

TC
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROLÜN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE (H1299)
ANTIOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Öznur YURDAKUL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

TC
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE (H1299)
ANTIOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Öznur YURDAKUL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.02.0121.009 no'lu proje ile desteklenmiştir.

2017

TC
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE (H1299)
ANTIOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Öznur YURDAKUL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 16/6/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN



Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN



Yrd. Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ



ÖZET

RESVERATROLÜN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE (H1299) ANTIOKSIDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Öznur YURDAKUL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Haziran 2017, 87 sayfa

Bu çalışmada polifenolik bir bileşen olan resveratrolün insan akciğer kanseri hücre dizisi (H1299) üzerine antioksidan etkisi araştırılmıştır. Antioksidan etki hücrelerin resveratrol uygulaması sonrasında güçlü bir oksidan olan hidrojen perokside maruz bırakılarak MDA ve GSH düzeyleri ile Se-bağımlı-GPx, Se-bağımsız-GPx, GRx ve GST aktivitelerinin ölçülmesiyle ortaya konmuştur. İnsan embriyonik akciğer fibroblast hücreleri (MRC-5) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Resveratrolün ve H₂O₂'in hücreler üzerine sitotoksik etkisi ve resveratrolün H₂O₂ sitotoksitesine karşı koruyucu etkisi Hücre Canlılık Testi (Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti) kullanılarak ölçülmüştür. Resveratrolün membran üzerine etkileri, hücrelerde oluşan MDA miktarının floresan spektrofotometrede ölçülmesiyle gözlenmiştir. Kantitatif protein miktarları Bradford metodu ile ölçülmüştür. Glutasyon düzeyi ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik ölçümlerle gözlenmiştir.

H1299 hücrelerinin resveratrol ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakılması sonucunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 200 µM, 100 µM ve 50 µM olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin güçlü bir oksidan olan H₂O₂ ile 72 saat inkübasyonundan sonra IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri sırasıyla 300 µM ve 420 µM bulunmuştur. Resveratrolün IC₅₀'den daha düşük konsantrasyonları hücrelerde H₂O₂ sitotoksitesine karşı koruyucu (antioksidan) etki göstermiştir. En etkili koruyucu doz IC₃₀ olarak bulunmuştur. Hücreler IC₅₀ ve IC₇₀ resveratrol konsantrasyonları ile inkübe edildiklerinde MDA miktarı artmıştır. Bu da resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda membran hasarına neden olduğunu göstermiştir. IC₃₀ resveratrol ile ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra H₂O₂'e maruz bırakılan hücrelerde azalan MDA miktarları resveratrolün H₂O₂'e karşı membran koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

72 saat süreyle IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında resveratrole maruz bırakılan hücrelerde Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi, GST aktivitesi ve GRx aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede yüksek bulunmuştur. Resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir. H₂O₂

uygulamasý öncesinde IC₃₀ resveratrol ile ön uygulamaya maruz bırakılan hücrelerde ise bu değerler azalmıştır.

Resveratrol hücrelerde oksidan ve antioksidan etkiye sahiptir ve bu etkileri konsantrasyona bağlı olarak göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Antioksidan, glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz, H1299, MDA, MRC-5, resveratrol,

JÜRİ: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT EFFECT OF RESVERATROL ON HUMAN LUNG CANCER CELLS (H1299)

Öznur YURDAKUL

Master's Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

June 2017, 87 Pages

In this study, the antioxidant effects of resveratrol, which is a polyphenolic content, on human lung cancer cell line (H1299) were investigated. The antioxidant effect were displayed measurement of MDA and GSH level, and Se-GPx, non-Se-GPx, GST and GRx activities of the cells which were exposed to H₂O₂ which is a strong oxidant, after preincubated with resveratrol. The human embryonic lung fibroblast cells (MRC-5) were used as control cells.

The cytotoxic effect of resveratrol and H₂O₂ on cells and the protective effect of resveratrol (antioxidant) against H₂O₂ cytotoxicity were measured by using the Cell Viability Test (Cell Titer-Blue^R Cell viability test Kit). The effects of resveratrol on membrane were observed by fluorescence spectrophotometric measurement of the amount of MDA formed in the cells. Quantitative protein quantities were measured by the Bradford method. Glutathione level and activities of antioxidant enzymes were observed by spectrophotometric measurements.

As a result of 24, 48 and 72 hours incubation of the cells with resveratrol, the values of IC₅₀ were respectively calculated as 200 µM, 100 µM and 50 µM. IC₅₀ and IC₇₀ values were respectively found to be 300 µM and 420 µM after 72 hours of incubation of the cells with H₂O₂ which is a strong oxidant. Concentrations of resveratrol which are lower than IC₅₀ showed protective (antioxidant) effect against H₂O₂ cytotoxicity in cells. The most effective dose was found as IC₃₀. When the cells were incubated at IC₅₀ and IC₇₀ resveratrol concentrations, the amount of MDA increased. Consequently, this has shown that high concentrations of resveratrol cause membrane damage. The decreasing amount of MDA in the cells, which were exposed to H₂O₂ after pre-incubation with IC₃₀ resveratrol, has shown that resveratrol has a membrane protective (antioxidant) effect against H₂O₂.

Se-GPx, non-Se-GPx, GST and GRx activities of the cells exposed to resveratrol at IC₅₀ and IC₇₀ concentrations for 72 hours were found significantly higher than the control cells. Resveratrol has been shown to act as prooxidant at higher concentrations.

These activities were decreased in the cells, which were exposed to H₂O₂ after pre-incubation with IC₃₀ resveratrol.

Resveratrol had oxidant and antioxidant effects on the cells and it was showed those effects were depending on concentration.

KEY WORDS: Antioxidant, glutathione, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, H1299, MRC-5, MDA Resveratrol.

Jury: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN (Supervisor)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ

ÖNSÖZ

Akciğer kanseri dünyada en sık görülen kanserlerden biridir. Türkiye’de de akciğer kanseri en sık görülen ve ölüm nedeni olan kanserlerin başında gelmektedir. Bu yüzden kanser tedavisi çalışmalarında serbest radikallerin ve oksidatif stres kaynaklarının belirlenmesi, rol oynadıkları reaksiyonların ortaya konması ve serbest radikallere karşı oluşan savunma mekanizmalarının aydınlatılması, yeni tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Doğada doğal olarak bulunan fitokimyasallar son yıllarda birçok araştırmanın odağı olmuştur. Fitokimyasallar arasında ise polifenolik bileşikler antioksidan özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir.

Resveratrol kırmızı üzüm başta olmak üzere birçok sebze ve meyvede bulunan doğal bir polifenolik bileşiktir ve antioksidan özelliğe sahiptir. Fenolik antioksidanların, antioksidan aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda etkinliğini yitirerek pro-oksidan yapı kazanabilmektedir. Antioksidan olarak görev yaparken diğer oksidan ajanlara karşı hücre zarını koruyabilir ya da yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında pro-oksidan gibi davranarak membran oksidasyonuna neden olabilir ve hücrelerde hasar meydana getirebilirler. Antioksidan savunma mekanizmasında yer alan glutatyon düzeyini ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak ya da azaltarak da pro-oksidan ya da antioksidan özellik gösterebilirler. Birçok in vitro çalışmada resveratrolün anti-inflamatuar, antikanserojenik, kemoprotektif ve antioksidan gibi farklı etkileri tanımlanmıştır. Ancak resveratrolün kanser hücrelerinde anti/pro-oksidan özelliğine dair yapılan çalışmalar az sayıdadır. En yaygın kanser türlerinden H1299 insan akciğer kanserinde doza bağlı olarak hücre membranı üzerine etkileri, GSH miktarı ve GST, Se-bağımlı-GPx, Se-bağımsız-GPx ve glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi ile ilgili literatür bilgisine rastlanmamaktadır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların resveratrolün pro-oksidan/oksidan özelliği ile yeni antikanser ilaçlarının, antioksidan özelliğiyle ise yeni antioksidan ilaçlarının üretilmesinde doğal kaynak olarak önerilmesine yardımcı olmasını dilerim.

Bana bu çalışmada araştırma olanağı sağlayan ve çalışmalarım aşamasında önerileri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun Özkan’a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Bilgilerinden yararlandığım ve çalışmalarım sırasında yardımcı olan Dr. Ayşe ERDOĞAN’a, çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi Yeşim POLAT’a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarımın son aşamasında yardıma koştan lisans öğrencisi Hüseyin GİRİŞKEN’e teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans öğrenimim boyunca her daim yanımda olan bölüm sekreterimiz Selda ÇİVRİL’e, sabırla tezimi bitirmemi bekleyen her konuda anlayış gösteren ve destek olan tüm arkadaşlarıma ve bana her konuda destek olan ve maddi manevi fedakarlıklarını esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım. Bu tezi, her zaman başarılarımla gurur duyan ancak bu tezin bitmesini görmeye ömrü yetmeyen sevgili dedem Mustafa YAVUZ’a ithaf ediyorum ve bana inandığı için kendisine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Projemi destekleyen (2014.02.0121.009 no'lu proje) Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	2
2.1. Akciğer Kanseri	2
2.1.1 Akciğer Kanserinin Etiyolojisi	5
2.1.2. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi	7
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	9
2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	10
2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	11
2.2.3. Hidroksil Radikali	12
2.2.4. Peroksil Radikali	12
2.3. Oksidatif Stres	12
2.4. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehid	14
2.5. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemi	15
2.5.1. Glutasyon	16
2.5.2. Glutasyon Peroksidaz	18
2.5.3. Glutasyon S Transferaz	19
2.5.4. Glutasyon Redüktaz	19
2.6. Resveratrol	20
2.6.1. Resveratrolün Biyosentezi ve Metabolizması	21
2.6.2. Resveratrolün Antikanser Etkileri	22

2.6.3. Resveratrolün Antioksidan Etkileri	23
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Dondurulması	26
3.2. Sitotoksite Testi	26
3.3. Hücre Süpernatantının Hazırlanması	28
3.4. Malondealdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi	28
3.5. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	29
3.6. Antioksidan Enzimler ve Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü	29
3.6.1. Selenyum-Bağımlı ve Selenyum-Bağımsız Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	29
3.6.2. Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin Ölçülmesi	30
3.6.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi	30
3.6.4. Glutasyon Miktarının Ölçülmesi	31
3.7. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. Resveratrolün ve H1299 ve MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	32
4.1. 1. Resveratrolün H1299 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	32
4.1.2. Resveratrolün MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	34
4.2. Hidrojen Peroksitin H1299 ve MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	37
4.2.1. Hidrojen Peroksitin H1299 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	37
4.2.2. Hidrojen Peroksitin MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	39
4.3. Resveratrolün Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi	40

4.3.1. Resveratrolün H1299 Hücreleri Üzerine Antioksidan (Koruyucu)	
Etkilerinin Belirlenmesi	40
4.3.2. Resveratrolün MRC-5 Hücreleri Üzerine Antioksidan (Koruyucu)	
Etkilerinin Belirlenmesi	42
4.4. Resveratrolün Hücre Membranı Üzerine Etkisi	44
4.5. Resveratrolün Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi	48
4.6. Resveratrolün Se-bağımlı ve Se-bağımsız Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	
Üzerine Etkisi	50
4.7. Resveratrolün Glutasyon S-Transferaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	55
4.8. Resveratrolün Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	58
5.TARTIŞMA	62
6.SONUÇ	71
7.KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
CO ₂	Karbondioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
K ₂ HPO ₄	Potasyum Di fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum Mono Fosfat
.L	Lipit radikali
μ l	Mikrolitre
μ U	Mikroünite
μ M	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mU	Miliünite
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
OH.	Hidroksil radikali
O ₃	Ozon
ROO .	Peroksil radikali
°C	Santigrat Derece
O ₂	Singlet oksijen
O ₂ .	Süperoksit radikali
U	Ünite
%	Yüzde

Kısaltmalar

ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BAX	Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	B-Hücre Lösemi 2
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	Katalaz
C6	Astroglial Hücre Dizisi
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz Proteini
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
C-Myc	Myelosit Onkogen Homoloğu
Cys	Sistein
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ERK 1/2	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Glu	Glutamat
Gly	Glisin
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Oksitlenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
GTP	Guanozin Tri Fosfat
HBE	İnsan Bronşiyal Epitelyum Hücre Dizisi
H520	İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Dizisi
H1299	İnsan Akciğer Kanseri Hücreleri

