekspresyonlarına etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın bulgularının literatüre katkısının olacağını düşünmekteyiz.

ALTINCI BÖLÜM

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın hipotezi “antienflamatuvar, antioksidan ve sitoprotektif etkileri gösteren resveratrolün, hidrojen peroksitle oluşturulan *in vitro* endotel hücre hasarını önleyebilir ya da düzeltebilir” şeklinde kurgulandı. Bu hipotezi sınamak amacıyla çalışmada resveratrolün *in vitro* hidrojen peroksit hasarına karşı insan koroner arter endotel hücrelerini olası koruyucu etkisini hücre sitotoksitesi, oksidatif hasar göstergesi olan reaktif oksijen türleri oluşumu, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve γ -glutamil sistein sentetaz enzimlerinin protein ekspresyonları ve glutatyon düzeyi ile değerlendirildi. Çalışmada, resveratrolün hücre sitotoksitesini ve reaktif oksijen türleri oluşumunu azalttığını, glutatyon düzeyini ve glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, γ -glutamil sistein sentetaz protein ekspresyonları arttırarak hidrojen peroksitle oluşturulan oksidatif strese karşı *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerini koruduğunu saptadık. Bu bulgular başta kurgulanan hipotezi desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda resveratrol ile preinkübe edilen *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde hücre sitotoksitesi ve reaktif oksijen türleri oluşumunun anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. Resveratrol ile preinkübasyona bırakıldıktan sonra oksidatif hasar oluşturduğumuz *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde glutatyon düzeyi ve glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve γ -glutamil sistein sentetaz enzimlerinin protein ekspresyonlarında oksidatif hasar oluşturduğumuz gruba göre anlamlı bir artış saptadık. Bu bulgularımız resveratrol ile muamele edildiğinde oksidatif strese direncin artmasından sorumlu olabilmektedir.

Literatür incelendiğinde *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde resveratrolün koruyucu etkilerinin mekanizma/mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmanın bulunmaması, bu çalışmanın literatüre olan katkısını göstermektedir.

Çalışmamızdaki bulgular ışığında ileriye yönelik yapılması uygun olacak çalışmaları şöyle sınıflandırabiliriz:

- Resveratrolün *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde hidrojen peroksit hasarına karşı koruyucu etkisinin Western blot yöntemi ile değerlendirilen antioksidan enzimlerin (γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz) enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle değerlendirilmesinin enzimlerin aktivitesi konusunda fikir vermesi açısından uygun olacağı düşüncesindeyiz.
- Resveratrolün *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde hidrojen peroksit hasarına karşı γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz ekspresyonlarını ve glutatyon düzeyini artırarak gösterdiği koruyucu etkisinde Nrf2 transkripsiyon aracılı etki mekanizmasının incelenmesinin anlamlı olacağı düşünmekteyiz.
- Bu amaçla; Nrf2 transkripsiyon faktörünün hücrenin nükleer ve sitoplazmik ekstraksiyonlarında Western blot ile protein ekspresyonun gösterilmesinin, immuno fluoresans ile nükleusa translokasyonun incelenmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz.
- Resveratrolün *in vitro* insan koroner arter endotel hücrelerinde Nrf2'nin nükleer translokasyonunun γ -glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz ekspresyonlarını artırıcı etkisine aracılık edip etmediğinin Nrf2 siRNA kullanılarak araştırılabileceği düşüncesindeyiz.
- Kardiyovasküler sistem üzerinde resveratrolün *in vivo* etkileri konusunda özellikle çalıştığımız antioksidan enzimleri açısından eksiklik bulunmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalar yanında *in vivo* çalışmaların da yapılmasının uygun olduğunu düşünmekteyiz.

YEDİNCİ BÖLÜM

7. KAYNAKLAR

1. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15(8): 1983–1992.
2. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 2004;44:381-386.
3. De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35: 1156-1160.
4. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*, 2005;16(8):449-66.
5. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res*, 2005; 49(5): 472–481.
6. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol*, 2004;489(1-2):39-48.
7. Li Y, Cao Z, Zhu H. 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 stres. *Pharmacol Res*, 2006;53:6–15.
8. Brito PM, Mariano A, Almeida LA, Dinis TC. Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 2006; 164(3): 157-166.
9. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004;24:351-371.
10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD ve ark. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007;39:44-84.
11. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*, 2005;68(1):26-36.
12. Makino N, Sasaki K, Hashida K, Sakakura Y. A metabolic model describing the H₂O₂ elimination by mammalian cells including H₂O₂ permeation through cytoplasmic and

peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochim Biophys Acta*, 2004;1673(3):149-59.

- 13.** Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*, 2002;9(4):231-8.
- 14.** Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res*, 2006; 40(10): 1054–1065.
- 15.** Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Pharmacol Res*, 2005;52(2):174-82.
- 16.** Wang YK, Hong YJ, Huang ZQ. Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Vascul Pharmacol*, 2005;43(4):198-206.
- 17.** Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004;287: R1014–R1030.
- 18.** Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol, Med* 2006; 40(12): 2206–2213.
- 19.** Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J ve ark. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol*, 2005;90(4):457-62.
- 20.** Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-1160.
- 21.** Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, 2009;73(3):411-8.
- 22.** Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000;87(10):840-4.
- 23.** Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in Redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003; 333: 19-39.
- 24.** Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*, 2007;113(4-5):234-58.
- 25.** Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E ve ark. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with

- fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001;752:123–132.
- 26.** Purucker E, Marschall HU. Increase in renal glutathione in cholestatic liver disease is due to a direct effect of bile acids. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002;283:1281-1289.
 - 27.** Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev*, 2005;4:288–314.
 - 28.** Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S ve ark. Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 2009;390(3):191-214.
 - 29.** Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 2003 May-Jun;57(3-4):145-55.
 - 30.** Wu G, Fang YZ, Yang S. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr*, 2004;134: 489–492.
 - 31.** Song IS, Tatebe S, Dai W, Kuo MT. Delayed mechanism for induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 2005;280(31):28230-40.
 - 32.** Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML. Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol*, 2000;182(2):163-70.
 - 33.** Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 1999;27(9-10):922-35.
 - 34.** Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid Redox Signal*, 2003;5(2):205-15.
 - 35.** Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidase and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*, 2006;387:1329-1335.
 - 36.** Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Mol Life Sci* 2000; 57:1825–1835.
 - 37.** Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. *Annu Rev Nutr*, 2007;27:41–61.
 - 38.** Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, 2007;9(7):775-806.
 - 39.** Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Homocysteine and glutathione peroxidase-1. *Antioxid Redox Signal*, 2007 ;9(11):1923-40.

- 40.** Sayın O, Arslan N, Güner G. Resveratrol ve Kardiyovasküler sistem. *Turk J Biochem* 2008;33(3):117-121.
- 41.** Henry-Vitrac C, Desmoulie`re A, Girard D, Me´rillon JM. Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr*, 2006;45:376–382.
- 42.** Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D ve ark. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol*, 2004;68(6):1113-8.
- 43.** Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*, 2009;53(1):115-28.
- 44.** Delmas D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res*, 2005; 49:377 – 395.
- 45.** Das DK, Maulik N. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv*, 2006;6(1):36-47.
- 46.** Shen M, Jia GL, Wang YM, Ma H. Cardioprotective effect of resvaratrol pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Vascul Pharmacol*, 2006;45(2):122-6.
- 47.** Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCV. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*, 2005;81:277S– 83S.
- 48.** Fresheney RI. Measurement of viability and cytotoxicity in culture of animal cell. Culture of animals. Amanual of Basic Techniqoe. Third edition, USA, John Wiley and Sons, 1994; 287-307
- 49.** Peters DG, Zhang XC, Benos PV, Heidrich-o HE. Genomic analysis of immediate/early response to shear stress in human coronary artery endothelial cells. *Physiol Genomics*, 2002;12:25–33.
- 50.** Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K ve ark. PPARAlpha activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1-dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res*, 2004;94(3):324-32.
- 51.** Vieira de Almeida LM, Piñeiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Gonçalves CA. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res*, 2008; 33(1): 8-15.

- 52.** Wang B, Peng L, Zhu L, Ren P. Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007;60(1):36-40.
- 53.** Shimizu Sİ, Nomoto M, Yamamoto T. Reduction by N^G-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br J Pharmacol*, 1994;113: 564-568.
- 54.** Hernandez-Montes E, Pollard SE, Vauzour D, Jofre-Montseny L. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006;346(3):851-9.
- 55.** Choi YJ, Jeong YJ, Lee YJ. (-) Epigallocatechin Gallate and Quercetin Enhance Survival Signaling in Response to Oxidant-Induced Human Endothelial Apoptosis. *J Nutr*, 135: 707–713, 2005.
- 56.** Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N ve ark. Resveratrol increases vascular oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(5):H2417-24.
- 57.** Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*, 2003;278(5):3170-5.
- 58.** Çavdar Z, Eğrimez MY, Bülbül M, Güner G, Koçtürk S. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Eritrositlerde Toplam ve İndirgenmiş Glutasyon Miktarının Tayini. *Türk J Biochem*, 2006;31 (4):187–193.
- 59.** Scharte M, Jurk K, Kehrel B, Zarbock A ve ark. IL-4 enhances hypoxia induced HIF-1 α protein levels in human transformed intestinal cells. *FEBS Lett*, 2006;580:6399-6404.
- 60.** Kurien BT, Scofield RH. Introduction to protein blotting. *Methods Mol Biol*, 2009;536:9-22.
- 61.** Fu XH, Wang L, Zhao H, Xiang HL, Cao JG. Synthesis of genistein derivatives and determination of their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008;18(2):513-7.
- 62.** Cortese MM, Suschek CV, Wetzell W, Kröncke KD ve ark. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med*, 2008; 44(12): 2002-12.
- 63.** Liu HT, Li WM, Xu G, Li XY, Bai XF, Wei P, Yu C, Du YG. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Res*, 2009; 59(3): 167-75.