H9C2	İnsan Kardiyomiyosit Hücresi
HepG2	Hepatoma Hücre Dizisi
H-RAS	Harvey Rat Sarkoma Virüsü Onkogeni
H838	İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Dizisi
HT-29	İnsan Kolon Kanseri Hücre Dizisi
Huh7	İnsan Karaciğer Epitel Hücre Dizisi
IC ₅	Hücrelerin %5'ini Öldüren Konsatrasyon
IC ₁₀	Hücrelerin %10'unu Öldüren Konsatrasyon
IC ₂₀	Hücrelerin %20'sini Öldüren Konsatrasyon
IC ₃₀	Hücrelerin %30'unu Öldüren Konsatrasyon
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sini Öldüren Konsatrasyon
IC ₇₀	Hücrelerin %70'ini Öldüren Konsatrasyon
IL	İnterlökin
JB6	Fare Deri Epitel Hücresi
K562	İnsan Myolejen Lösemi Hücresi
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Kanseri
K-RAS	Kirsten Rat Sarcoma Onkogeni
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
L-Myc	Myelosit Onkogen Homoloğu
MCF-7	İnsan Meme Kanseri hücresi
MDA	Malondialdehit
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisi
MRC-5	İnsan Akciğer Fibroblast Hücresi
Myc	Miyelositomozis Proto-onkogeni
NADH	Nikodinamid Adenin Dinükleotid'in İndirgenmiş Formu
NADPH	Nikodinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NFkB	Nükleer Faktör Kappa Beta
N-Myc	Nöroblastoma Miyelosit Onkogeni
N-RAS	Nöroblastoma Rat Sarkoma Viral Onkogeni
Nrf 2	Nükleer Faktör Eritroid 2'nin Transkripsiyon Faktörü
NSC	Nöral Kök Hücre Dizisi
P450	Sitokrom 450 Proteini
p53	Tümör Protein 53
PKC	Protein Kinaz C
RAW 264.7	Lösemi Virüsü ile Transforme Olmuş Makrofaj Hücre
RAS	Rat Sarkoma Onkogeni
Rb	Retinoblastoma
RKO	İnsan Kolon Kanseri Hücre Dizisi
RNF20	Ring Finger Proteini
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen türleri
Se-bağımsız-GPx	Selenyum Bağımsız Glutasyon Peroksidaz
Se-bağımlı-GPx	Selenyuma Bağımlı Glutasyon Peroksidaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
TIGAR	TP53 İndüklenmiş Glikoliz ve Apoptosis Regülatörü
TNF α	Tümör Nekrozu Faktörü alfa
T24	Kan Kanseri Hücre Dizisi
VERO	Böbrek Epitel Hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları	2
Şekil 2.2.	Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları	2
Şekil 2.3.	Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları	3
Şekil 2.4.	Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları	3
Şekil 2.5.	Sigara içiciliğinin akciğer kanserine neden olan patogenezi	6
Şekil 2.6.	Serbest radikaller ve oksidatif stresin yol açtığı hasarlar	13
Şekil 2.7.	MDA'nın kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991)	15
Şekil 2.8.	Redükte ve okside glutatyonun yapısı	17
Şekil 2.9.	Glutatyon redoks döngüsü	18
Şekil 2.10.	Resveratrolün cis ve trans izomerleri	20
Şekil 2.11.	Resveratrolün biyosentezi	22
Şekil 4.1.	H1299 hücrelerinde artan resveratrol konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığı	34
Şekil 4.2.	MRC-5 hücrelerinde artan resveratrol konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığı	36
Şekil 4.3.	H ₂ O ₂ 'in H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	38
Şekil 4.4.	H ₂ O ₂ 'nin MRC-5 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	39
Şekil 4.5.	H ₂ O ₂ sitotoksitesine karşı farklı konsantrasyonlarda Resveratrolün (<IC ₅₀) H1299 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi	42
Şekil 4.6.	H ₂ O ₂ sitotoksitesine karşı farklı konsantrasyonlarda Resveratrolün (<IC ₅₀) MRC-5 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi	43

Şekil 4.7.	MDA standart grafiği	44
Şekil 4.8.	BSA standart grafiği	45
Şekil 4.9.	Resveratrole maruz bırakılan H1299 hücrelerinde MDA miktarı	46
Şekil 4.10.	Resveratrole maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde MDA miktarı	46
Şekil 4.11.	Resveratrolün H1299 hücrelerinde glutatyon miktarına etkisi	48
Şekil 4.12.	Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde glutatyon miktarına etkisi	49
Şekil 4.13.	Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx aktivitesi üzerine etkisi	51
Şekil 4.14.	Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkisi	51
Şekil 4.15.	Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx aktivitesi üzerine etkisi	53
Şekil 4.16.	Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerin etkisi.....	53
Şekil 4.17.	Resveratrolün H1299 hücrelerinde GST aktivitesi üzerine etkisi	55
Şekil 4.18.	Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde GST aktivitesi üzerine etkisi	56
Şekil 4.19.	Resveratrolün H1299 hücrelerinde GRx aktivitesi üzerine etkisi	59
Şekil 4.20.	Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde G-Rx aktivitesi üzerine etkisi	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Türkiye’de ölüm nedenleri dağılımı	4
Çizelge 2.2.	Türkiye’de kanser (tümör) kaynaklı ölümlerin alt gruplara göre dağılımı	4
Çizelge 2.3.	Akciğer kanseri riskini arttıran mesleki karsinojenler	7
Çizelge 2.4.	Reaktif oksijen türleri	10
Çizelge 2.5.	Resveratrolün etki ettiği oksidan enzimler ve antioksidanlar	24
Çizelge 3.1.	Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde uygulanan konsantrasyonları	27
Çizelge 3.2.	Hidrojen peroksitin H1299 hücrelerinde uygulanan konsantrasyonları	27
Çizelge 4.1.	Resveratrol konsantrasyonlarının H1299 hücre dizisi üzerine Sitotoksik etkisi	33
Çizelge 4.2.	Resveratrol konsantrasyonlarının MRC-5 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi	35
Çizelge 4.3.	Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücre dizilerinde hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri	36
Çizelge 4.4.	H_2O_2 konsantrasyonlarının H1299 hücre dizisine sitotoksik etkisi	38
Çizelge 4.5.	H_2O_2 konsantrasyonlarının MRC-5 hücre dizisine sitotoksik etkisi	40
Çizelge 4.6.	H_2O_2 sitotoksisitesine karşı Resveratrolün ($<IC_{50}$) H1299 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi	41
Çizelge 4.7.	H_2O_2 sitotoksisitesine karşı Resveratrolün ($<IC_{50}$) MRC-5 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi	43
Çizelge 4.8.	Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde hücre membranı üzerine etkileri	47
Çizelge 4.9.	Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde glutatyon miktarı	

üzerine etkileri.....	50
Çizelge 4.10. Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkileri	52
Çizelge 4.11. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkileri	54
Çizelge 4.12. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	57
Çizelge 4.13. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde GRx aktivitesi üzerine etkisi	60

1.GİRİŞ

Akciğer kanseri tüm dünyada kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanserlerin başında gelmektedir. Tanı ve tedavisindeki gelişmelere rağmen en fazla ölüme yol açan kanserlerden biri durumundadır (Müsellim 2007). Ülkemizde tüm yaş grupları dikkate alındığında görülen kanserler arasında akciğer kanseri erkeklerde %21.9 ile en çok görülen kanser türüdür. Kadınlarda ise akciğer kanserinin görülme oranı %5.3'tür (www.kanser.gov.tr). Akciğer kanserinin erken tanısı ya da ileriki aşamalarda alt tipinin belirlenmesi daha doğru bir tedavi uygulanmasını sağlayabilir. Ancak, beslenmeye dikkat ederek özellikle antioksidan içerikli gıdaları bilinçli tüketerek kanser riski de azaltılabilir.

Antioksidanlar serbest radikallerle etkileşerek onları etkisiz hale getirir ve hasar yaratmasına engel olurlar. Aynı zamanda serbest radikal süpürücü olarak bilinirler. Serbest radikalleri etkisizleştirmek için vücut bazı endojen antioksidanlar üretir. Ancak beslenme ile birlikte alınan ekzojen antioksidanlar da vardır. Meyveler, sebzeler ve tahıllar zengin antioksidan kaynağıdır. Bazıları da beslenmeye tamamlayıcı olarak yararlıdır (Bouyaed ve Bohn 2010). Beslenme ile alınan antioksidanlar özellikle beta karoten, likopen, vitamin A, vitamin C ve vitamin E içerir. Selenyum mineralinin genellikle beslenmeyle alınan antioksidan olduğu düşünülür. Ancak, antioksidan etkisi selenyumun kendisinden değil antioksidan aktivite gösteren proteinlerin temel bileşeni olmasından kaynaklanır (Davis vd 2012). Bitkilerde bulunan polifenolik bileşenler zengin antioksidan kaynağıdır ve son yıllarda polifenolik bileşenlerle ilgili çalışmalar artarak sürmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla, bitkilerden elde edilen antioksidan maddelerin anti-/pro-oksidan ve toksik özelliklerinin ortaya konması insanlar da dâhil pek çok canlı grubu için güvenli olmadıklarını göstermektedir. Canlılarda bulunan antioksidan mekanizma enzimleri belirli düzeyi aşmış oksidanlara doğrudan etki edip onları inaktif hale getirebilmektedir (Loizzo vd 2009).

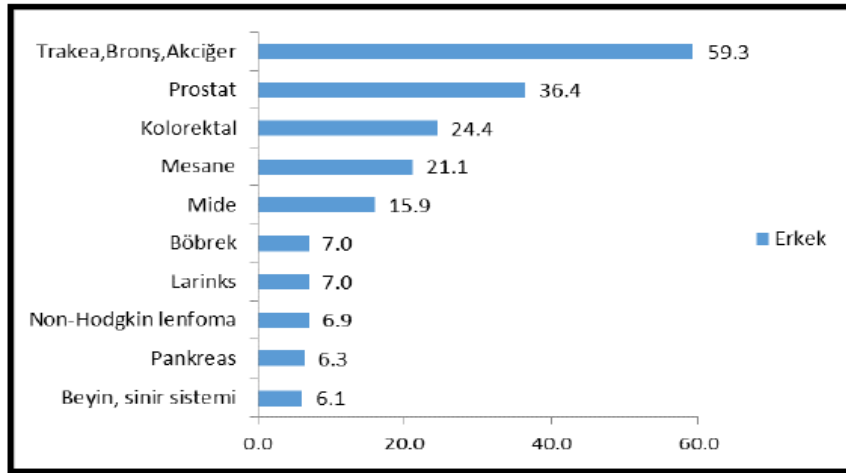
Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) siyah üzüm başta olmak üzere, yer fıstığı ve ananas gibi bitkilerde bulunan, bitkinin soğuk havaya ve mantar enfeksiyonlarına karşı kendini korumak için ürettiği doğal bir polifenolik bileşendir.

Çalışmamızda, polifenolik bir bileşen olan resveratrolün H1299 insan akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisine bakılarak IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlara maruz bırakılarak, glutatyon (GSH) miktarı, selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-GPx), selenyum-bağımsız glutatyon peroksidaz (Se-bağımsız-GPx), glutatyon redüktaz (GRx) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerine bakılarak resveratrolün antioksidan mekanizma üzerine etkisi, membran hasarı sonucu oluşan malondealdehit (MDA) miktarı ölçülerek de membran üzerine prooksidan özelliği değerlendirilmiştir. Bileşenin antioksidan özelliğini ortaya koymak için güçlü bir oksidan olan hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı resveratrolün (<IC₅₀) bu parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu sonuçlara göre bileşenin prooksidan ve antioksidan konsantrasyonları, hasar ve koruyuculuk açısından değerlendirilerek literatüre bilgi sağlanması ve yeni fitoterapi çalışmalarına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda aynı parametreler MRC-5 insan akciğer fibroblast hücre dizisinde de çalışılarak resveratrolün sağlıklı hücrelerdeki etkisi incelenmiştir.

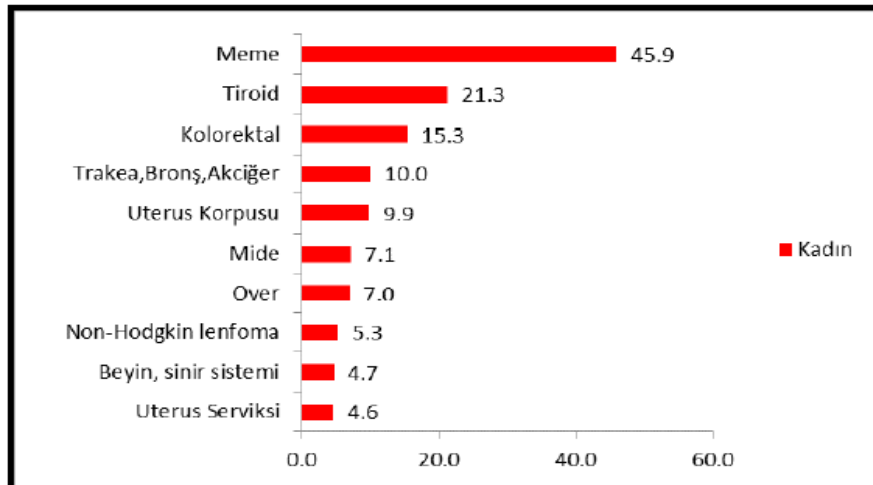
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Akciğer Kanseri

Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanserinden ölmektedir. Ortalama yaşam süresi 8 aydır ve 5 yıllık sağ kalım oranı %15'tir (Müsellim 2007). T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2016 Türkiye Kanser İstatistikleri Raporunda yayınlanan 2013 yılı verilerine göre akciğer kanserinin de içinde yer aldığı ve cinsiyetlere göre en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları Şekil 2.1. ve Şekil 2.2.'de verilmiştir (www.kanser.gov.tr).