- 64.** Cortese-Krott MM, Suschek CV, Wetzel W, Kröncke KD. Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009;296(4):C811-20.
- 65.** Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett*, 2009;184(1):13-7.
- 66.** López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003;43(3):233-44.
- 67.** Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*, 1997; 11(5): 287–313.
- 68.** Luque-Aznar R, Lopez-Velez M, Martínez-Martínez F. Total antioxidant capacity in pathological human samples. *Clin Chim Acta*, 2003;336(1-2):143-4.
- 69.** Pirola L, Sara Fröjdö S. Resveratrol: One Molecule, Many Targets. *IUBMB Life*, 2008;60(5):323-32.
- 70.** Rubiolo JA, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against cell death induced by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother*, 2008; 62(9): 606-612.
- 71.** Hwang JT, Kwon DY, Park OJ, Kim MS. Resveratrol protects ROS-induced cell death by activating AMPK in H9c2 cardiac muscle cells. *Genes Nutr*, 2008;2(4):323-6.
- 72.** Jang JH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res*, 2001;496(1-2):181-90.
- 73.** Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 2006;20(1):1-15.
- 74.** Ha MK, Chung KY, Bang D, Park YK ve ark. Proteomic analysis of the proteins expressed by hydrogen peroxide reated cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Proteomics*, 2005; 5:1507–1519.
- 75.** Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung, Cell Mol Physiol* 2008; 294(3): L478–L488.
- 76.** Zhang Y, Handy D, Loscalzo J. Q. Adenosine-Dependent Induction of Glutathione Peroxidase 1 in Human Primary Endothelial Cells and Protection Against Oxidative Stress. *Circ Res*, 2005;96:831-837.

- 77.** Miller S, Walker SW, Arthur JR, Nicol F ve ark. Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clin Sci*, 2001;100(5):543-50.
- 78.** Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*, 2008; 591(1-3): 66–72.
- 79.** Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005;331(4):993-1000.
- 80.** Hou YZ, Zhao GR, Yang J, Yuan YJ, Zhu GG, Hiltunen R. Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life Sci*, 2004; 75(14): 1775-86.
- 81.** Kweon MH, In Park Y, Sung HC, Mukhtar H. The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. *Free Radic Biol Med*, 2006;40(8):1349-61.
- 82.** Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Schnabel R ve ark. Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. *Am J Cardiol*, 2007;99(6):808-12.
- 83.** Campbell L, Howie F, Arthur JR, Nicol F, Beckett G. Selenium and sulforaphane modify the expression of selenoenzymes in the human endothelial cell line EAhy926 and protect cells from oxidative damage. *Nutrition*, 2007;23(2):138-44.
- 84.** Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings E, Bierl C. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002;282: h1255–h1261.
- 85.** Tatlıdede E, Sehirli O, Velioğlu-Oğünç A, Cetinel S. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radic Res*, 2009;43(3):195-205.
- 86.** Chen YR, Yi FF, Li XY, Wang CY ve ark. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs, Ther* 2008;22(6):427-8.
- 87.** Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P. Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity. *Life Sci*, 2003;72(24):2741-50.

- 88.** Chen CJ, Yu W, Fu YC, Wang X ve ark. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009;378(3):389-93.
- 89.** Das S, Fraga CG, Das DK Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappaB. *Free Radic Res*, 2006;40(10):1066-75.
- 90.** Dudley JI, Lekli I, Mukherjee S, Das M. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem*, 2008;56(20):9362-73.

Ek 1. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 19.10.2007/342

Etik Kurul Üveleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGIN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 18 Ekim 2007 tarih ve 13/22/2007 no.lu toplantısında, 210/2007 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Biyokimya Doktora Programı öğrencilerinden Oya SAYIN'ın sorumlusu olduğu "Resveratrol'ün in vitro-hipoksi-reoksijenasyon ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına olası koruyucu etkisinin incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.A.Arzu SAYINER
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Doç.Dr.Servet AKAR
Yardı.Doç.Dr.Murat ÖRMEK
Öğr.Gör.Uzun.Dr.Ahmet Can BİLGIN
Z. S KARSU

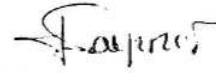
Etik Kurul Sekreteri
N. İGCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 26 Şubat 2009 tarih ve 06/05/2009 no.lu toplantısında; 210/2007 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Biyokimya Doktora Programı öğrencilerinden Oya SAYIN'ın sorumlusu olduğu "Resveratrol'ün in vitro-hipoksi-reoksijenasyon ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına olası koruyucu etkisinin incelenmesi" isimli projede isminin "Resveratrol'ün in vitro hidrojen peroksit ile indüklenen hücre hasarına olası koruyucu etkisinin incelenmesi" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.A.Arzu SAYINER
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

Ek 2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Düzenlenme Tarihi	04.12.2009
Adı Soyadı	Oya Sayın
Doğum Tarihi ve Yeri	06.01.1972 İzmir
Medeni Durumu	Evli
İş Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı
İş Telefonu	412 4679
E-Mail	oya.sayin@deu.edu.tr

EĞİTİM VE ÖĞRENİM DURUMU

Alınan Diplomalar	Üniversite	Bölüm	Yıl
Yüksek Lisans	Dokuz Eylül	Tıp Fakültesi, Biyokimya	1999
Lisans	Dokuz Eylül	Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler	1994

MESLEKİ DENEYİM

Çalıştığı Kurum	Bölümü	Görevi	Süresi (Yıllar)
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)	Biyolog	2008-
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)	Araş. Gör	2004-2008
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya ABD	Araş. Gör	1996-1999

BİLİMSEL YAYINLAR

A. MAKALE

1	Sayın O , Arslan N, Güner G,"Resveratrol ve Kardiyovasküler sistem", Turkish Journal Of Biochemistry, 33(3)/117-121/ 2008, 2008, Review Makale,SCI-Expanded
---	--

B- BİLDİRİLER (Yayımlanmış Özetler)

Yurtdışı Bildiriler (Poster)

1	Çavdar Z, Sayın O , Arslan N, Yüksel Eğrilmez M, Altun Z, Yener N, Genç K, Genç Ş, İşlekel G, Oktay G, Güner Akdoğan G,"Resveratrol decreases hypoxia/reoxygenation induced MMP-2 secretion in human brain microvascular endothelial cells", 34th FEBS Cogress Life's Molecular Interactions, Prag, Çek Cumhuriyeti, FEBS Journal, 2009;276(1):198, Uluslararası organizasyon
2	Pureda Yazici, Oya Sayın , Gul Guner,"Antioxidant Effect of Green Tea and Coenzyme Q10 in Human Coronary Artery Endothelial Cells", 9th FEBS Young Scientist Forum & 34th FEBS Congress Life's Molecular Interactions, Prag, Çek Cumhuriyeti, FEBS Journal, 2009;276(1):395, Uluslararası Hakemli organizasyon
3	Sayın O , Arslan N, Güner G,"Protective Effect Of Resveratrol On In Vitro Human Coronary Artery Endothelial Cell Injury", 9th FEBS Young Scientist Forum & 34th FEBS Congress Life's Molecular Interactions, Prag, Çek Cumhuriyeti, FEBS Journal, 2009;276(1):198, Uluslararası organizasyon
4	Arslan N, Eğrilmez M, Altun Z, Sayın O , Genç Ş, Genç K, İşlekel G, Güner G,"In vitro activation of Nrf2 mediated oxidative stress response in human cerebral microvascular endothelial cells by resveratrol", 33rd FEBS Congress, Yunanistan, FEBS Journal, 2008;276(1)308, Uluslararası organizasyon
5	Z.Altun, MY.Eğrilmez, NY.Biçer, Ş.Genç, K.Genç, Z.Çavdar, O.Sayın , G.Oktay, H.İşlekel, G.GÜNER,"Protective effects of resveratrol against in vitro hypoxia reoxygenation injury in human umbilical vein endothelial cells", 32rd FEBS Congress, Avusturya, FEBS Journal, 2007;274(1):362, Uluslar arası Hakemli organizasyon

6	T. Küme, H. Resmi, A. Solak, Sayın O. Yılmaz, Y. Tunçok, S. Sarioğlu, G. Güner, "The Effects of Nitric Oxide on Glycative and Oxidative Stress in STZ Induced Diabetic Rats", 31st FEBS Congress, İstanbul, FEBS Journal, 2006; 273(1)200, Uluslar arası Hakemli organizasyon
---	--