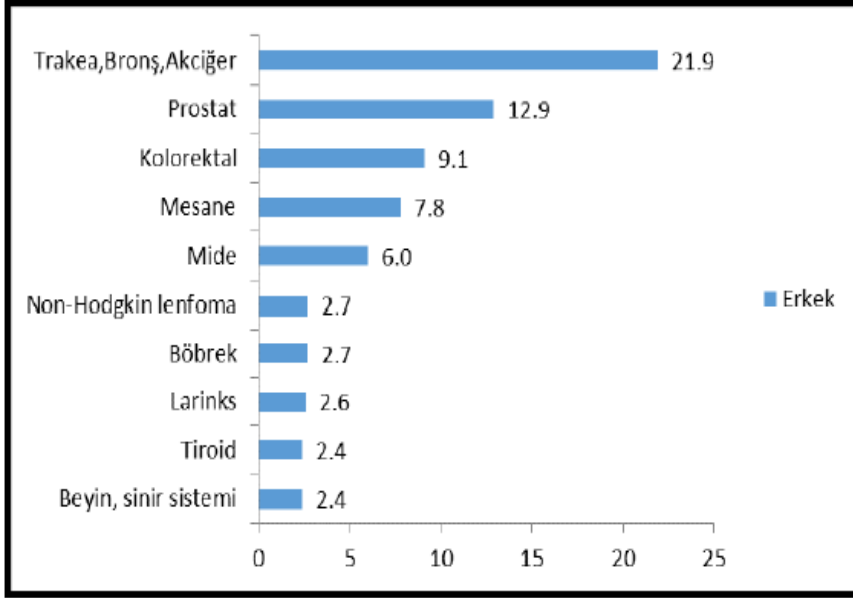


Şekil 2.1. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2013) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)

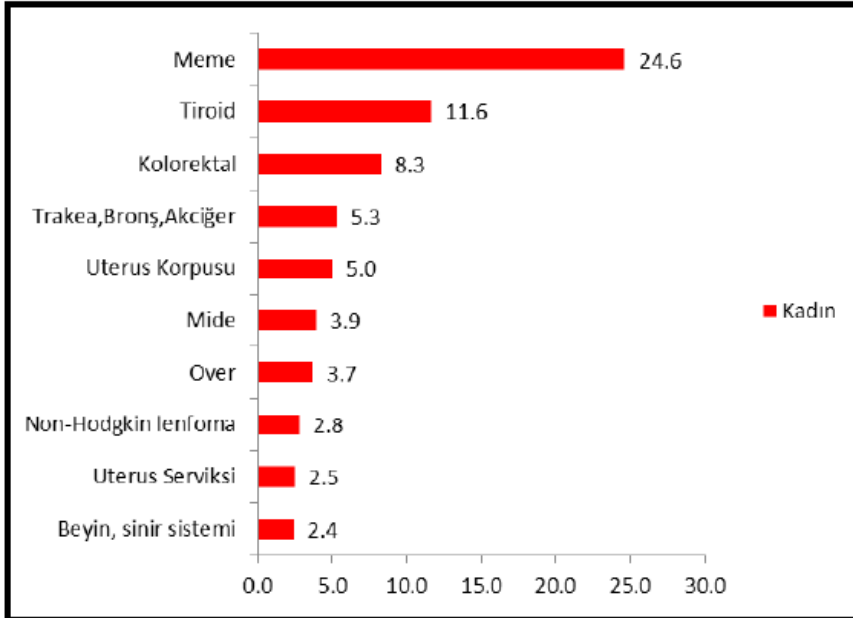


Şekil 2.2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2013) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide)

Ülkemizde tüm yaş grupları dikkate alındığında görülen kanserler arasında akciğer kanserinin erkeklerde ve kadınlarda görülme oranları Şekil 2.3 ve Şekil 2.4' te verilmiştir.



Şekil 2.3. Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2013)



Şekil 2.4. Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2013)

Türkiye İstatistik Kurumunun 2014 verilerine göre ise ülkemizde ölüm nedeni olarak %40.4 ile dolaşım sistemi hastalıklarından sonra ikinci sırada %20.7 ile kanserler yer almaktadır. Kanser ölümleri dikkate alındığında ise akciğer kanseri %31.1 ile ilk sıradadır (www.tuik.gov.tr) (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Türkiye’de ölüm nedenleri dağılımı

	2013		2014	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Toplam	360 873	100,0	375 291	100,0
Dolaşım sistemi hastalıkları	143 084	39,6	151 696	40,4
İyi huylu ve kötü huylu tümörler (malign ve benign neoplazmlar)	76 534	21,2	77 587	20,7
Solunum sistemi hastalıkları	35 364	9,8	40 258	10,7
Endokrin (iç salgı bezi), beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	20 095	5,6	19 288	5,1
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	20 409	5,7	16 018	4,3
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	14 708	4,1	16 517	4,4
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	50 679	14,0	53 927	14,4

Çizelge 2.2. Türkiye’de kanser (tümör) kaynaklı ölümlerin alt gruplara göre dağılımı

	2013		2014	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Kötü huylu tümörler (malign neoplazmlar)	74 906	100,0	75 993	100,0
Gırtlak ve soluk borusu / bronş / akciğerin kötü huylu tümörü	23 427	31,3	23 642	31,1
Midenin kötü huylu tümörü	6 639	8,9	6 824	9,0
Lenfoid ve hematopoetik kötü huylu tümör	6 151	8,2	6 358	8,4
Kolonun kötü huylu tümörü	5 148	6,9	5 490	7,2
Pankreasın kötü huylu tümörü	4 390	5,9	4 309	5,7
Diğer	29 151	38,9	29 370	38,6

Gelişmiş ülkelerde geçmiş yıllarda kanserden ölümlerin %34'ünden akciğer kanserleri sorumlu iken, günümüzde %28'inden sorumludur. Bu azalmaların nedeni

gelişmiş ülkelerde sigara kullanımında belirgin azalma ve sigara içeriğinde yapılan değişikliklere bağlanmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde sigara kullanımında azalma olmaması ve aksine artması sonucunda hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser ölümleri içinde önemli yerini korumakta ve belirgin artış gözlenmektedir (Akkoçlu 2006, Jemal vd 2011, WHO 2004, 2008).

Akciğer kanserinin histopatolojisine bakıldığında küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki alt tipi vardır. Adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinomlar genel olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri diye gruplandırılmaktadır (Parkin vd 2004). Akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'i küçük hücreli akciğer kanseri, %85'i küçük hücreli dışı kanserlerdir (Mason ve Bousey 2000).

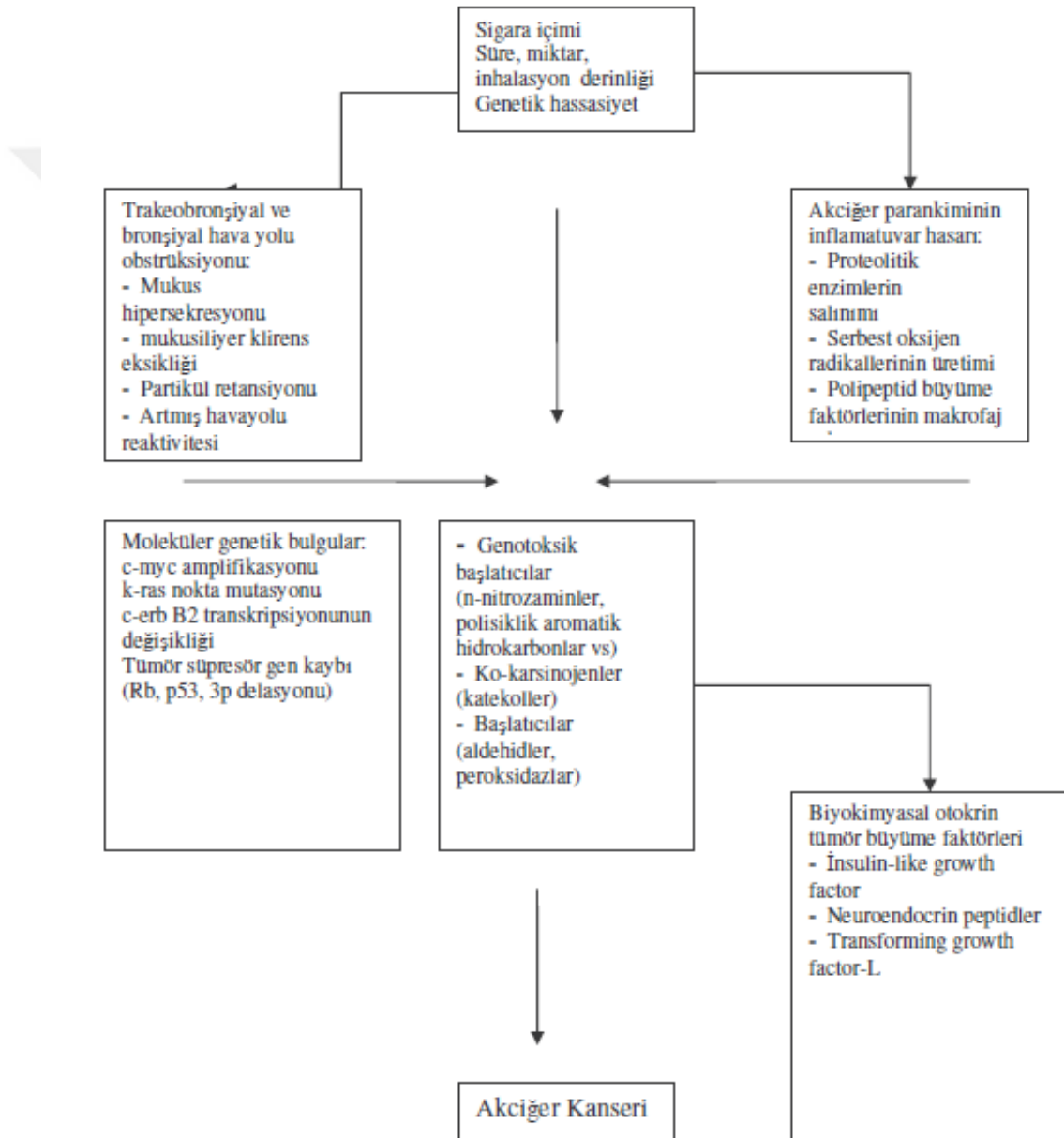
2.1.1 Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Akciğer kanseri, etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. Sigara, hava kirliliği gibi çevresel faktörler, mesleki karsinojenler, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler başlıca etiyojik faktörlerdir (Müsellim 2007).

Tüm kanserler arasında sigara ile ilişkisi en net belirlenmiş olanı akciğer kanseridir. Sigara kullananlarda sigara içme süresi, başlama yaşı, içilen sigara tipi ve günlük tüketilen sigara sayısı, bronş karsinomu gelişme riskini etkilemektedir. Sigara kullanımı arttıkça göreceli risk belirgin olarak artış göstermektedir (Demir 2008). Sigara içmeye devam edenler ile sigarayı bırakmış olanlar karşılaştırıldığında bırakmış olanlarda akciğer kanseri gelişme riskinin azaldığı görülmüştür. Çalışmalara göre, cinsiyet ve kullanılan tütün tipinden bağımsız olarak, sigaranın bırakılması akciğer kanseri gelişme riskini azaltmaktadır ve akciğer kanserinin tüm histolojik tipleri için geçerlidir (Uçar 2010). Sigara ve sigara dumanı 6000 kadar kimyasal maddeden oluşmaktadır ve bunlardan 55 kadarının karsinojen olduğu bilinmektedir (Köktürk 2003, Uçar 2007). Sigara içiciliğin akciğer kanserine neden olan patogenezi Şekil 2.5'de özetlenmiştir.

Akciğer kanseri gelişiminde, genetik aktarım, sigaradan sonra en önemli risk faktörüdür. Sitokrom P-450, glutatyon transferaz, aril-hidrokarbon hidroksilaz sistemlerinin hepsi sigara dumanında bulunan karsinojen maddelerin inaktivasyonu ve metabolik detoksifikasyonundan sorumludur. Bu enzim sistemlerinin karsinojenlere karşı az veya daha fazla başarılı olmasının genetik aktarım ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Sellers vd 1990, Hecht 1999, Bouchardy 2001). Onkogenler, tümör supressör genler, DNA tamirinden sorumlu olan genlerde meydana gelen bazı değişikliklerin akciğer kanseri ile olan ilişkisi yapılan moleküler çalışmalarla ortaya konulmuştur (Economou vd 1994, Alberg vd 2005). Genetik faktörlere ek olarak geçirilmiş hastalıklar da akciğer kanserine eğilimi artırabilir. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) başta olmak üzere fibrozisle seyreden solunum yetmezliği hastalıkları akciğer kanseri riskini artırabilir (Uçar 2010)

Akciğer kanserinin etiyolojisinde hava kirliliği ve mesleki maruziyet de önemli bir yer tutar. Akciğer kanserinin çok sayıda meslek alanında olduğu gözlenmiştir. Özellikle katran ve is içeren ortamlarda çalışan işçilerde risk daha fazladır. Asbest, arsenik, krom, nikel gibi çok sayıda metale mesleki maruziyet durumunda da yine artmış risk mevcuttur. Çok sayıda vaka kontrol ve kohort çalışmasında ise dizel yakıt atıklarına maruziyetle akciğer kanseri arasında zayıf bir ilişkisi bulunduğu gösterilmiştir. Silika maruziyetinin ise tartışmalı olmakla beraber bir meta-analizde iki kat risk artışına yol açtığı bildirilmiştir. Sigara içimi bazı mesleki akciğer karsinojenlerinin etkisini arttırmaktadır (Uçar 2010). Akciğer kanseri riskini arttıran mesleki karsinojenler Çizelge 2.3’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Sigara içiciliğinin akciğer kanserine neden olan patogenezi (Akyüz 2006)

Çizelge 2.3. Akciğer kanseri riskini arttıran mesleki karsinojenler (Ertürk 2006)

Kanıtlanmış	Şüpheli
Arsenik	Akrilonitril
Asbest	Berilyum
Bisklorometil eter	Vinil klorid
Krom	Silika
Hardal gazı	Demir cevheri
Nikel	Odun tozu
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	
İyonize radyasyon	

Beslenme de kanser gelişiminde önemli bir faktördür. Ancak beslenme hem koruyucu hem de zarar verici etkilere sahip olabilir. Sebze ve meyveler özellikle antioksidan ve vitamin içerikleriyle koruyucu gıdalardır. Bilinen en önemli koruyucu beta karotendir. Elma, greyfurt, kırmızı şarap, domates, havuç, brokoli ve çayda bulunan flavonoidlerin akciğer kanserine karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir. Zeytinyağı, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinden zengin diyetin akciğer kanserini azalttığı tespit edilmiştir. Sigara içiminin diyetle alınan vitaminlerin seviyesini özellikle de vitamin C'nin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Sigara içenlerde ve içmeyenlerde, taze sebze ve meyve tüketiminin akciğer kanseri riskini her iki cinsiyette azalttığı gösterilmiştir. Yeşil çayın kanserden koruyucu özelliği olduğu ve metastazı önlediği, ancak doymuş yağlardan ve kolesterolden zengin diyetin akciğer kanseri riskini arttırdığı da ileri sürülmüştür. (Uçar 2007).

2.1.2. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi

Karsinogenezin temelini genetik hasar oluşturur. Genetik hasarın asıl hedefi olan genler; büyümeyi uyaran protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden kanser baskılayıcı genler ve hasara uğrayan DNA'nın onarımını düzenleyen genlerdir. Son zamanlarda akciğer kanserinin moleküler biyolojisindeki gelişmeler, özellikle belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi ve özel ajanlarla hedefe yönelik tedavilere yönlendirmektedir.

Akciğer karsinogenezinde rol alan moleküler mekanizmalar şöyle sıralanabilir;

- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu,
- Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı,
- Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler,
- DNA onarımında görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler

- Büyüme faktörleri ile reseptörlerine ilişkin değişiklikler (Fong ve Minna 2002).

Bir proto-onkogen ailesi olan RAS (H-RAS, K-RAS, N-RAS), plazma membran proteinlerini kodlar ve nokta mutasyonlarla GTPase aktivitesini değiştirip sürekli sinyal aktiviteleri ortaya çıkararak malin dönüşüme sebep olurlar. Bu genler akciğer kanserinin bir kısmında aktive edilirler. RAS mutasyonları sürekli hücre bölünmesi için gereken uygunsuz, uzamış uyarılara yol açar (Jacopson 1999, Hastürk 2000). K-RAS mutasyonu en sık görüleni olup, % 15-50 oranında KHDAK gelişiminde rol oynamaktadır. K-RAS mutasyonu sağ kalımda azalma, erken nüks ve kötü prognozla ilişkilidir (Köktürk 2003, Uçar 2010). RAS sinyal sistemi sonunda myc gibi nükleer proto-onkogen ürünlerini aktive eder. Myc ailesi, C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşur ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olup DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Myc genleri, sinyal artışı ve transkripsiyonel bozukluklar ile onkogen haline dönüşmektedir. KHAK'lerinin % 18-31'i, KHDAK'lerinin ise %8-20'sinde myc aktivasyonu görülmektedir (Mabry 1998, Hussain ve Harris 2000, Köktürk 2003, Uçar 2010). C-myc'in, tümör büyüme hızında artış ve sağkalımda kısalma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Mabry 1998, Hussain ve Harris 2000).

Retinoblastoma geni (Rb) ilk bulunan tümör supresör gendir ve hücrel farklılaşmada önemli bir role sahiptir (Fong vd. 1999). Rb ailesi, hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücre bölünmesini kontrol eder ve bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanır. Rb protein yokluğu KHAK'lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK'lerinin sadece %10-30'unda görülmektedir (Fong ve Minna 2002, Uçar 2010). BCL-2 hücrelerin apoptozisinin önlenmesiyle kemoterapi yanıtının belirlenmesinde rol oynar. BAX, BCL-2 ile ilişkili bir protein olup tümör baskılayıcı etki göstermektedir. BCL-2/BAX oranı, hücrenin apoptotik duyarlılığını belirlemektedir (Hastürk 2000, Uçar 2010). Tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün mutasyonu da tüm kanserlerin %50'sinde görülürken, KHAK'lerinin %90'ında, yassı hücreli akciğer kanserlerinin %65'inde, büyük hücreli kanserlerin %60'ında ve adenokarsinomların %33'ünde gösterilmiştir (Hussain ve Harris 2000). p53'ün fonksiyon bozukluğu genetik olarak hasarlı hücrenin uygunsuzca yaşamasına, pek çok mutasyonun toplanmasına ve bir kanser hücresinin gelişimine olanak sağlar. Akciğer kanserlerindeki p53 mutasyonları sigara içimi ile ilişkilidir (Hastürk 2000).

Ökaryotik hücre siklusu G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. Karsinogenez sırasında G1 fazında koordinasyon noktasındaki değişiklikler kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanır. Hücre siklus regülasyonunda siklin bağımlı protein kinazlar (CDK), siklinler ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) hücre içi 3 önemli proteindir (Özbaşıoğlu 2013). Ayrıca birçok büyüme faktörü ve bunlara ait reseptörler normal akciğer dokusu ve kanser dokusu tarafından üretilmektedir. Dengeli büyüme için karşılıklı düzenleyici sistemler bir arada bulunur. Kanser hücrelerinde bu denge bozulmuştur. Bu büyüme faktörlerine epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforming growth factor- α (TGF- α) örnek verilebilir (Köktürk 2003). DNA tamiri de normal hücre siklusu için esastır. Hatalı DNA, karsinogenez gelişiminde önemli rol oynar. DNA tamirinde görevli genler başlıca kromozom 3p üzerinde yerleşmişlerdir. Bu nedenle kromozom 3p kayıpları akciğer kanseri gelişimini 14 kat arttırmaktadır. 3p, 5q, 13q, ve 17p konumlarında meydana gelen kromozom hasarları, özellikle küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere akciğer kanserlerinde görülür (Giles 1996).

2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Bitkiler güneş enerjisini redükte moleküllere dönüştürmektedir. Memeliler ise bu redükte molekülleri birçok biyokimyasal basamak sonucunda CO_2 ve H_2O 'ya indirgeyerek enerjiyi kullanılabilir ve depo edilebilir hale getirirler. Yüksek enerjili ATP (Adenozin trifosfat) gibi fosfat bileşiklerine dönüştürürler. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonları olup; okside edilebilir moleküllerden oksijene elektronların transferini içermektedir. Bir maddede elektronların kaybedilmesine oksidasyon, diğer bir maddenin ise elektronları almasına redüksiyon adı verilmektedir. Redoks reaksiyonları sadece elektronların transferi ile değil aynı zamanda kovalent bağlarda elektron yörüngelerinin değişmesi ile de meydana gelmektedir. Okside olmuş ajanlar ise oldukça elektrofilik oldukları için, diğer moleküllerden elektron alabilmekte ve böylece serbest radikalleri meydana getirmektedirler (Arasimowicz 2009).

Atom ve moleküllerin yapılarındaki elektronlar genelde çift konumdadır. Bir atom veya molekül bir orbital üzerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyorsa radikal olarak tanımlanır. Normalde, kimyasal olarak bağlanmış iki veya daha fazla elektron içeren moleküllerin elektron düzeni, stabilitelerini belirler. Eğer elektronun eşi yoksa molekül son derece reaktif davranır ve stabil konuma geçmek için bir elektronla çift oluşturma eğilimi gösterir. Elektron çiftleri arasındaki bağlar ters yöndedir. Bu bağ koptuğu zaman ya reaksiyon iki elektronun her biri bir partnere bağlanır ve iyonlar meydana gelir veya her biri eşlenmemiş iki elektron içeren iki fragman meydana gelir ve bu türler radikal olarak adlandırılır (Belitz ve Grosch 2001).

Serbest radikaller dış yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Oluşan radikaller çok reaktif ve stabil değildirler. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Halliwell ve Gutteridge 1989, Flora 2007).

Organizmada oluşan serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklıdır. Memelilerde, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETS), fagositik ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, araşidonik asit metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları esnasında ksantin oksidaz ile NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle meydana gelirler. Ekzojen kaynaklar ise endüstriyel kirleticiler, ilaçlar, diyet, iyonize radyasyon, ultraviyole (UV) ışık, sigara dumanı ve ksenobiyotiklerdir (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Serbest radikal kendi moleküler çevresinin dışına çok hızlı hareket edebilen radikaldır. Reaktif oksijen türleri (ROS) ise kimyasal olarak reaktif, bir veya daha fazla oksijen atomu içeren moleküller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen türleri, hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$) ve superoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) gibi serbest radikalleri ve ozon (O_3), singlet oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi biyolojik molekülleri okside edebilen radikal olmayan reaktif bileşikleri kapsar. Bu nedenle reaktif oksijen türleri aynı zamanda oksidanlar veya prooksidanlar olarak da ifade edilmektedir. Reaktif oksijen türleri Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Reaktif oksijen türleri (Özkaya 2007)

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	
RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Hidroksil ($\text{HO}^\bullet$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Peroksil ($\text{ROO}^\bullet$)	Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)
Alkoksil ($\text{RO}^\bullet$)	Ozon (O_3)
Süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Hipokloröz Asit (HOCl)

2.2.1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit, başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

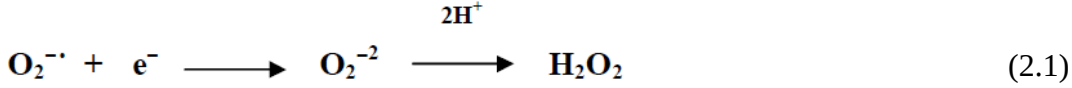
Süperoksit radikalleri hücrede enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında ya da oksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitesi sonucu oluşurlar. Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz adı verilen bir enzimle inaktive edilirler. Süperoksit radikali iki mekanizmayla çalışır. Bu fagositlerin bakterisit etkilerinin temel mekanizmasıdır. Aynı zamanda yangın reaksiyonlarında normal dokulara bile zarar verebilecek araçlardır (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Süperoksit radikali, hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Bu radikal epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir (Akkuş 1995).

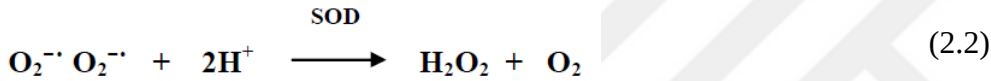
Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Sitokrom oksidaz, Fe: Cu: Zn: Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz aktivitelerine

sahiptir. Bu sayede, sitokrom oksidaz üzerinde süperoksit veya hidrojen peroksit oluşsa bile, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde hızla ortamdan temizlenir (Steinman 1982).

Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C'ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir (Steinman 1982).

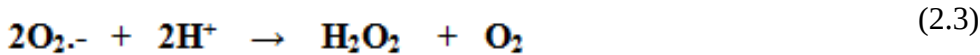


Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir.



2.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

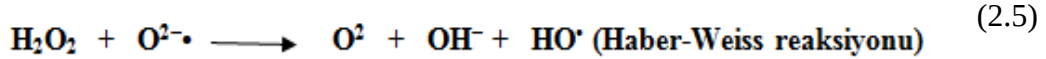
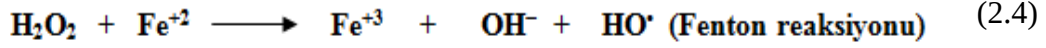
H_2O_2 , O_2 'nin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da $\text{O}_2^{\cdot-}$ enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucunda oluşmaktadır (Stocker 2004). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediği için radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında $\cdot\text{OH}$ 'inin öncülü olarak davranmasıdır. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Altıntaş 2006). Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmekte ve antioksidanları oksitleyebilmektedir (Uysal 1998). Diğer bir önemli işlevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır (Nordberg ve Arner 2004).



Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş elementleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmaya karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. Hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır (Gutteridge 1995).

2.2.3. Hidroksil Radikali

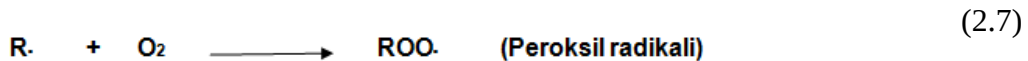
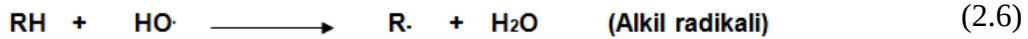
Hidroksil radikali, serbest radikaller içinde en reaktif olan radikaldır. Hidrojen peroksitin, Fe^{+2} ile (Fenton reaksiyonu) ya da süperoksit radikali ile (Haber-Weiss reaksiyonu) reaksiyona girmesi sonucu hidroksil radikali ortaya çıkmaktadır (Cheeseman ve Slater 1993).



Hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısadır. DNA'da hasarlara neden olacak kadar mutajenik, dokuda mevcut her bir moleküle zarar verebilecek kadar sitotoksik bir radikaldır. Hidroksil radikalleri DNA üzerinde tek zincirli kırılmalar meydana getirir ve hücre içindeki demir, DNA hasarı ve hücre ölümü için aracı olmaktadır. Fe ya da Cu gibi metallerin varlığında hidroksil radikalleri oluşumu oldukça hızlıdır ve özellikle nükleik asit gibi biyolojik önemi olan makro moleküllere de zarar verebilirler (Gülçin vd 2005). Hidroksil radikali, hücre zarının lipid tabakasındaki çoklu doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomlarını kopararak lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Sen vd 2010, Kumar 2011).