Yurtiçi Bildiriler

1	Çavdar Z, Sayın O , Arslan N, Yüksel Eğrilmez M, Altun Z, Yener N, Genç Ş, Genç K, İşlekel G, Oktay G, Güner G, "İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücrelerinde Hipoksi/Reoksijenasyon İle İndüklenen MMP-2 Sekresyonunun Resveratrol Tarafından Azaltılması", 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 2009;34:S163.
2	Altun Z, İşlekel G, Sayın O , Yüksel Eğrilmez M, Çavdar Z, Genç Ş, Genç K, Resmi H, Oktay G, Güner G, "Erken ve Geç Hipoksi Reoksijenasyon HUVE Hücrelerini Oksidatif Stres Açısından Nasıl Etkiler?", 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 2009;34:S212.
3	Sayın O , Arslan N, Altun Z, Güner G, "Resveratrolün İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinde Oksidatif Hücre Hasarına Karşı In vitro Etkisi", 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 2009;34:S203.
4	Mehtap AZ, Irmak ERDOĞAN, Sayın O , Güner G, "Resveratrolün İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerine "In vitro" Etkisinin İncelenmesi", Dokuz Eylül üniversitesi Tıp fakültesi III. Özel Çalışma Modülü Sempozyumu, İzmir, Ekim 2009
5	Zekiye Altun, Hüray İşlekel, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Nilgün Yener, Şermin Genç, Kürşad Genç, Oya Sayın , Gülgün Oktay, Gül Güner, "The Protective Role of Erythropoietin Against In-vitro Ischemia Reperfusion Injury in HUVE Cells In vitro", Mechanisms Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications, Advanced Course;115 Kemer/Antalya, Nisan 2009
6	Sayın O , Yazıcı P, Arslan N, Akdoğan G, "Resveratrolün in vitro insan koroner arter endotel hücre hasarına karşı koruyucu etkisi", XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Nevşehir, Turk J Biochem 2008;33;251-52, Hakemli organizasyon
7	Arslan N, Eğrilmez M, Altun Z, Sayın O , Çavdar Z, Genç Ş, Genç K, İşlekel G, Güner G, "Beyin endotel hücrelerinde Resveratrol ile Nrf2 aracılı oksidatif stres yanıtının aktivasyonu", XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Nevşehir, Turk J Biochem 2008;33;233-34, Hakemli organizasyon

C-TEZLER

Doktora Tezi	Resveratrolün <i>in vitro</i> hidrojen peroksit ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına olası koruyucu etkisinin incelenmesi. Tezin Danışmanı, Başlama tarihi : Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN, Ekim 2003-
Yüksek Lisans Tezi	Preeklampitik Gebelerde Tübüler Hasarın İdrarda Alanin Amino peptidaz enziminin aktivitesi ölçülerek değerlendirilmesi Tez Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri: Prof. Dr. Banu ÖNVURAL, Aralık 1996 - Ocak 1999

D-GÖREV ALDIĞI PROJELER

No	Adı
1	Juvenil İdiopatik Artritli Hastalarda Serum Ghrelin, Leptin, Resistin Ve Adiponektin Düzeylerinin Nutrisyonel Durum Ve İnflamatuvar Belirteçlerle İlişkisi. Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Nur ARSLAN Projen No: 2009121 Projedeki Görevi: Araştırmacı
2	Pediyatrik Obesite İle İlişkili Yağlı Karaciğer Hastalığında Leptin Polimorfizmin Değerlendirilmesi. Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Nur ARSLAN Projen No: 2009150 Projedeki Görevi: Araştırmacı

E-ÜYELİKLER

ÜYELİK DÖNEMİ	KURULUŞ
1995-	Türk Biyokimya Derneği

F-BURSLAR

ADI	SÜRESİ(YILLAR)
Yüksek Lisans Bursu, Tübitak	2 Yıl, 1996-1998

G. SERTİFİKALAR

ADI	YERİ-YILI
Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası,	Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Ve Uygulama Hastanesi, 2009

H. KATILDIĞI BİLİMSEL ETKİNLİKLER

ADI	Düzenleyen Kuruluş	YERİ/YILI
Bilimsel Araştırmalar: Bilgi Üreten Topluma Geçiş Sempozyumu	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	İzmir, 2006
İnsan Genom Projesi	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Balçova, 2006
Başarılı İletişim Sırları	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	İzmir, 2006
19. Ulusal Biyokimya Kongresi	Türk Biyokimya Derneği	Antalya, 2005
1. Klinik Enzimoloji Çalıştayı	Türk Biyokimya Derneği	Antalya, 2005
NLP(Beyin Dili Programı)	Elginkan Vakfı Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi	Manisa, 2005
Toplam Kalite Yönetimi Felsefesi	Elginkan Vakfı Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi	Manisa, 2005
Serbest Radikaller, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Balçova, 2005
Uygulamalı Biyokimya Kış Okulu	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi	Bornova, 2004
İleri Moleküler Araştırma Teknikleri Kursu	Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü TUBİTAK	Gebze,2004
Birinci Sağlıkta ve Hastalıkta Ekstrasellüler Matriks	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Türk Biyokimya Derneği	İzmir, 1997

Ek. 3 Yayınlanmış Makale

Sayın O, Arslan N, Guner G. Resveratrol ve Kardiyovasküler sistem. Turkish Journal Of Biochemistry 2008;33(3):117-121. Review, SCI-Expanded.

RESVERATROL VE KARDİOVASKÜLER SİSTEM

RESVERATROL AND CARDIOVASCULAR SYSTEM

OYA SAYIN^{1,2} NUR ARSLAN^{2,3} GÜL GÜNER^{1,2,4}

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma laboratuvarı (ARLAB), İzmir

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir

³ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir

⁴ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

Yazışma Adresi:

Oya Sayın

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ARLAB

İnciraltı-İZMİR

Tel: 0232 4124679

Faks: 0232 4878682

e-mail: oya.sayin@deu.edu.tr

ÖZET

Süper oksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin endojen üretiminde artış ile karakterize olan oksidatif stres, endotel tabakasının işlev bozukluğunun temel nedenidir. Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörolojik hastalıklar, diyabet, yaşlanma ve diğer pek çok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları; bu mekanizmaların engellenmesi, onarımı, fiziksel savunma ve antioksidan savunmayı kapsamaktadır. Hipoksi-reoksijenasyon (ya da iskemi-reperfüzyon) hasarı kalpte hem koroner damarları (damar düz kası ve endotelini), hem de kalp kası hücrelerini (kardiyak myositleri) etkilemektedir. Koroner damarlardaki hasar, damar tonusunu değiştirebilir ve reperfüzyon sırasında koroner kan akışını etkileyebilir. Kas hücrelerindeki iskemi-reperfüzyon hasarına ek olarak, koroner akışın azalması myokardial disfonksiyonu arttırmakta, bu da ölüm ya da hastalıkla sonuçlanmaktadır. Enzimatik antioksidan savunma süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğerleridir. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında denge bulunmaktadır. Bu denge, organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir. Resveratrol, stilbenlerin alt grubu olup, üzüm ve kırmızı şarapta bulunan polifenolik bir bileşiktir. Anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-apoptotik, sitoprotektif, anti-kanser ve kardioprotektif etkileri bulunmaktadır. Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiyovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı saptanmıştır (Fransız paradoksu). Kardiyak hasarın akut ve kronik modellerinde, resveratrol miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini azaltmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu, yapılan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Oksidatif stres, endotel, resveratrol

SUMMARY

Oxidative stress, characterized by an increased endogenous production of reactive oxygen species such as superoxide anion and hydrogen peroxide, is the basic cause of endothelial dysfunction. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of cardiovascular disease, cancer, neurological disorders, diabetes, ageing and other diseases. There is increasing evidence that reactive oxygen species play a role in reoxygenation injury. Defense mechanisms against free radical-induced oxidative stress involve inhibition of these mechanisms, repair mechanisms, physical defense and antioxidant defense. Hypoxia-reoxygenation injury (or ischemia-reperfusion) affects both cardiac myocytes and coronary vessels (the vascular smooth muscle and the endothelium) in the heart. Reduction of the coronary flow, in addition to the ischemia-reperfusion injury to the cardiac myocytes, may increase myocardial dysfunction, resulting in mortality and morbidity. Enzymatic antioxidants involve superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase enzymes. Non-enzymatic antioxidants are ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione, carotenoids, flavonoids, stilbenes and others. Under normal conditions, there is a balance between both the activities and the intracellular levels of these antioxidants and this balance is important for the organism's survival and health. Resveratrol is a polyphenolic compound belonging to the stilbene family found in grapes and red wine. It is a molecule with anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-apoptotic, cytoprotective, anti-cancer and cardioprotective effects. In France, a negative relationship has been found between red wine consumption and the prevalence of cardiovascular disease (French paradox). In both of the acute and chronic cardiac injury models, resveratrol reduces the severity of ischemia-reperfusion injury. Numerous studies have shown that resveratrol is protective against oxidative damage which plays a role in the pathophysiology of cardiovascular disease.

Key words: Oxidative stress, endothelium, resveratrol

GİRİŞ

"Oksidatif stres"; reaktif oksijen, azot ya da demir ürünlerinin oluşumu ile bağlantılı genel bir terimdir (1). Reaktif oksijen türleri ("reactive oxygen species" - ROS) ailesi moleküler oksijenin indirgenmesinden kaynaklanan fazlaca biyoaktif, kısa ömürlü molekülleri içerir (2). Yaygın olan reaktif oksijen türlerinden bazıları hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikalidir (3).

Endotel hücreleri bir çok vazoaaktif maddelerin salınmasında, trombosit agregasyonunda, vasküler yapının kontrolünde görev almaktadır. Fizyolojik şartlar altında endotelden salınan maddelerin başlıca etkileri vazodilatasyon, antiproliferasyon ve antiagregasyondur. Bu etkileri ile vücut sıvılarının sürdürülmesi, dokuda kan akışının düzenlenmesi ve kan basıncındaki yüksekliğin sınırlandırılması sağlanmaktadır (4). Endotel tabakanın kan damarları içindeki yerleşimi kan ve vasküler düz kas hücreleri arasında bir bariyer görevi üstlenmesini sağlamaktadır. Bu nedenle endotelin işlevsel bütünlüğü vasküler sızıntı ve ateroskleroz oluşumunun önlenmesinde önemlidir (5). Endotelde fonksiyon kaybı olması, vazodilatasyonun azalması yönünde giden çeşitli olaylar ile karakterizedir. Vasküler ve inflamatuvar hücrelerden kaynaklanan hidrojen peroksit, oksidatif stresi indükleyerek endotelde fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Bu da koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği, hipertansiyon, periferik arter hastalığı ve diyabet gibi hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (6). İskemik dokunun reperfüzyonu (ya da hipoksi/reoksijenasyon) damar endotelinde ve hedef organ parankiminde hasar oluşturan inflamatuvar bir yanıtı yol açar ve iskemi sonrası görülen hasarı artırır (2).

Organizma çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalınması sonucu birçok savunma mekanizmaları geliştirir. Serbest radikallerle indüklenen oksidatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları: bu mekanizmaların engellenmesi, onarım mekanizması, fiziksel savunma ve antioksidan savunmadır. Enzimatik antioksidan savunma kaynakları

süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı kapsamaktadır. Memeli hücrelerinde glutatyon ve glutatyon peroksidazlar antioksidan savunma sisteminde yer alırlar (7).

Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler, stilbenler ve diğer antioksidanlardır. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında denge bulunmaktadır. Bu denge organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir (3). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diyetteki bitki polifenollerinin hücrenin antioksidan savunmasında görev alan enzimlerin ifadenmesini düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Resveratrol antioksidan özelliği ile hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. *In vitro* hücre kültürü deneylerinde polifenollerin antioksidan özelliğe sahip olduğu ve polifenol içeriği zengin diyetle beslenmenin de bazı hastalıkları önleyebildiği gösterilmiştir.

Bu derlemede oksidatif stresin endotel üzerine etkileri, doğal bir antioksidan olan resveratrolün yapısal ve moleküler özellikleri, metabolizması, işlevleri ve kardiyovasküler sisteme etkileri değerlendirilerek klinik önemi tartışılmıştır.

OKSİDATİF STRES VE ENDOTEL

Endotel, damar homeostazını düzenleyen tabakadır. Bunu pek çok farklı yol ile yapmaktadır. Vazokonstriktör ve vazodilatör maddeleri oluşturarak (nitrik oksit gibi) damar tonusunu dengeler. Ayrıca, pıhtılaşma kaskadı, fibrinolitik sistem ve trombosit aktivasyonundaki faktörleri de sentezleyerek kan akışını ve koagülasyonu kontrol eder. Bunlara ek olarak, sitokinleri ve inflamatuvar olayları düzenleyen adezyon moleküllerini de üretme kapasitesine sahiptir. Hipertansiyon, hiperglisemi, hiperkolesterolemi, yaşlanma, sigara içme, aterosklerotik hastalıklar, obezite, C-reaktif protein artışı ve kronik sistemik enfeksiyon gibi önemli risk faktörleri, hem çocuklarda hem de yetişkinlerde endotele bağlı vazodilatasyonda azalmaya neden olur (8).

Hipoksi ve reoksijenasyon sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun primer yeri damar endotelidir. Endoteldeki reperfüzyon hasarının moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Reperfüzyonun indüklediği hasarı önlemek için, çeşitli antioksidanlar denenmektedir. Hipoksi-reoksijenasyon (ya da iskemi-reperfüzyon) hasarı kalpte hem koroner damarları (damar düz kası ve endotelini), hem de kalp kası hücrelerini etkilemektedir. Koroner damarlardaki hasar, koroner damar tonusunu değiştirebilir ve reperfüzyon esnasında koroner kan akışını etkileyebilir. Kas hücrelerindeki iskemi-reperfüzyon hasarına ek olarak koroner akışın azalması myokardial disfonksiyonu artırmakta, bu da ölüm ve hastalıkla sonuçlanmaktadır (9).

DOĞAL BİR ANTIOKSİDAN OLARAK RESVERATROL

Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir. Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yabanmersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (10). Resveratrol 1976 yılında üzümde fitoaleksinin olarak keşfedilmiştir. 1982 yılında resveratrolün Çin ve Japonya'da Kojo-kon (Kojo-kon: Itadori çayı olarak da bilinmektedir) olarak adlandırılan; cilt enfeksiyonları, fungal enfeksiyonlar, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarında kullanılan "Polygonum cuspidatum" kurusunda bulunduğu bildirilmiştir. Fransa'da kırmızı şarap tüketimi ile kardiovasküler hastalık sıklığı arasında ters orantı saptanmıştır (Fransız paradoksu) (11).

Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, Coenzyme Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğer, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonuncusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini

yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Ancak bu özellik diğer pek çok güçlü antioksidandan daha zayıftır. Resveratrolün hidroksi radikalini yakalayabilmesi, $9.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ tepkime hızı ile, askorbik asit gibi potent bir radikal yakalayıcısından daha yavaştır. Resveratrol *in vitro* koşullarda ROS'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen *in vivo* olarak güçlü bir antioksidan işlevini görür. Resveratrolün *in vivo* antioksidan özelliği nitrik oksit sentezini arttırma yeteneği ile güç kazanmaktadır. Burada *in vivo* antioksidan olarak, nitrik oksit süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır (12). Resveratrolün hidrojen peroksit ile aktive olan insan lenfositlerinde glutasyon miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da insan lenfositlerinde resveratrolün glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon-S-transferaz gibi glutasyon metabolizması ile ilgili enzimlerin düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (13).

Resveratrolün biyosentezi

Resveratrol biyosentezini stilben sentaz enzimi kataliz eder. Resveratrol bitkiler tarafından strese yanıt olarak üretilir ve normalde fazla miktarda üretilmez. Resveratrolün biyosentezi *p*-kumarol-CoA'nın *p*-kumarol kalıntısı ile malonil-CoA'dan 3 adet C-2 alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondensasyon sonucu oluşur. Daha ileri reaksiyonları resveratrolün bifenolik halkasının 3. pozisyonunda glikozil ya da sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır (14).

Resveratrolün emilimi

Resveratrolün büyük kısmı jejunumdan, az kısmı ileumdan emilir. Bazolateral tarafa transport edilen resveratrolün çoğu glukuronid ve sülfat formlarına konjuge edilir. Tüm perfüze edilen resveratrolün ve konjugatlarının yalnızca %6'sı barsak epitelini geçmektedir (14). Resveratrol diyet ürünlerinde *cis* ve *trans* şeklinde bulunur. Glikozile formu 3-O- β -D-glukozidtir. Glikozilasyon resveratrolün enzimatik olarak oksidasyonunu önler ve böylece

biyolojik etkinliğini korur, kararlılığını ve biyoyararlanımını arttırır. Barsak hücreleri sadece aglikone resveratrolü absorbe ettiği için emilim sürecinde glikozidazlar gerekir. Yiyecekteki aglikon ve glikozile resveratrolün göreceli oranları emilim hızını düzenler. *Trans*-piseidin deglikozile edilmesi ince barsakta laktaz florizin hidrolaz [Lactase phlorizin hydrolase (LPH)] ve sitozolik- β -glukozidaz [Cytosolic- β -glucosidase (CBG)] tarafından olmaktadır. Enterositlere geçişte *trans*-piseid'in 2 yolu vardır:

Birinci yol apikal membran üzerinde bulunan LPH iledir. Lümene aglikon *trans*-resveratrol olarak salınır. Daha sonra karşı tarafa difüze olur. İkinci yol sodyuma bağlı glukoz transporter 1 [Sodium-dependent glucose transporter1 (SGLT 1)] ile fırçamsı kenar (brush-border) membranını geçtikten sonra CBG ile glukozidlerin yıkımıdır. Deglikozilasyondan sonra *trans*-piseid'ten *trans*-resveratrol oluşmaktadır. *Trans*-resveratrol enterositlerde daha ileri metabolize edilir, oluşan yeni bileşik glukuronik konjugatıdır. Major glukuronat *trans*-resveratrol-3-O- β -glukuronid'tir. Glukurokonjugat enterositlerden barsak lümenine salınır (15).

Resveratrolün dokulara transportu

Resveratrolün hidrofilik konjuge hale gelmesi kana geçişini, vucutta dağılımını ve ekskresyonunu kolaylaştırır. Resveratrol ve metabolitleri karaciğer ve safra kesesi tarafından kandan filtre edilerek safra ile barsaklara atılır. Daha sonra geri emilime uğrar. Resveratrol oral yolla alındıktan kısa süre sonra kolonda bulunur. Ancak dokulara dağılımı birkaç saat alır. Resveratrol karaciğerde glukuronatlanır, karaciğer ve duodenumda sülfatlanır. Sülfatla konjugasyon resveratrolün biyoyararlanımında hız sınırlayıcı basamaktır. Diyetle alınan oral dozun %70'i plazmada resveratrol ve konjugatları şeklinde tepe noktaya erişir; yarı ömrü dokuz saattir. Değişmemiş resveratrol eser miktarda plazmada saptanır (16).