2.2.4. Peroksil Radikali

Oksijen radikal türevi olan peroksil radikali, yüksek enerjili bir radikaldır (Burcham, 1998). Peroksil radikali, hidroperoksil radikalının konjuge asidi yani dioksil radikali'dir. Lipit peroksidasyonunu baslatır ve proteinlerde modifikasyonlara neden olur. O_2^- ile birlikte sinerjistik etki oluşturarak DNA'da kırılma ve hasara neden olur (Sorg 2004, Valko vd 2006).

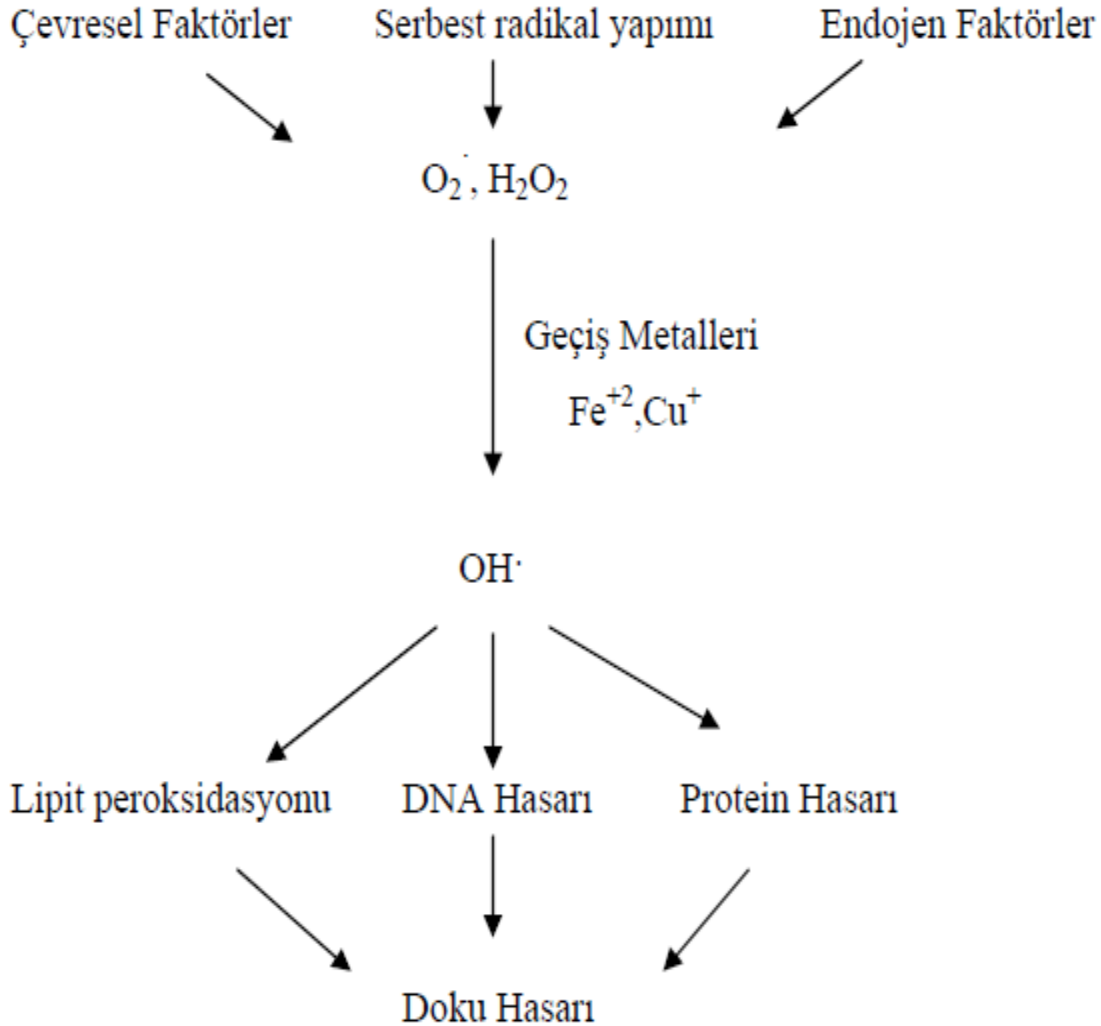


2.3. Oksidatif Stres

Organizmadaki birtakım metabolik reaksiyonlar sonucu (endojen) veya çevresel faktörlerden (ekzojen) kaynaklanan reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir. Solunum zinciri reaksiyonları, nötrofil ve makrofaj stimülasyonu, sitokrom P450 ve ksantin oksidaz enzimlerinin aktiviteleri gibi mekanizmaları kapsayan etmenler endojen kaynaklı etmenlerdir. Ayrıca demir ve diğer geçiş metallerinin dahil olduğu

reaksiyonlar sonucu da serbest radikaller oluşmaktadır. Endüstriyel kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, stres, hava kirliliği, sigara gibi indükleyiciler ise ekzojen kaynaklı etmenlerdir. (Çavdar vd 1997, Kumar 2011).

ROS düşük derişimlerde hücrel sinyal sistemlerinde fonksiyon gösterirken, yüksek derişimlerde hücrede birçok hasara yol açmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı artışı, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açmaktadır. Artan reaktif ürünler antioksidan savunma sistemleri tarafından uzaklaştırılmazsa, pro-oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres lipit peroksidasyonu başta olmak üzere DNA, protein, lipit ve karbonhidratlar üzerinde hasarlara yol açarak organizmada hücrel hasara yol açan ve birçok hastalığın patogeneğinde kritik öneme sahip olan bir olaydır. Özellikle tümör oluşumlarına ve kansere neden olabilmektedir (Fukagawa 1999, Lobo vd 2010). Serbest radikaller ve oksidatif stresin yol açtığı hasarlar Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Serbest radikaller ve oksidatif stresin yol açtığı hasarlar (Antmen 2005)

2.4. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit

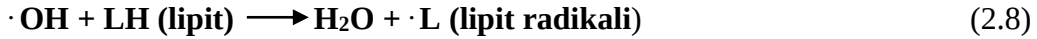
Hücre zarı fonksiyonları, hücre büyümesi ve sinyal yollarında görevli zar enzimlerini ve reseptörlerini içeren birçok hücresel yapı ve hücresel süreç için hayati önem taşımaktadır (Wiseman 1996). Lipit peroksidasyonu, zar fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece zar lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır (Mateos vd 2005).

Lipit peroksidasyonu kimyasal bir süreç olup serbest radikallerin membrandaki doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar (Canoruç vd 2001).

Hücre içi aldehitler, çoğunlukla endojen olarak oksidatif hasar altında oluşturulurlar (Marnett ve Plastaras 2001). Oksidatif stres, fosfolipitlerle ve yağ asitleri ile etkileşerek aldehitleri de içeren birçok ürün meydana getiren ROS'u üretir. Bu yol genel olarak lipit peroksidasyonu olarak bilinir (Feng vd 2006). Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipit radikali meydana gelir. Oluşan lipit radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksi radikalini oluşturur. Lipit peroksi radikali diğer lipitlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipit hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipit peroksidasyonunu hızlandırır (Kour ve Perkins 1991).

Lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir (Valko vd 2006).

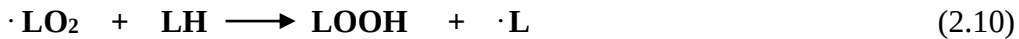
1. Başlangıç aşamasında, hidroksil radikali, doymamış yağ asidinden bir hidrojen çıkararak lipit peroksidasyonu başlatır.



2. İlerleme aşamasında, lipit radikali oksijen molekülüyle hızlıca reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur.

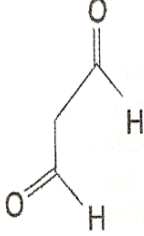


Oluşan peroksil radikali diğer lipit moleküllerine saldırır ve onların hidrojen atomunu çıkartarak, lipit hidroperoksitleri oluştururken aynı zamanda birbiri ardına ikincil oksidasyonları oksijenle birleşerek reaksiyonu devam ettirecek lipit radikali de oluşur.



3. Reaksiyon, lipit peroksil radikalinin antioksidanlar tarafından temizlenmesiyle ya da iki lipit peroksil radikalinin kombinasyonu ile keton ve alkol gibi radikal olmayan ürünlere dönüşmesiyle sonlanır.

Lipit radikalleri yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehittir (MDA) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. MDA'nın kimyasal yapısı (Esterbauer vd 1991)

Lipit proksidasyonunun son bileşeni olan malondialdehit (MDA) peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehidtir ve oksidatif durumun göstergesi olarak yaygın kullanılır. Bu dialdehit biyolojik ortamda makromoleküllerin NH₂ ve/veya SH gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur. Oluşan MDA deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açar (Cighetti vd 2002, Kurutaş Belge vd 2004).

Malondialdehit miktarı linolenik asit, araşidonik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi ikiden fazla çift bağ taşıyan serbest yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında büyük ölçüde artmaktadır. MDA, pH'a bağlı olarak değişik formlarda bulunabilir. Fizyolojik pH'da MDA birçok amino grubuna karşı düşük reaktiviteye sahip olan enolat anyonu formunda bulunur. Bununla beraber, pH azaldığında reaktivitesi büyük oranda artar. Fizyolojik koşullarda proteinler serbest amino asitlerden daha sık olarak MDA tarafından saldırıya uğrarlar ve intra ve intermoleküler protein çapraz bağlanmaları olduğu gibi özellikle lizin gibi bazı amino asit rezidülerinde modifikasyonlar da meydana gelir. MDA, DNA bazları ile de reaksiyona girer ve mutajenik lezyonlar meydana getirebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

2.5. Antioksidanlar ve Antioksidan Savunma Sistemi

Prooksidan /antioksidan dengesinin prooksidan lehine değişimi oksidatif stres olarak bilinmektedir. Oksidan karsinogenler, çevrede fazla miktarda ve dokularda da dönüşüm yoluyla oluşmaları nedeniyle karsinogenezisde önemlidirler. Oksidanlar kanserin başlamasında, ilerlemesinde ve gelişiminde rol oynamaktadırlar. Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' olarak bilinirler (Altan vd 2006).

Antioksidanlar, hücre ve dokuları serbest radikal hasarından koruyan veya serbest radikalleri nötralize eden moleküllerdir. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (Memişoğlu 2005).

1. Temizleme etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Baskılama etkisi: Oksidantlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.

Antioksidanlar, kaynaklarına göre endojen (hücre içindekiler) ve ekzojen (dışarıdan besinlerle alınanlar) şeklinde gruplandırılabilir. Yapılarına göre ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde sınıflandırılırlar.

Enzimatik antioksidanlar: Serbest radikalleri, enzimatik aktiviteleri ile detoksifiye eden antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanların başında süperoksit dismutaz enzimi (SOD) gelmektedir. SOD, süpürücü etki göstererek, süperoksit radikalini, H_2O_2 'ye dönüştürmektedir. Sitoplazmada bulunan glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ise elektron akseptörü olarak GSH'ı kullanmakta ve oluşan hidrojen peroksiti H_2O 'ya indirgemektedir. GPx'in bu katalitik reaksiyonu ile H_2O_2 'den OH radikal oluşumu önlenmektedir. Okside olan glutatyonu tekrar redükte formuna çeviren enzim ise glutatyon redüktaz (GRx)'dır ve elektron donörü olarak NADPH molekülünü kullanmaktadır. Hücrede bulunan antioksidan enzimlerden bir diğeri katalaz enzimidir. Katalaz, H_2O_2 'nin su ve oksijene parçalanmasını katalizlemektedir (Fang vd 2002, Valko vd 2006).

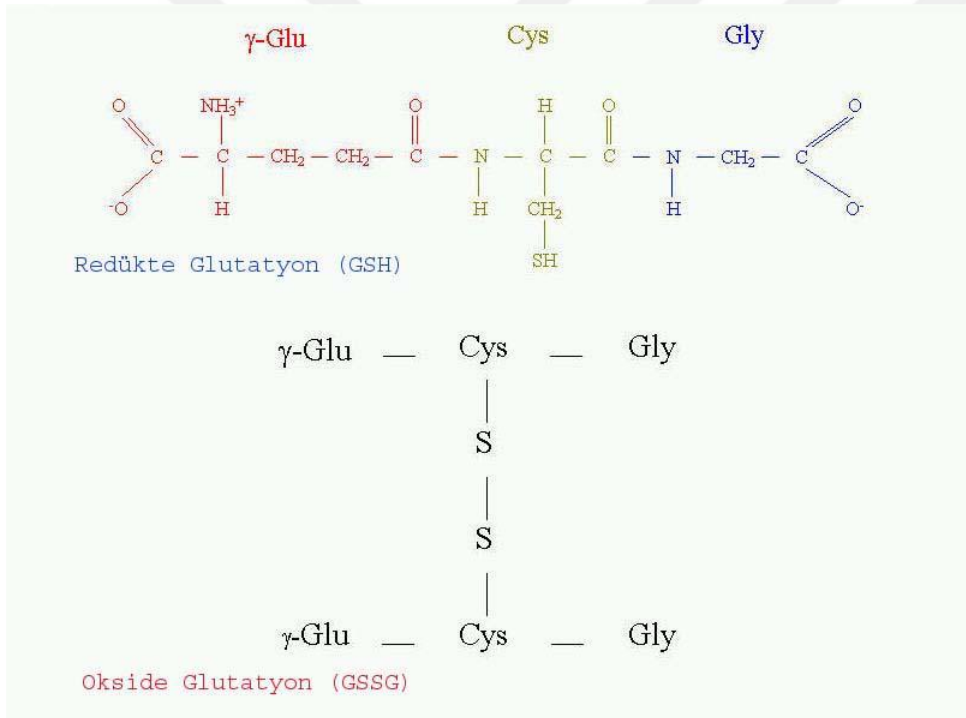
Enzimatik olmayan antioksidanlar: Serbest radikaller, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da etkisiz hale getirilebilirler. Enzimatik olmayan antioksidanlar şunlardır; glutatyon (GSH), lipoik asit, L-arjinin, ürik asit, bilirubin, koenzim Q10, melatonin, metal şelatlayan proteinler, vitamin E, vitamin C, karotenoidler, fenolik bileşikler (resveratrol), selenyum, manganez ve çinko (Halliwell ve Gutteridge 1999).