Resveratrolün hücre içi reseptörlere bağlanması

Resveratrolün hücre içi reseptörleri konusunda bilinenler çok azdır. Aril hidrokarbon reseptörüne (AhR) bağlanan digoksinin kompetitif antogonisti olabileceği gösterilmiştir. Resveratrol, AhR'nin nukleusa tranlokasyonunu sağlamaktadır. Genistein ve resveratrol gibi fitoöstrojenler, insan östrojenleri ile bazı yapısal benzerlikler göstermektedir ve östrojen reseptörüne bağlanabilmektedir. Bazı çalışmalarda da resveratrol ile östrojen reseptörleri arasındaki etkileşim gösterilmiştir (17). Resveratrol, östrojenle ilgili genlerin ifadenmesini indüklemek için estradiol ile kombine olduğunda "süperagonist" olarak fonksiyon görmektedir. Son yapılan çalışmalarda resveratrolün her iki izomerinin ılımlı konsantrasyonda ($>10 \mu\text{M}$) yalnızca süperöstrojen etkinliğine sahip olduğu; daha düşük konsantrasyonlarda ($<1 \mu\text{M}$) antiöstrojenik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir. Resveratrol meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak rol oynamaktadır (13).

Resveratrolün atılımı

Atılım zamanı plazmada bulunan resveratrolün konsantrasyonuna bağlıdır. Üretilen miktar ile atılan miktar arasında korelasyon yoktur. Çok küçük miktarda aglikon resveratrol idrarda bulunur. Böbrekte başlıca natif formda bulunurken, idrarda konjuge formu büyük çoğunluktadır (14).

Resveratrol ve sinyal ileti yolları

Resveratrol mitogen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını harekete geçirebilir. MAPK'ların yolun aşağısına doğru hedefleri mitojenik proinflamatuvar enzimler ve nükleer transkripsiyon faktörleridir. Resveratrol farklı düzeylerde rol oynayabilir. Resveratrol protein kinaz C (PKC) fosforilasyonunu inhibe ederek yolun yukarısına doğru rol oynayabilir. Resveratrol MAPK kaskadını aktive eden diğer kinazları, fosfoinozitol 3- kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve protein kinaz B'nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu inhibe eder. Bu olaylar ile resveratrol vasküler düz kas hücrelerinde p70^{S6K} nın fosforilasyonunu azaltır. Resveratrol

ERK1/2/JNK/p38'in tirozin fosforilasyonunu ve vasküler hücrelerde nukleusa translokasyonunu inhibe ederek MAPK kaskadını aşağıya doğru baskılar. Fosforilasyonun ve sitoplazmadan nukleusa translokasyonun inhibisyonu vazokonstrüksiyon, anjiyogenez, proliferasyon ve diferansiyasyon ile ilgili genlerin ifadenmesini azaltmaktadır. Okside LDL (oxLDL), ROS ve PKC gibi birçok uyarıcı, nükleer faktör κ B (NF- κ B) yolunu aktive etme potansiyeline sahiptir. NF κ B sitoplazmada inhibitör κ B (I κ B) ile birlikte iken inaktif kompleks olarak bulunur. Uyarıcıya yanıt olarak I κ B kinaz kompleksinin katalitik alt birimi (IKK) I κ B'nin iki serin aminoasidini fosforiler. Bu fosforilasyon 26S proteozom tarafından I κ B'nin ubiquitine bağlı yıkımını tetikler. Aktive p50/p65 kompleksinin daha sonra nukleusa translokasyonu olur. p50/p65 kompleksi NF- κ B spesifik κ B DNA motiflerine bağlanır ve siklooksijenaz, sitokin gibi hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. Resveratrol p65'in fosforilasyonunu ve transaktivasyonunu IKK, PKC gibi kinazları inhibe ederek baskılar (18).

RESVERATROLÜN KARDİYOPROTEKTİF ETKİLERİ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda resveratrolün kardiyoprotektif özelliği tespit edilmiştir. Kardiyak hasarın akut ve kronik modellerinde, resveratrol miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini azaltmaktadır (13).

Vazorelaksasyon

Üzüm ya da şarap ekstraktı, damar duvarında 3',5'-monofosfat (cGMP) miktarını artırır; hem relaksasyon hem de cGMP'de artış N^G-monometil-L-arjinin ya da N^G-nitro-L-arjinin (endotelyuma bağlı gevşetici faktörün sentezinin kompetitif inhibitörü) tarafından ters çevrilir. Üzümdeki ürünlerin indüklediği vazorelaksasyona NO-cGMP yolu aracılık eder. Vazorelaksasyonda NO'nin direkt rolü resveratrol ile muamele edilen pulmoner arter endotel hücre kültüründe nitrik oksit sentaz (NOS) etkinliğinde artış bulunduğunda gösterilmiştir. Resveratrolün NOS üretimini etkileyerek kardiyoprotektif etki gösterdiği de saptanmıştır (13). Resveratrolün kardiyoprotektif, nöroprotektif, antikarsinogenik ve antiinflamatuvar etkileri *in*

vitro ve *in vivo* yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Shen ve ark. (19) ratlarda iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında resveratrolün kardiyoprotektif etkilerini miyokardiyal nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) parametreleri ile değerlendirmişlerdir. Resveratrol, I/R hasarı uygulanan ratlarda kalbi korumaktadır. Bu etki, NO üretiminin yukarıya çekilmesi ve antioksidan etkinliği ile ilgili olabilir. Epidemiyolojik çalışmalarda resveratrolce zengin Akdeniz diyetinin azalmış koroner arter hastalık riski ile birlikte olduğu ileri sürülmüştür.

Anti-enflamatuvar etkileri

İskemik bir kalpte resveratrolün kardiyoprotektif özelliği onun antienflamatuvar fonksiyonundan kaynaklanmaktadır. Resveratrol ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, resveratrolün miyokardiyal infarkt büyüklüğünü azalttığı ve iskemi sonrası ventriküler fonksiyonda önemli iyileştirmeler yaptığı gözlenmiştir. Resveratrol ile muamele edilen grupta proadezif moleküllerde [hücre içi adezyon molekül-1 (sICAM-1), endotelial lökosit adezyon molekül-1 (sE-Selectin) ve vasküler cell adezyon molekül -1 (sVCAM-1)] reperfüzyon esnasında önemli bir azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda NO blokörü nitro- L-arjinin metil esterinin (L-NAME), resveratrolün yararlı etkilerini tamamen elimine ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar resveratrolün antienflamatuvar etkisini NO'ye bağlı mekanizma aracılığı ile gerçekleştirdiğini desteklemektedir (13). Csiszar ve ark. (20) resveratrolün insan koroner arter endotel hücrelerinde TNF- α 'nın indüklediği NF- κ B aktivasyonunu ve enflamatuvar gen ifadenmesini doza bağlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir.

ROS yakalayıcısı olarak resveratrol

Resveratrolün kardiyoprotektif etkilerine miyokardiyumdaki katalaz etkinliğini artırma yeteneği de katılmaktadır. Resveratrol *in vivo* antioksidan olarak fonksiyon görür, kalpte peroksil radikalini yakalayabilir ve bu yolla iskemi-reperfüzyon hasarından kalbi korur (21). Brito ve ark. (22) sığır aortik endotel hücresinde peroksinitritin aracılık ettiği endotel hücre toksitesinde resveratrolün değişik doz ve sürelerinin etkisini hücre canlılığı, okside ve

redükte glutatyon düzeyi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrolün peroksinitritin indüklediği oksidatif strese karşı hücre içi indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyini arttırarak kardioprotektif etki sağladığını göstermişlerdir. Glutatyonun hücre yaşamındaki önemi dikkate alındığında, resveratrol antioksidan özelliği ile kardiyovasküler sistemi koruyucu etkisine yeni bir yaklaşım sağlamakta ve yeni tedavi stratejilerinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Sener ve ark. (23) wistar albino ratlarda resveratrolün 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. Altun ve ark. (24) resveratrolün *in vitro* insan umbilikal ven endotel hücrelerinde hipoksi-reoksijenasyon hasarına karşı koruyucu etkilerini glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, NO ve nitrotirozin ile değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, hipoksi-reoksijenasyon ile nitrik oksit konsantrasyonunun, katalaz ve SOD düzeylerinin değişmediğini, buna karşın, resveratrolün 10, 50, 100 µM konsantrasyonlarında ROS oluşumunu azalttığını göstermişlerdir.

Anti-apoptotik etki

Resveratrol kalbi korumada antiapoptotik sinyali indüklemektedir. Domuz koroner arterlerinde, resveratrol ile kısa süreli muamelede MAPK etkinliğini inhibe etmekte; ERK1/2, Jun N-terminal kinaz (JNK-1) ve p38MAPK'ın fosforilasyonunu azaltmaktadır. Benzer bir çalışmada resveratrolün endotelin-1'in aracılık ettiği protein tirozin fosforilasyonunu azalttığı bulunmuştur. Resveratrolün iskemik-reperfüze kalpte apoptotik kardiyomiyoitleri azalttığı gösterilmiş ve antiapoptotik etkileri desteklenmiştir (13). Resveratrol oksidatif stresin indüklediği apoptotik hücre ölümünü önleyerek ve H₂O₂ yakalayarak vasküler oksidatif strese direnci arttırmaktadır. Sıçan koroner arter endotel hücresinde resveratrol glutatyon peroksidaz-1 ve hem oksijenaz-1 ifadenmesini arttırarak antioksidan etkilerini

göstermektedir. Resveratrol, H₂O₂ ile oluşan apoptotik hücre ölümündeki artışa karşı endotel hücrelerini korur ve damarların oksidatif strese direncini artırır (25).

SONUÇ

Antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik etkileri olan resveratrolün kardiyovasküler hastalıklarının patofizyolojisinde oksidatif hasara karşı koruma yeteneği gösterilmiştir, fakat, biyokimyasal ve hücresel mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar iskemi/reperfüzyon hasarının koroner dolaşıma olan etkileri üzerine odaklanmıştır. Reaktif oksijen türleri, iskemi/reperfüzyon hasarında önemli olduğu için antioksidanlar hücre hasarını iyileştirmede kullanılmaktadır. Resveratrol antioksidan özelliği ile hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda diyetteki bitki polifenollerinin hücrenin antioksidan savunmasında görev alan enzimlerin ifadenmesini düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklarda oluşan oksidatif stresin iyileştirilmesinde kullanılan antioksidanlar yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutabilir.

KAYNAKLAR

1. Simopoulos AP.(2001) The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. J Nutr 131:3065S–3073S.
2. Schaller B, Graf R. (2004) Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. J Cereb Blood Flow Metab 24:351-371.
3. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39:44-84.
4. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. (2006) Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. Free Radic Res 40:1054–1065.

- 5.** Wang YK, Hong YJ, Huang ZQ. (2005) Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Vascul Pharmacol* 43:198 – 206.
- 6.** Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386.
- 7.** Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 349:1605-1613.
- 8.** Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. (2003) The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42:1149-1160.
- 9.** Dong YY, Wu M, Yim A. (2006) Effect of hypoxia-reoxygenation on endothelial function in porcine cardiac microveins. *Ann Thorac Surg* 81:1708 –1714.
- 10.** Li Y, Cao Z, 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. *Pharmacol Res* 53:6.
- 11.** Wenzel E, Germany SV. (2005) Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* 49: 472–481.
- 12.** De la Lastra CA, Villegas I. (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 35:1156-1160.
- 13.** Das DK, Maulik N. (2006) Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* 6:36-47.
- 14.** Signorelli P, Ghidoni R. (2005) Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16:449–466.
- 15.** Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, Méron D, Me´rillon JM. (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr* 45:376–382.

- 16.**Walle T, Hsieh F, Delege M. (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32:1377-1382.
- 17.**Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D. (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 68:1113–1118.
- 18.**Delmas D, Jannin B, Latruffe N. (2005) Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 49:377–395.
- 19.**Shen M, Jia GL, Wang YM. (2006) Cardioprotective effect of resvaratrol pretreatment on myocardial ischemia–reperfusion induced injury in rats. *Vascul Pharmacol* 45:122–126.
- 20.**Csiszar A, Smith K, Labinskyy N. (2006) Resveratrol attenuates TNF- α induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 1694–1699.
- 21.**Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCV. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81(suppl):277S–283S.
- 22.**Paula M. Brito, Anabela Mariano, Leonor M. Almeida, Teresa C.P. Dinis. (2006) Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 164:157-166.
- 23.**Sener G, Tugtepe H, Yuksel M. (2006) Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res* 37:822–829.
- 24.**Altun Z, Egrilmez MY, Bicer NY, Genc K, Genc S, Sayin O, Oktay G, Islekel H, Guner GA. (2007) Protective effects of resveratrol against *in vitro* hypoxia reoxygenation injury in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS J* 274:362.
- 25.**Ungvari Z, Orosz Z. (2007) Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2417-2424.

**Ek 4. Yayınlanmak üzere "Turkish Journal of Medical Sciences" dergisine
25.08.2009 tarihinde gönderilen makale:**

**IN VITRO EFFECT OF RESVERATROL AGAINST OXYDATIVE INJURY OF HUMAN
CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS**

Running title: Effect of Resveratrol Against Oxydative Injury of Endothelial Cells

Oya SAYIN ^{1,2,3} Nur ARSLAN^{2,3} Zekiye ALTUN ⁴ Gul GUNER^{1,2,3}

¹ Faculty of Medicine, Research Laboratory, Dokuz Eylul University, Izmir, TURKEY

² Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Dokuz Eylul University; Izmir, TURKEY

³ Institute of Health Science, Dokuz Eylul University; Izmir, TURKEY

⁴ Department of Basic Oncology, Institute of Oncology, Dokuz Eylül University, Izmir,
TURKEY

Correspondence Author.

Oya Sayın

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Research Laboratory

Inciraltı-İZMİR, TURKEY

Phone: +90 232 4124679

Fax: +90 232 2776584

e-mail: oya.sayin@deu.edu.tr

Introduction: Reactive oxygen species induce oxidative stress that may contribute to endothelial dysfunction. As well as the endogen antioxidants, taking antioxidant in diet has been used to reduce oxidative stress induced endothelial dysfunction. Resveratrol is a natural phytoalexin, having many effects including antioxidant activity. The aim of this study was to investigate whether resveratrol could protect human coronary artery endothelial cells against in vitro oxidative stress-mediated injury.

Materials and Methods: Human coronary artery endothelial cells were treated with varying concentrations of hydrogen peroxide for different durations and hydrogen peroxide plus varying concentrations of resveratrol and then cell death was measured using lactate dehydrogenase release. Human coronary artery endothelial cells were exposed to hydrogen peroxide and resveratrol plus hydrogen peroxide for 15, 60 minutes and 6 hours. Reactive oxygen species was measured using a fluorometric assay.

Results: Preincubation of cells with 10 and 50 μ M resveratrol for different time periods caused a significantly decreased hydrogen peroxide-induced cell death. Preincubation with resveratrol caused a significant decrease in reactive oxygen species production.

Conclusions: Our results demonstrate that resveratrol protects human coronary artery endothelial cells, in vitro, against oxidative stress-induced injury by decreasing cell death and reactive oxygen species production.

Keywords: Resveratrol, human coronary artery endothelial cell, oxidative stress.

RESVERATROLÜN İNSAN KORONER ARTER ENDOTEL HÜCRELERİNDE OKSİDATİF HÜCRE HASARINA KARŞI IN VITRO ETKİSİ

Kısa başlık: Oksidatif hasara karşı resveratrolün etkisi

Giriş: Reaktif oksijen türleri endotel fonksiyon kaybına katkıda bulunabilen oksidatif stresini indüklemektedir. Endojen antioksidanların yanı sıra, diyetle antioksidanların alımı, endotel fonksiyon kaybını indükleyen oksidatif stresini azaltmaktadır. Resveratrol antioksidan aktiviteyi kapsayan bir çok etkilere sahip doğal bir fitoaleksindir. Bu çalışmanın amacı resveratrolün in vitro oksidatif stresin aracılık ettiği hasara karşı insan koroner arter endotel hücrelerini koruyucu etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: İnsan koroner arter endotel hücreleri farklı süre ve konsantrasyonlarda hidrojen peroksitle ve hidrojen peroksit + resveratrol ile muamele edildi. Daha sonra hücre ölümü laktat dehidrogenaz salınımı ile ölçüldü. İnsan koroner arter endotel hücreleri hidrojen peroksitle ve hidrojen peroksit + resveratrole maruz bırakıldı. 15., 60. dakikada ve 6.saatte reaktif oksijen türleri florometrik ölçümle değerlendirildi.

Sonuçlar: 10 ve 50 µM resveratrol ile farklı zaman noktalarında preinkübasyon, hidrojen peroksitle ile indüklenen hücre ölümünün anlamlı olarak azalmasına neden olmaktadır. Resveratrol reaktif oksijen türleri oluşumunda anlamlı azalmaya neden olmaktadır.

Özet: Bulgularımız, resveratrolün, in vitro insan koroner arter endotel hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumunu ve hücre ölümünü azaltarak oksidatif stresin indüklediği hücre hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Resveratrol, insan koroner arter endotel hücresi, oksidatif stres.

Introduction

Endothelial cell which is located on the inner surface of the blood vessel wall has an important role in cardiovascular homestasis, such as vascular tone regulation, myocardial function and inflammatory responses (1). Endothelial dysfunction has been implicated in the pathophysiology of cardiovascular diseases such as hypertension, coronary artery disease, chronic heart failure, peripheral artery disease, diabetes, and chronic renal failure (2,3,4,5).

Reactive oxygen species (ROS) produced during general cell metabolism play many roles in cellular functions (6). Increased production of ROS changes cellular signaling system and causes damage to lipids, proteins, and DNA (7). Enhanced activity of oxidant enzymes and/or reduced activity of antioxidant enzymes cause oxidative stress (8). Oxidative stress is characterized by an increased endogenous production of ROS such as superoxide anion and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is produced by vascular and inflammatory cells and induces oxidative stress which may cause endothelial dysfunction and cellular injury. Hydrogen peroxide does not have unpaired electron and for this reason is less reactive than ROS. It has been reported that hydrogen peroxide causes endothelial cell damage by inducing oxidative stress (9), which in turn, can induce mitochondrial dysfunction. The mitochondrial dysfunction enhances generation of ROS and can cause cell death via ATP depletion or caspase-dependent apoptosis (10,11).

Since ROS has important roles in the pathogenesis of disease, taking antioxidant nutrients by diet, as well as the endogenous antioxidants, form the defence system operating to decrease ROS-induced endothelial dysfunction (7). Enzymatic antioxidants involve the enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and the non-enzymatic antioxidants are ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione, carotenoids, flavonoids and stilbenes (12).