2.5.1. Glutatyon

Glutatyon (GSH) elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ve ROS'un hücrelerden uzaklaştırılması gibi çok sayıda hücre fonksiyonuna sahip protein olmayan bir tripeptittir (Meister ve Anderson, 1983). Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunan GSH, aynı zamanda en bol bulunan intrasellüler tiyoldür (Kidd, 1997). Glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisinden (Gly) meydana gelen GSH, Glu ile Cys arasında bir γ -peptid bağı içermektedir. Bu bağ GSH'ı birçok peptidazın hidrolitik etkisinden korur. GSH, Cys ve γ -glutamilsistein gibi GSH öncüsü bileşiklerden daha kolay yükseltgenir (Anderson 1998).

GSH, hücreleri serbest radikallerden korumada radikal süpürücü olarak görev yapan endojen bir antioksidandır. Hidroksil ve singlet oksijen radikallerini doğrudan yakalayarak hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır. GSH'ın oksidatif strese karşı hücreyi koruyucu özelliğinin yanında hücrel redoks düzeyinin idamesinin sağlanmasında da önemli rol oynamaktadır (Giles 2006). GSH özellikle, metabolizma, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi süreçlerde önemli olan proteinlerin sülfidril gruplarının redükte durumda kalmasını sağlayan bir moleküldür. Bunlara ek olarak GSH'ın, hücrel sistein depo kaynağı, Ca^{+2} homeostasisi regülatörü ve immün sistemle ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (Filomeni vd 2002, Estrela vd 2006, Townsend vd 2003).

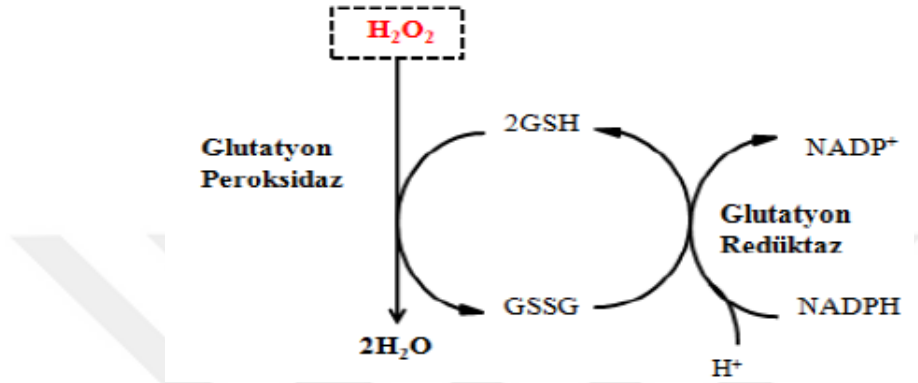
GSH hücrelerde iki formda bulunur, bunlardan aktif formu olan indirgenmiş glutatyon hücrelerde baskındır. Okside koşullar altında iki molekül GSH arasında disülfid bağı kurularak okside glutatyon (GSSG) oluşur (Pena Llopis vd 2002). Redükte ve okside glutatyonun yapısı Şekil 2.8'de görülmektedir.



Şekil 2.8. Redükte ve okside glutatyonun yapısı (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Oksidatif stres koşulları altında ROS, GSH tarafından indirgenirken, GSH GSSG'ye yükseltgenmektedir. Spontane oksidasyona karşı nispeten dirençli olmasına karşın, GSH $\cdot OH$ ile çok hızlı ve non-enzimatik olarak reaksiyon vermektedir. Aynı zamanda azot trioksit (N_2O_3) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) ile de reaksiyona girmektedir (Griffith 1999). Bir kimyasal antioksidant olmasının yanında GSH, peroksitlerin GPx aracılığıyla enzimatik olarak indirgenmesini sağlar ve bu reaksiyon sonunda GSSG meydana gelir. Normal fizyolojik koşullar altında GSSG, nikotinamid adenin

dinükleotid fosfat (NADPH)-bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GRx) tarafından GSH'a indirgenir ve bu şekilde bir redoks döngüsü meydana gelir (Şekil 2.9). Hücrenin indirgeme kapasitesi yetersiz kaldığında GSH/GSSG oranında azalmalar meydana gelir. İntrasellüler GSSG miktarı bir oksidatif stres indikatörü olarak değerlendirilirken, GSH/GSSG oranı hücrel redoks durumu hakkında bilgi sağlamaktadır (Cnubben vd 2001).



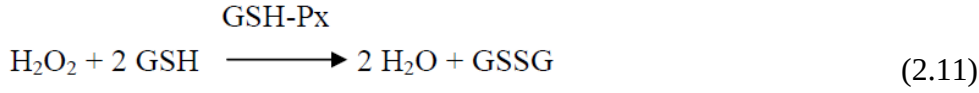
Şekil 2.9. Glutatyon redoks döngüsü (Cüre 2007)

GSH, enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla bazı ksenobiyotiklere bağlanabilmektedir. Oluşan GSH konjugatlarının hücreden uzaklaştırılması sonucunda hücrel GSH konsantrasyonu düşmektedir (Townsend and Tew, 2003). Hücrelerde tükenen GSH'ın yerine konulması gerekmektedir. GSH, sitozolde, γ -glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin katalizörlüğünde iki basamakta sentezlenmektedir (Meister 1995, Estrela 2006). Uzun süreli oksidatif stres maruziyeti neticesinde görülen GSH düşüklüğü, hücre ölümlerine neden olabilmektedir (Filomeni 2002).

2.5.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx) sitozolde ve memelilerin mitokondri matriksinde de bulunan tetramerik selenoenzimdir. GPx dokuyu oksidatif hasara karşı koruyan enzimlerden biridir. Glutatyon varlığında hem organik hem de inorganik peroksitler redüksiyona uğrar. Hidrojen peroksiti indirgeyen tepkimeyi, çok çeşitli organik hidroperoksitleri su ve alkole indirgeyen tepkimeleri katalizler (Paglia ve Valentine 1967, Di Ilio vd 1995). Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynar (Lawrence ve Burk 1976).

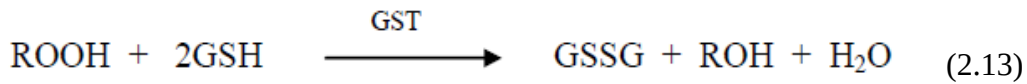
GPx'ler Se-GPx ve Se-bağımsız-GPx'ler olarak iki gruba ayrılabilir. Se-GPx'ler H₂O₂ ve organik hidroperoksitleri indirgeyebilir. Se-bağımsız-GPx'ler H₂O₂ için inaktif olup sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizlerler (Cnubben vd 2001).



2.5.3. Glutasyon S Transferaz

Glutasyon S-transferazlar (GST) glutasyon ile elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur (Hamed vd 2003). GST karsinojenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu ksenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir (Knapen vd 1999).

Ksenobiyotik metabolizmasında GSH'nin rolü, faz I enzimlerince oluşturulan reaktif ürünler glutasyon ile konjugasyona girer. Bunun sonucunda reaktif ürünler hücre makromoleküllerine (DNA, RNA, protein) bağlanamaz ve hücre hasarı oluşmaz (Koç 2008).

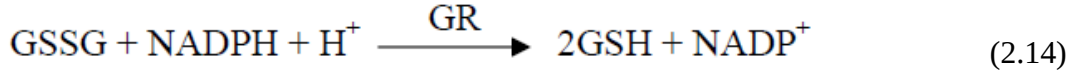


2.5.4. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GRx) bir flavo proteindir. NADPH varlığında glutasyon disülfiti ya da okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizler. Glutasyonun dengede tutulmasını sağlar (Carlberg ve Mannervik 1985).

GRx her biri aktif merkezinde FAD içeren iki protein alt ünitesinden oluşmaktadır. Enzimin katalizlediği reaksiyon sırasında FAD, NADPH tarafından indirgenir. Bundan gelen elektronlarda enzimin aktif merkezinde GSSG'nin iki sistein rezidüsü arasındaki disülfid bağına (-S-S) taşınır. Bu şekilde iki -SH grubu oluşurken GSSG iki GSH'a indirgenmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

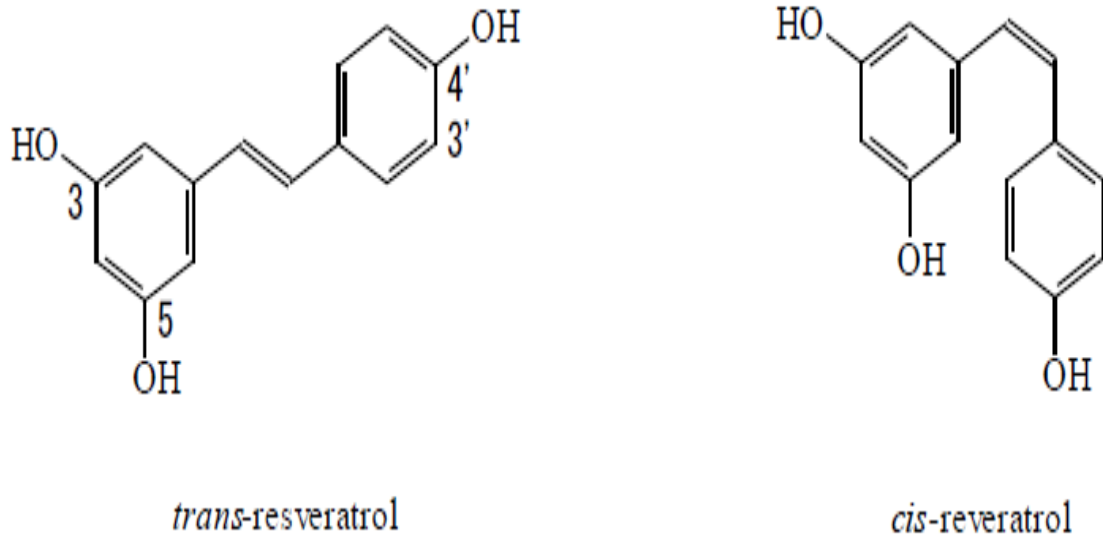
GPx tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. GRx da oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatyona dönüştürür (Collard ve Gelman 2001).



2.6. RESVERATROL

Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) siyah üzüm başta olmak üzere, bir çok bitki tarafından kuraklık, soğuk hava, stres, yaralanma, UV ışınları ve mantar enfeksiyonlarına karşı üretilen flavanoid olmayan polifenolik doğal bir fitoaleksindir (Aggarwal vd 2004, Kocatürk vd 2007). Fitoaleksinler çoğu bitkide bulunan, düşük moleküler ağırlıklı ve doğal bir bileşik olan stilben ailesine ait moleküllerin sınırlı bir grubunu meydana getirirler. Ayrıca biyotik ve abiyotik strese karşı kendilerini savunmak için bitkiler tarafından üretilen antibakteriyel ve antifungal özellikleri olan sekonder bitki metabolitleri olarak bilinirler (Martinez ve Moreno 2000, Szewczuk vd 2004).

Resveratrol (RES) stilben fitoaleksinlerin en aktif bileşiğidir. Cis ve trans izomerleri şeklinde bulunur (Şekil 2.10). Düşük pH, yüksek ısı ve gün ışığı cis formundan trans formuna dönüşümü sağlar. Trans-resveratrol izomeri daha stabil bir formdur (Trela ve Waterhouse 1996). Bitkilerde daha çok trans izomerinin bulunması nedeniyle bütün araştırmalar genel olarak trans izomeri üzerinden yapılmaktadır (Fremont 2000).