Resveratrol is a polyphenolic compound belonging to the stilbene family found in grapes, peanuts, mulberries and red wine (13). In France, a negative relationship has been found between red wine consumption and the prevalence of cardiovascular disease (French paradox) (14,15). In 1982, Arichi et al. (15) determined that stilbene components are found in the roots of *Polygonum cuspidatum* which have been used by the traditional Japanese and Chinese medicine to treat disease of the heart, liver and skin.

Resveratrol is a molecule with anti-inflammatory, anti-oxidant, cytoprotective, anti-carcinogenic, neuroprotective, cardioprotective, anti-platelet aggregation, anti-atherogenic, oestrogen-like growthpromoting and immunomodulatory effects (6,16).

Resveratrol has been found to display anti-oxidant property depending on the redox properties of its hydroxyl phenolic groups and on the potential for the delocalization of electrons through its chemical structure (17). Rubiolo et al. (18) have shown that resveratrol increases the activity of antioxidant enzymes in primary rat hepatocyte cultures and thus protects these cells from oxidative stress induced damage. It has been shown that resveratrol induces endogenic antioxidants and phase 2 enzymes (e.g glutathione transferase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1) in cultured aortic smooth muscle cells and cardiomyocytes. Therefore, this compound increases resistance to electrophilic and oxidative injury (19,20).

Human coronary artery endothelial cells are significant in the elucidation of the cardioprotective effects of resveratrol. No literature data have been found on the in vitro effects of resveratrol on the death and ROS injury of these cells. The aim of this study was to investigate the possible effect of resveratrol on the in vitro oxidative stress-mediated injury of human coronary artery endothelial (HCAE) cells. For this purpose, incubation with hydrogen peroxide was used as an in vitro oxidative stress model and the cell injury assessed using LDH release and ROS production.

Material And Methods

Cell culture

HCAE cells were obtained from Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. HCAE cells were grown in culture medium (EGM-2 MV SingleQuats). Reagent pack was purchased from Cambrex (One reagent pack containing: trypsin/EDTA, trypsin neutralizing solution, HEPES buffered saline solution) and the cell culture performed according to the manufacturer's instructions. Seeding density was 5000 cells/cm² in HCAE cells. HCAE cells were maintained in endothelial growth medium supplemented with 25% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3 -IGF-1, ascorbic acid, hEGF and GA-1000 (Clonetics). The cells were incubated in a humidified atmosphere containing a 5% CO₂ at 37°C. The medium was changed every other day and passaged every 5-9 days. HCAE cells were used at passages 5-7 in all experiments.

Effect of resveratrol on human coronary artery endothelial cells (control study)

In order to test possible effect of resveratrol on intact cells, HCAE cells were incubated for 1, 12, 24 hours only with resveratrol (10, 50 and 100 μ M). At the end of each incubation, the medium was collected and the effect of resveratrol on HCAE cells was determined by LDH release into the medium. Lactate dehydrogenase, a cytoplasmic enzyme which is released from dead or plasma membrane damaged cells into the cultured medium was determined spectrophotometrically. At the end of each incubation, the medium was removed from 96 well plates and the LDH activity was measured using an LDH assay kit [LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH)] according to the manufacturer's instructions.

Hydrogen peroxide-induced oxidative stress, evaluation of cell death and determination of the effect of resveratrol

The oxidative stress model used in this study was incubation of cells with H₂O₂. For this purpose, HCAE cells were seeded in a 96-well plate at 1x10⁴ cells/ well and allowed to grow to confluence. The cells were then incubated for 1,3, 6 hours (21,22,23). with oxidative stress inducing agent H₂O₂ (100, 250, 500, 750 and 1000 µM) (22,24). Non- H₂O₂-treated cells (Control group) were incubated under the same conditions. At the end of each incubation, the medium was collected and the cell death, evaluated by the LDH assay. As will be seen in Figure 1, the % LDH release was observed to be between 30-40%, which would be considered as an optimal cell death rate, corresponding to a H₂O₂ concentration of 750 µM at an incubation period of one hour.

For the determination of the effect of resveratrol, the cells were preincubated with resveratrol at concentrations of 10, 50 and 100 µM (25) for 1 hour, 12 hours and 24 hours. After the preincubation, the medium was changed and then the cells were exposed to the selected concentration of 750 µM H₂O₂ for one hour. After this time period, the medium was collected and the cell death, evaluated by LDH release into the medium. The LDH activity was measured using a LDH assay kit [LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH)] according to the manufacturer's instructions.

Evaluation of cell injury by measuring reactive oxygen species (ROS) generation and determination of the effects of resveratrol

To evaluate the ROS production due to injury, 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF; Molecular Probes, USA)] was used. Cells were exposed for different time periods (15, 60 minutes and 6 hours) (26) with various concentrations of H₂O₂ (100, 250, 500, 750 and 1000 µM) and oxidative stress was produced. ROS generation was determined spectrofluorometrically using the HPF probe. Then, to determine the effect of resveratrol on

the ROS generation, the cells were preincubated with resveratrol (10, 50 and 100 μM ; 24 hours) and then exposed to oxidative stress (750 μM H_2O_2). After treatment with H_2O_2 , ROS formation was evaluated with HPF at 15 minutes, one hour and 6 hour time intervals, these time lines being predetermined in the optimization work on ROS assay. The ROS generation was measured using HPF probe according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All experiments were repeated three times with similar results. All data were expressed as means $\pm$ SD. Variables were compared with the Mann-Whitney U test and a value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

The evaluation of cell death for human coronary artery endothelial cells treated with resveratrol

The effect of resveratrol on the cell death of human coronary artery endothelial cells are shown in Figure 1. When the cells were incubated with 10 and 50 μM resveratrol, significant cell death was not observed for all time periods. However, a low (15%) LDH liberation was observed for 100 μM resveratrol.

The inhibitory effect of resveratrol on cell death induced by H_2O_2 in HCAECs

Oxidative stress-induced cell death was measured by the LDH release into the medium in the HCAE cell cultures. The HCAE cell cultures were exposed to 100, 250, 500, 750 and 1000 μM H_2O_2 for 1, 3 and 6 hours and the one-hour treatment with 750 μM H_2O_2 significantly increased cell death, as shown in Figure 2. This concentration was selected for further studies with resveratrol. To determine the effect of resveratrol on the cell cell death, HCAE cells were pretreated with 10, 50, 100 μM resveratrol for 1, 12 and 24 hours. Then, HCAE cells were exposed to 750 μM H_2O_2 , for one hour. 100 μM resveratrol was not observed to show the effects seen for 10 and 50 μM concentrations at all preincubation

periods. Preincubation with 10 and 50 μM resveratrol for 1, 12 and 24 hours decreased H_2O_2 -induced cell death in HCAE cells as shown in Figure 3.

The inhibitory effect of resveratrol on the ROS injury in HCAECs

Increased fluorescence intensity was determined when cells were treated with various concentrations of H_2O_2 . ROS levels were markedly increased after 15 minutes of treatment by various concentrations of H_2O_2 and reached a peak which gradually decreased in a 6-hour lapse of time (Figure 4). Figure 5 shows the effect of resveratrol on HCAE cell cultures subjected to ROS injury. All concentrations of resveratrol (10, 50 and 100 μM) decreased H_2O_2 - induced ROS injury at all preincubation time periods.

Discussion

Resveratrol shows its antioxidant effects via two different cytoprotective mechanisms (16). Firstly, resveratrol has direct free radical scavenger (ie, hydroxyl radicals and superoxide anion) and potent antioxidant properties. There is evidence that resveratrol has an intrinsic antioxidant capacity which depends on the redox properties of its hydroxyl phenolic groups and on the potential for the delocalization of electrons through the chemical structure (27). Ungvari Z et al. (14) have shown that resveratrol decreases H_2O_2 levels in a cell-free assay. These findings support the view that it exhibits its antioxidant effect probably due to phenolic hydroxyl groups on its structure. Secondly, resveratrol has also been shown in some systems to increase the activity of certain antioxidant and cytoprotective enzymes (19,28).

Enzymatic sources of ROS are the mitochondrial electron transport chain, lipoxygenase, cyclooxygenase cytochrome P450s, xanthine oxidase NAD(P)H oxidase, uncoupled eNOS and other hemoproteins. These systems produce one electron reduction of molecular oxygen to form a superoxide anion. Under normal conditions, superoxide anion converts into hydrogen peroxide or is catalyzed by superoxide dismutase. Hydrogen peroxide

has three fates: it reacts with nitric oxide to form nitrogen dioxide anion; is catalysed by enzymes, such as glutathione peroxidase and catalase to form water and oxygen; or finally, in the presence of heavy metals, undergoes fenton reaction to form hydroxyl radical (29). Increased hydrogen peroxide in the cell leads to oxidative stress that may contribute to endothelial dysfunction (9).

In this study we used hydrogen peroxide as an oxidative injury model. However, we optimized the conditions at 750 μ M hydrogen peroxide concentration and 1-hour of incubation time, using the data obtained from our optimization work (Figure 2). Other investigators have used different hydrogen peroxide injury conditions in their studies. Wang et al. (30) in their work on the effect of icariin on the LDH release in in vitro human umbilical vein endothelial cells, have used a hydrogen peroxide concentration of 750 μ M and an incubation duration of 18 hours. Cortese et al.(31) in their study on the protective effect of zinc supplementation on the in vitro oxidative injury of rat aorta endothelial cells, have used a hydrogen peroxide concentration of 1mM and an incubation duration of 24 hours.

The criteria that we used in the selection of the optimal injury conditions was to be able to observe enough injury but not attain the maximum cell death, as observed in the above mentioned studies. Finally, our main concern in the selection of a hydrogen peroxide injury model was to attain a better standardization than some other in vitro oxidative stress injury models.

In this work, we showed that resveratrol decreased (at 10 and 50 μ M concentrations) oxidative stress-induced cell cell death. This protection was observed for 1, 12 and 24 hours preincubation periods. Similarly, Rubiolo et al.(17) have shown in primary rat hepatocytes that, resveratrol decreases cell death for up to 24 hours but this inhibition was not observed at 48 hours. The authors explained this difference with the hypothesis that resveratrol reacts with the oxidative stress-inducing agent (tert-butyl hydroperoxide), the remaining tert-butyl

hydroperoxide damaging the cell and increasing cell death at 48 hours. Brito P et al. (25) have shown that the antioxidant effect of resveratrol occurs via an increase in the intracellular GSH in the in vitro bovine aortic endothelial cells. Their results show that a long pre-incubation (14 hours) with resveratrol at 50 μ M protects the in vitro bovine aortic endothelial cells from peroxynitrite-mediated cell death.

In our study, we also tested the effect of resveratrol itself on HCAE cells. We used 100 μ M resveratrol as the highest concentration and we found that this concentration caused 15% liberation of LDH under in vitro conditions for human coronary artery endothelial cells. Rubiolo et al. (18) have also shown that, resveratrol (75 μ M) could be cytotoxic for their cells (at a percentage of 5% LDH liberation), when the primary rat hepatocytes were preincubated with this concentration of resveratrol. Even at this concentration, resveratrol has been observed to show less injury than the cells incubated only with tert-butyl hydroperoxide. The difference between our results and those of Rubiolo et al. (18) may be due to the difference in the cell lines as well as to the different agents used to create oxidative stress.

Increased formation of ROS enhances oxidative stress. ROS-induced oxidative stress has played a significant role in various pathological conditions including cardiovascular disease, cancer, neurological disorders, diabetes, ischemia/reperfusion injury and ageing (12). Our data showed that 10 and 50 μ M resveratrol decreased ROS generation, suggesting that the ROS scavenging capacity of resveratrol may be related to decreased cell death. Rubiolo et al. (17) have similarly shown that 50 μ M resveratrol decreased the fluorescence intensity in cells treated with only tert-butyl hydroperoxide.

Other investigations have shown that pretreatment with 25–100 μ M resveratrol for 72 hours decreased intracellular accumulation of reactive oxygen species in the in vitro rat aortic smooth muscle cells (13). Kode et al. (32) have shown that treatment of human primary small airway epithelial and human alveolar epithelial (A549) cells with a cigarette

smoke extract (CSE) enhanced generation of reactive oxygen species. Preincubation of the cells with 10 μ M resveratrol for 24 hours decreased CSE induced ROS production and this case may be related to free radical scavenging ability of resveratrol. Vieira de Almeida LM et al. (6) have shown that 50 μ M resveratrol protected in primary cortical astrocyte cultures from H₂O₂-induced oxidative stress (100 μ M H₂O₂ for 30 minutes) by inhibiting intracellular ROS production. Hou et al. (33) have shown that in human umbilical vein endothelial cells pretreated with *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* protected from hydrogen peroxide (2mM and for 5 hours) damage and inhibited the production of reactive oxygen species. It has been reported that chitosan oligosaccharides protected human umbilical vein endothelial cells from H₂O₂-induced oxidative stress. Viability loss was observed for the human umbilical vein endothelial cells exposed to 300 μ M H₂O₂ for 12 hours. This effect was associated by a decrease in intracellular reactive oxygen species (10).

As a conclusion, this study has clearly demonstrated the protective effect of resveratrol on the cell death of HCAE cells and its effect of lowering the formation of ROS by these cells, under the in vitro conditions used. These effects were found both in 10 and 50 μ M concentrations of resveratrol and for 1, 12 and 24 hours preincubation periods. These data on HCAE cells are presented for the first time to the scientific literature and provide interesting supportive evidence for study of pathophysiological phenomena related to HCAE cells. These findings may also suggest that the decreased cell death can be related to the ROS scavenging capacity of resveratrol. However, in addition to the direct antioxidant capacity, this protective effect of resveratrol could also be effectuated by resveratrol-induced intracellular antioxidant enzyme activities. Further studies need to be carried out in order to elucidate these mechanisms in the HCAE cells.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (number KB.SAG.047) from Dokuz Eylül University Committee for Scientific Research, Turkey. We acknowledge the support of the R-Lab (Research Laboratory) of Dokuz Eylül University Medical School for the use of the technical facilities.

References

1. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287(5): R1014–30.
2. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: Effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006; 40(10): 1054–1065.
3. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(8): 1983–1992.
4. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101(16): 1899–1906.
5. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149–1160.
6. Vieira de Almeida LM, Piñeiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Gonçalves CA. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res* 2008; 33(1): 8-15.
7. Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia–reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(10): 1311 –1322.

8. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004; 44(4): 381-386.
9. Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(12): 2206–2213.
10. Liu HT, Li WM, Xu G, Li XY, Bai XF, Wei P, Yu C, Du YG. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Res* 2009; 59(3): 167-75.
11. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria mediated-cell death. *Drug Metabolism Rev* 2007; 39(2-3): 443–455.
12. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
13. Li Y, Cao Z, Zhu H. 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 stres. *Pharmacol Res* 2006; 53(1): 6–15.
14. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinsky N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutsky A, Csiszar A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance articles in press. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(5): H2417-24.
15. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(5): 472–481.
16. De la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-1160.

17. Rubiolo JA, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against cell death induced by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(9): 606-612.
18. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2008; 591(1-3): 66–72.
19. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol* 2004; 489(1-2): 39-48.
20. Cao Z, Li Y. Chemical induction of cellular antioxidants affords marked protection against oxidative injury in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292(2): 50-57.
21. Wang B, Peng L, Zhu L, Ren P. Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 60: 36–40.
22. Shimizu SI, Nomoto M, Yamamoto T, Momose K. Reduction by NG-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 564-568.
23. Hernandez-Montes E, Pollard SE, Vauzour D, Jofre-Montseny L, Rota C, Rimbach G, Weinberg PD, Spencer JP. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 851–859.
24. Choi YJ, Jeong YJ, Lee YJ, Kwon HM, Kang YH. (-)Epigallocatechin Gallate and Quercetin Enhance Survival Signaling in Response to Oxidant-Induced Human Endothelial Apoptosis. *J Nut* 2005; 135: 707–713.

25. Brito PM, Mariano A, Almeida LA, Dinis TC. Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 2006; 164(3): 157-166.
26. Ha MK, Chung KY, Bang D, Park YK, Lee KH. Proteomic analysis of the proteins expressed by hydrogen peroxide treated cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Proteomics* 2005; 5(6): 1507–1519
27. López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43(3): 233–44.
28. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1997; 11(5): 287–313.
29. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 26 – 36.
30. Wang YK, Huang ZQ .Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Pharmacol Res* 2005; 52(2): 174-82.
31. Cortese MM, Suschek CV, Wetzel W, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V. Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(12): 2002-12.
32. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(3): L478–L488.
33. Hou YZ, Zhao GR, Yang J, Yuan YJ, Zhu GG, Hiltunen R. Protective effect of Ligusticum chuanxiong and Angelica sinensis on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life Sci* 2004; 75(14): 1775-86.

Figure Legends

Figure 1. LDH release to the medium for human coronary artery endothelial cells treated with resveratrol (10, 50 and 100 μ M for 1, 12 and 24 hours). Significant differences were found between control, 10, 50 μ M resveratrol and 100 μ M resveratrol groups. Results are expressed as Mean $\pm$ SD ($p=0.020$).

Figure 2. The effects of H_2O_2 on the LDH release. Cells were treated with various concentrations of H_2O_2 (100, 250, 500, 750 and 1000 μ M for 1, 3 and 6 hours) in HCAE cell cultures. LDH release was increased in all concentrations of H_2O_2 as compared to control in HCAE cells ($p=0.020$). Results are expressed as Mean $\pm$ SD. The experiments were repeated three times with similar results.

Figure 3. Protective effects of resveratrol on H_2O_2 -induced LDH release in HCAE cells. Cells were pretreated with different concentrations and for different time periods of resveratrol (10, 50, 100 μ M; 1, 12 and 24 hours). After preincubation, the medium was changed to a medium without resveratrol and 750 μ M H_2O_2 added. All results are expressed as Mean $\pm$ SD. For 1, 12 and 24 hours and 10 and 50 μ M resveratrol concentrations, $p=0.020$, as compared with the H_2O_2 group.

Figure 4. Effect of H_2O_2 on ROS formation. ROS formation was increased significantly in all concentrations of H_2O_2 as compared to control HCAE cells ($p=0.021$). Results are expressed as Mean $\pm$ SD.

Figure 5. Effect of resveratrol on H_2O_2 induced ROS formation. HCAE cells were pre-treated with various concentration of resveratrol for 24 h. After pre-treatment, the cells were exposed to 750 μ M H_2O_2 for 15, 60 minutes and 6 hours. Resveratrol decreased H_2O_2 induced ROS formation in HCAE cells. Statistically significant differences were found for all concentrations of resveratrol at all time periods compared with cells treated with H_2O_2 only ($p=0.021$). Results are expressed as Mean $\pm$ SD.