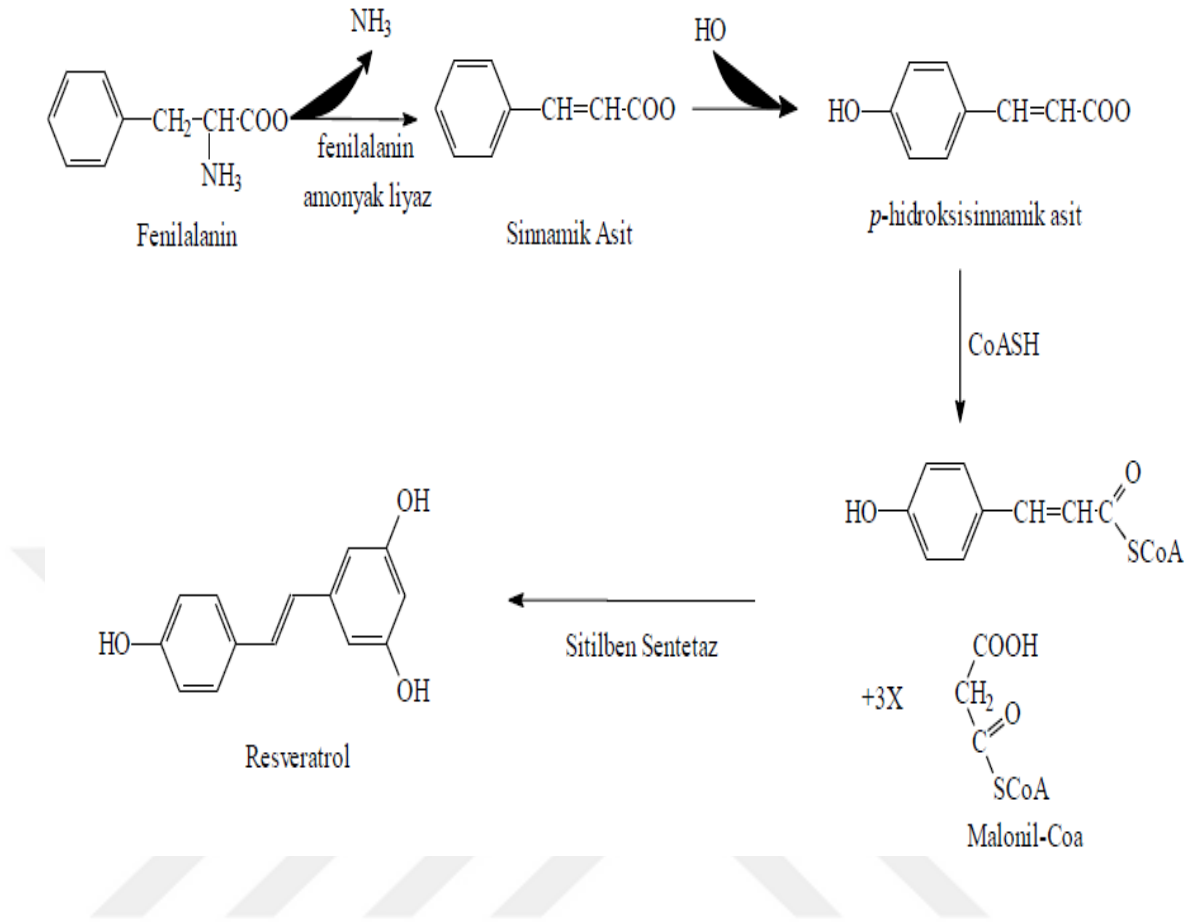
Şekil 2.10. Resveratrolün cis ve trans izomerleri (Fremont 2000).

Resveratrol ilk olarak *Veratrum grandiflorum* O. Loes (çoban değneği/çöpleme) bitkisinin köklerinden izole edilmiştir (Takaoka 1940). Daha sonra ise 1963 yılında Çin ve Japon geleneksel tıbbında dermatit ve gonore gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir (Nonomura vd. 1963, Clement 1998). Daha sonraki yıllarda *Vitis vinifera* (asma), *Arachis hypogaeae* (yerfıstığı), *Vaccinium myrtillus* (çoban üzümü), *Vaccinium vitis-ideae* (kekreyemişi), *Vaccinium macrocarpes* (turnayemişi), *Humulus lupulus* (şerbetçiotu), *Rheum rhaponticum* (kuzukulağı), *Eucalyptus* L. (ökaliptus) ve *Yucca* L. (avize ağacı) gibi 70'in üzerinde bitki türünde resveratrolün varlığı tespit edilmiştir (Baur ve Sinclair 2006). Siemann ve Creasy'nin 1992'de resveratrolün kırmızı şarapta olduğunu tespit etmesiyle kalbi koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmüştür ve Fransız paradoksu diye adlandırılan, kırmızı şarap tüketimi ile kalp damar hastalıkları arasındaki ters ilişki ile ilgili epidemiyolojik bulgulardan sonra resveratrol tüm dikkatleri üstüne çekmiştir (Siemann ve Creasy 1992, Renaud ve De Lorgeril 1992). Bu bulgulara destek olarak şarap ve üzüm ekstratlarının platelet agregasyonunu azalttığı (Demrow vd 1995), pulmoner hipertansiyonu önlediği (Fitzpatrick vd 1993), ateroskleroza baskıladığı (Wang vd 2005) ve insanlarda serum kolesterolü ve trigliserit konsantrasyonunu düzenlediği (Frankel vd 1993) gösterilmiştir.

Resveratrol insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri ile en yaygın çalışılan fitokimyasallardan biridir. Son yıllarda klinik öncesi modellerde resveratrolün kalp damar sağlığı, diyabet, yaşlanma, obezite ve kanserle ilişkili farmakolojik etkileri çeşitli biyokimyasal mekanizmalarla gösterilmiştir (Baur ve Sinclair 2006). Son yıllarda yapılan geniş çaplı araştırmalarda resveratrolün bu etkileri yanında kanser kemopreventif (koruyucu/önleyici) özellik gösterdiği de öne sürülmektedir. Bu alanda ilk çalışmalar Jang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Resveratrolün karsinogenezin üç ana basamağına (başlangıç, çoğalma ve ilerleme) karşı kemopreventif aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Jang vd 1997). Resveratrolün kemopreventif aktiviteleri bir çok hücre sinyal yoluna aracılık etmesi, hücre döngüsünü durdurması, apoptozisi başlatması, inflamasyonu ve anjiyogenezi azaltması ve adezyon, invazyon ve metastazı inhibe etmesi ile açıklanmaktadır (Aggarwal vd 2004, Kundu ve Surh 2008). Resveratrolün tümör ilerlemesi ve metastazı engelleme yeteneği aynı zamanda antikanser tedavileri için umut vaat edicidir (Kraft vd 2009).

2.6.1. Resveratrolün Biyosentezi ve Metabolizması

Resveratrol fenil alaninden başlayarak çok basamaklı bir reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. İlk basamakta fenil alanin amonyak liyaz enziminin deaminasyon işlemi ile sinnamik asite dönüşür. Sinnamik asit 4-hidroksilaz, p-hidroksilasyon reaksiyonları ile 4-Koumarik aside dönüşür ve 4-Koumaratla Co-A ester yapısına dönüşür. 4-Koumaril Ko-A, 3 malonil Ko-A ünitesi ve stilben sentaz enzimi ile resveratrol oluşur, bu enzim yoksa flavanoid oluşur (Celotti vd 1996, Fremont 2000). Resveratrolün biyosentezi Şekil 2.11'de verilmiştir.



Şekil 2.11. Resveratrolün biyosentezi (Celotti 1996).

Resveratrol, oral yolla alındıktan 30-60 dakika sonra metabolize olmakta ve sıklıkla karaciğer ve onikiparmak bağırsağında konjugasyon ile glukuronoid ve sülfat metabolitlerine dönüşmektedir (Ndiaye vd 2011). Resveratrolün suda çözünürlüğü düşüktür. Bu yüzden hidrofilik konjugatlarına dönüşür. Hidrofilik konjugatlar, resveratrolün kana geçişini, vücutta dağılımını ve atılımını sağlar. Ayrıca plazmada yüksek konsantrasyonda kalmasını sağlar. Resveratrol serum proteinleri, yağ asitleri ve lipoproteinlere bağlanarak dolaşır (Delmas ve Lin 2011). Albumin plazmada RES'i taşıyan moleküllerden biridir (Jannin vd 2004). Plazmada RES'in lipoproteinlerle de etkileştiği gösterilmiştir. Resveratrol en çok lipoproteinlerle taşınır. LDL ile birleşen resveratrol (Resveratrol -LDL) karaciğerdeki LDL reseptörleri ile hücre içine alınır (Urpí-Sardà vd 2005).

2.6.2. Resveratrolün Antikanser Etkileri

Resveratrolün anti-kanser aktivitesi kanser hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozisi, metastazı, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu aracılığı ile olmaktadır. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı

dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği de gösterilmiştir (Gupta vd 2011). Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin baskılanması, karsinogenezin baskılanması, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği de bildirilmiştir (Yar vd 2010).

Apoptozisin hücre çoğalması ile ölümü arasındaki dengede kritik bir rolü vardır; birçok sitotoksik ve sitostatik kanser ilacının kanser hücreleri için apoptozisi etkilediği bilinmektedir. Resveratrol, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozisin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat apoptozis-indüklü etkileri farklı tümör hücrelerinde farklılık göstermektedir (Bai vd 2010). İnsan promyleositik lösemi hücrelerinde resveratrolün hücrelerin çoğalmasını baskıladığı, apoptozisi etkin kıldığı, antiapoptotik onkoprotein Bcl-2 artışını engellediği ve DNA'da kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir (Correia-da-Silva vd 2011). Ayrıca resveratrolün prostat kanseri ve kolon kanserinde p53-bağımlı apoptozise aracı olduğu bildirilmiştir (Gatouillat vd 2010). K562 hücrelerinde resveratrol ile aktive olan PKC ve ERK1/2 p53 fosforilasyonu ve apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir (Chakraborty vd 2008, Can vd 2012).

Resveratrolün göğüs, akciğer, prostat, kolorektal kanser, mide kanseri, özafagus 34 tümörleri, pankreas kanseri, lösemi gibi çeşitli kanser türleri üzerine antiproliferatif olarak rol oynadığı bildirilmektedir (Athar vd 2007). Resveratrolün, malignant hücrelerde özellikle DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek tümör hücrelerinin büyümesini engellediği de gösterilmiştir (Szekeres vd 2011). Ayrıca resveratrolün, kanserli hücrelerde, NFκB aktivasyonunu inhibe ederek ve TNFα üretimini azaltarak tümör gelişimini önlediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Martin vd 2006).

2.6.3. Resveratrolün Antioksidan Etkileri

Polifenoller, antioksidan olarak insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca oksidatif stresi azaltmalarından dolayı kanser riskini de azalttıkları bilinmektedir (Abdulla vd 2013). Doğal bir polifenol olan resveratrolün de antioksidan özellikleri ile kanser çalışmalarında rolü büyüktür.

Resveratrol antioksidan etkisini farklı mekanizmalarla ortaya koymaktadır. Resveratrol serbest radikalleri yok ederek, metal iyonlarını bağlayarak, ROS oluşumunda rol oynayan enzimlerin aktivitesini azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak antioksidan bir potansiyel göstermektedir (Carrizzo vd 2013, Gambini vd 2015) (Çizelge 2.5).

Fenolik antioksidanlar, serbest radikallerle girdikleri reaksiyonlarda hidrojen atomu vericisi veya elektron vericisi olarak davranabilmektedirler. Resveratrolün de çoğunlukla hidrojen atomu vericisi olduğu belirtilmektedir (Tang vd 2011). Resveratrolün yapısındaki hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda 4' OH'ın 3' ve 5' OH'dan daha aktif olduğu tespit edilmiştir (Queiroz vd 2009, Mikulski vd 2010).

Çizelge 2.5. Resveratrolün etki ettiği oksidan enzimler ve antioksidanlar

Oksidan enzimler	Antioksidan savunma
NADPH oksidaz	Sirtuin 1 (SIRT1)
Ksantin oksidaz (XO)	AMP kinaz (AMPK)
Miyeloperoksidaz (MPO)	Nükleer faktör 2 (Nrf-2)
Siklooksijenaz (COX)	Tetrahidrobiopterin
	Superoksit dismutaz (SOD)
	Katalaz (KAT)
	Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)
	Glutasyon redüktaz (GSH-R)
	Glutasyon S-transferaz (GSH-T)
	Hem oksijenaz-1
	Peroxisome proliferatore activated receptor- α (PPAR- α)

Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir (Burkitt ve Duncan 2000). Resveratrol $\text{OH}^\cdot$ ve $\text{O}_2^\cdot$ radikallerini süpürüp $\text{OH}^\cdot$ radikalinin neden olduğu lipid peroksidasyonu inhibe etmekte ve $\text{OH}^\cdot$ ile H_2O_2 'in neden olduğu DNA hasarını önlemektedir (Leonard 2003). Resveratrolün lipid peroksidasyonunu önlemede vitamin E ve vitamin C ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu ve hücre içerisindeki molekülleri hedef alarak hücre canlılığını sürdürdüğü ve oksidasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Stojanovic vd. 2001). Ayrıca protein oksidasyonunu engellemekte serum antioksidan kapasitesini arttırmaktadır. Krom maruziyetiyle oluşan NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) aktivasyonunu da engellediği görülmüştür (Olas vd 2006).

Resveratrolün serbest radikal süpürücüsü ve enzim düzenleyici özelliklerinden dolayı oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Rodrigo ve Bosco 2006). Resveratrolün iyi özellikle hidroksil ve süperoksit radikalleri başta olmak üzere iyi bir radikal süpürücü olduğu bildirilmiştir (Neves vd 2012). Ayrıca etanolün beyin, karaciğer, kalp ve testisler gibi çeşitli organlarda neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu da tespit edilmiştir (Kasdallah-Grissa vd 2007). Hücrenin yaşam süresi ve canlılığını artıran Sirtuin 1 adlı geni aktive ettiği için yaşam süresini artırdığı ve nörolojik hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinsonda da koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur (Anekondan 2006).

Resveratrol, hücrel antioksidan sistemin aktivitesi üzerinde de etkili olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, oksidatif strese indüklenen sıçan karaciğer hücrelerinde, resveratrolün, detoksifikasyon mekanizmalarını düzenlediği, özellikle katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon redüktaz, NADPH kinon

oksiredüktaz ve glutatyon S transferaz enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı belirtilmektedir (Rubilio vd 2008). Aynı çalışmanın devamında, resveratrolün, SOD, GRx, katalaz gibi enzimlerin ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörü Nrf2 üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Rubilio vd 2008).

Resveratrol ile beslenen ratlarda doza bağlı olarak resveratrolün karaciğer hücrelerinde ilaç metabolizmasını düzenlediği, GST gibi faz I enzimlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Hebbar 2005). Ayrıca insan lenfosit hücrelerinde (Yen vd 2003) ve insan kardiyomiyositlerinde (H9C2) (Cao ve Li 2004) zamana ve doza bağlı olarak GSH miktarı ile GPx ve GRx enzim aktivitelerini artırarak oksidatif DNA hasarını engellediği gösterilmiştir.

Resveratrolün hücre membranında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi RAW 264.7 ve JB6 hücrelerinde gösterilmiştir (Leonard vd 2003). Ayrıca güçlü bir oksidan olan hidrojen peroksit ile muamele edilmiş mide adenokarsinoma hücrelerinde resveratrolün bazı sinyal yollarını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği ve hidrojen peroksit ile muamele edilen mesane kanseri hücrelerinde resveratrolün yüksek dozlarda hücre ölümünü teşvik ettiği, düşük dozlarda ise koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Aquilano vd 2009, Stocco vd 2012).

TIGAR (TP53- İndüklenmiş Glikoliz ve Apoptosis Regülatörü) resveratrolün hedeflerinden biri olarak tanımlanmıştır. H1299 ve MCF-7 hücrelerinde resveratrol uygulaması TIGAR proteinlerini azaltmıştır ve bu da redükte glutatyon (GSH) düzeylerinin azalmasına neden olarak apoptosizi indüklemiştir (Kumar vd 2015).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Dondurulması

Çalışmamızda kullanılan olan parental H1299 (insan akciğer kanseri hücresi) ve MRC-5 (insan akciğer fibroblast hücresi) hücre dizileri American Type Culture Collection (ATCC)' dan satın alınarak uygun besiyeri ortamında Akdeniz Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarımızda üretilmiştir.

Hücreler laboratuvarımıza ulaştığında kendi özel besi ortamlarında kültüre alınmıştır. H1299 hücreleri stok için, %10 fetal bovin serum ve %1 antibiyotik-antimikotik karışımı içeren RPMI-1640 besiyerinde üretilmiştir. MRC-5 hücreleri ise, %10 fetal bovin serum, %1 antibiyotik-antimikotik ve %1 aminoasit içeren DMEM besiyerinde üretilmiştir. 37°C da, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren etüvde 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Hücreler hücre yoğunluğuna göre 2-3 günde bir beslenmiş ve çok yoğunlaşan hücrelerin tripsinizasyon işlemi, Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Hücreler yapıştıkları flasktan kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 1000 xg'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı steril bir şekilde uzaklaştırılmış ve elde edilen pelet steril besiyeri ile süspanse edilerek flasklara bölünmüş ve çoğaltılmaya devam edilmiştir. Hücrelerin flasklara veya kuyucuklu plaklara (96 well plate) aktarılması sırasında hücreleri saymak için Tripkan mavisi (1/1 oranında) testi uygulanmıştır. Canlı hücrelerin boyayı almayıp, ölü hücrelerin boyayı alması esasına dayanan bu yöntemde canlı ve ölü hücreler hemositometrede sayılmıştır.

Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurularak stoklanmıştır. Dondurulacak hücreler 1.5 ml hücre dondurma çözeltisi (%10 gliserol, %50 serum ve %40 serum içermeyen besiyeri) içinde cryo tüpe alınmış ve -80°C'de saklanmıştır.

3.2. Sitotoksite Testi

Flaskta üretilmiş hücreler tripsinize edilerek yapışmış oldukları flaskın yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücrelerin, kuyucuklu plaklara (96 well plate) aktarılması sırasında hücreleri saymak için Tripkan mavisi (1/1 oranında) testi uygulanmıştır. 96 kuyucuklu mikrolaplara (96 well plate), her kuyuya 1x10⁴ hücre olacak şekilde 200 µl hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası kuyucuklarda kullanılan besiyerleri atılarak yenilenmiştir. Dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmış resveratrol (Sigma), besiyeri ile seyreltilip konsantrasyonları 10-800 µM ayarlanarak içerisinde hücre bulunan kuyucuklara eklenmiştir (Çizelge 3.1). Aynı basamaklar izlenerek hücrelere H₂O₂ de uygulanmıştır (Çizelge 3.2). Kontrol grubu olarak hiçbir şeyle muamele edilmemiş hücreler, sadece DMSO ile muamele edilmiş hücreler ve hücre içermeyen ancak besiyeri içeren kuyucuklar da kullanılmıştır. Ayrıca resveratrolün kanserli hücre ve sağlıklı hücredeki etkilerini karşılaştırabilmek amacıyla MRC-5 insan akciğer fibroblast hücreleri de kullanılmıştır. Tüm parametraler beşer tekrarlı çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde uygulanan konsantrasyonları

0 (kontrol)	75 μ M	400 μ M
10 μ M	100 μ M	500 μ M
15 μ M	150 μ M	600 μ M
25 μ M	200 μ M	700 μ M
50 μ M	300 μ M	800 μ M

Çizelge 3.2. Hidrojen peroksitin H1299 hücrelerinde uygulanan konsantrasyonları

0 (kontrol)	150 μ M	400 μ M
25 μ M	200 μ M	450 μ M
50 μ M	250 μ M	500 μ M
75 μ M	300 μ M	
100 μ M	350 μ M	

Hücrelerin 37°C da %5 CO₂'li etüvde resveratrol için 24, 48 ve 72 saat ve H₂O₂ için 72 saat inkübasyonu sonrasında hücrelerin canlılığı Cell Titer-Blue^R cell viability assay kiti (Promega) ile floresan spektrofotometrede (560 nm'de eksitasyon ve 590 nm' emisyon) ölçülmüştür. (Gloeckner vd 2001). Bu ölçümler sonucunda resveratrolün IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri hesaplanmıştır.

Cell Titer-Blue^R hücre canlılığı testinin esası; canlı hücrelerin resozurini, floresan bir ürün olan resorufine çevirme yeteneğine dayanır. Ölü hücreler ise metabolik kapasitelerini çok çabuk kaybetmelerinden dolayı floresan sinyali oluşturan ürün üretemezler.

Resveratrolün hücreler üzerine koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymak için, hücreler farklı konsantrasyonlarda resveratrole (IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀) bir saat ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e (IC₅₀, IC₇₀) 72 saat maruz bırakılarak sitoprotektif (antioksidan) etki hesaplanmıştır.

3.3. Hücre Süpernatantının Hazırlanması

Deneylerde kullanılacak olan süpernatantın hazırlanması için yeterli hücre yoğunluğuna ulaşıldıktan sonra hücreler tripsinize edilerek yapışarak üredikleri flasktan kaldırılıp santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen peletten her bir flaska 150.000 hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler 24 saat 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücrelerin bir kısmı kontrol grubu olarak ayrılmış, bir kısmı da IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında resveratrole ve H₂O₂’ye karşı en etkili koruma gösteren resveratrol konsantrasyonuna (IC₃₀) maruz bırakılarak 72 saat 37°C’de inkübe edilmiştir.

Resveratrol uygulaması yapılan ve kontrol olarak ayrılan flasklardaki hücreler 72 saatin sonunda tripsinlenerek alınmıştır. 600xg’de santrifüjlenerek elde edilen pellet PBS (fosfat tamponlu tuz, pH 7) çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. 300 µl tampon (100 mM K₂HPO₄ ve 100 mM KH₂PO₄ çözeltisi pH 7), 1180 µl distile su ve 20 µl proteaz inhibitör kokteyl (Sigma) karıştırılarak homojenizasyon tamponu hazırlanmıştır. En son yıkamadan kalan pelet, homejenizasyon tamponuyla seyreltilerek ependorf tüplerine aktarılmıştır. Branson Sonifier marka ultrasonik parçalayıcıda 3x15’er saniye buz içerisinde homojenize edildikten sonra 32000xg’de 45 dakika 4°C’ da santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar -80°C’ da saklanmıştır.

Elde edilen süpernatant kullanılarak örneğin MDA içeriği hesaplanmıştır ve aynı numunelerden Bradford metodu (1976) ile protein ölçümü yapılarak MDA seviyesi nmol/mg protein olarak belirlenmiştir. Aynı numuneler kullanılarak glutatyon ve enzim ölçümleri yapılmıştır.

3.4. Malondealdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçülmesi

MDA düzeyleri Wasowicz, Neve ve Peretz’in yöntemine göre yapılmıştır (Wasowics vd 1993). Metodun temel prensibi, membran hasarı sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA’nın tiyobarbiturik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazında ekstrakte edilerek 525 nm (eksitasyon) ve 547 nm (emisyon)’de floresan spektrofotometrik (PerkinElmer LS 55) olarak okunması esasına dayanır.

10 µl hücre supernatantı, 200 µl distile su ve 200 µl TBA (29 mM; 8.75 M Asetik asit içerisinde) iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat boyunca 100°C’de kaynatılmıştır. 1 saat sonunda tüpler musluk suyu altında soğutulduktan sonra 5 µl 5M HCl (Merck) ve 600 µl n-butanol (Sigma) eklenerek tüm tüpler 3-4 dakika boyunca kuvvetle karıştırıldıktan sonra 10 dakika 3000xg’de santifüj edilerek üst faz ayrılmış ve floresan spektrofotometrede (PerkinElmer LS 55) yukarıda belirtilen dalga boylarında okunmuştur.

Numunelerin MDA içerikleri standart grafiğinden [1,1,3,3-tetrametoksipropan (Merck) standart solüsyonu, 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4 nmol/ml konsantrasyonlarında] hesaplanmıştır. Aynı numunelerden Bradford metodu ile protein ölçümü yapılarak MDA seviyesi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

3.5. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Kantitatif protein miktarları Bradford metodu ile ölçülmüştür (Bradford 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue (Coomassie parlak mavisi) G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Coomassie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerindeki değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir.

İlgilenilen proteinin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen standart protein ile çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden hesaplanmıştır. Protein standardı için 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 mg/ml konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) çözeltisi kullanılmıştır.

Protein standart grafiği hazırlandıktan sonra örnekler 1:75 oranında dilüe edilerek, 20 µl örnek üzerine 200 µl renklendirme reaktifi ilave edilmiştir. On dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafikten yararlanılarak örneklerin protein miktarları belirlenmiştir.

3.6. Antioksidan Enzimler ve Glutasyon Düzeylerinin Ölçümü

Bu parametler 72 saat süresince IC₃₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında resveratrole maruz bırakılmış hücrelerde çalışılmıştır.

3.6.1. Selenyum-Bağımlı ve Selenyum-Bağımsız Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi (50 mM potasyum fosfat tamponu; pH 7.0, 1mM EDTA, 1.5 mM NaN₃, 1mM GSH, 0.16 mM NADPH, 4µg glutasyon redüktaz ve 0.25 mM H₂O₂ / kümene H₂O₂) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Lawrence ve Burk 1976). Metodun temel prensibi, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve 0.24 units glutasyon redüktaz (GR) içeren reaksiyon karışımında NADPH miktarının 340 nm’de ölçülmesi esasına dayanır. . Bir unit enzim aktivitesi, dakikada bir µmol glutasyonun oksidasyonu ile sonuçlanır. Çalışmalarımız 96 kuyucuklu plaklara göre modifiye edilmiştir.

96 kuyucuklu plaklara:

- 20 µl hücre süpernatantı
- 20 µl GSH
- 20 µl GR
- 20 µl NADPH
- 20 µl hidrojenperoksit / kümene hidrojenperoksit
- 100 µl fosfat tamponu (PB)- EDTA (0.5 ml 0.1 M EDTA + 50 ml 0.1 M PB, pH 7.0) eklenmiştir.

Kuyucuklara konan maddeler pipetleme yapılarak iyice karıştırıldıktan sonra 30°C'de 5 dakika bekletilerek 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Glutasyon peroksidazların aktivite düzeyleri units/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi } (\mu\text{U/mg protein}) = \frac{\text{GPx Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.1)$$

3.6.2. Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin Ölçülmesi

Glutasyon S-transferaz aktivitesini ölçmek için 20.26 mg 1-chloro-2-4-dinitrofenol 1 ml benzen içerisinde tamamen çözüldü. 0.667 ml etanol (%100) ilave edildikten sonra 1:10 oranında fosfat tamponu (pH 6.5) ile karıştırıldı. 1 ml'lik küvete 0.7 ml CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) içeren fosfat tamponu, 0.1 ml GSH (0.003gr/ml) ve 0.2 ml ve fosfat tamponu (100 mM,pH 6.5) ilave edilerek 30 °C de de aktivite ölçüldü (Habig ve Jakoby 1994).

96 kuyucuklu plaklara:

- 20 µl hücre süpernatantı
- 20 µl fosfat tamponu
- 140 µl PB+CDNB
- 20 µl 10 mM GSH eklenmiştir.

Kuyucuklara konan maddeler pipetleme yapılarak iyice karıştırıldıktan sonra 30°C'de 5 dakika bekletilerek 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Glutasyon S-transferaz aktivite düzeyleri units/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi } (\text{mU/mg protein}) = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.2)$$

3.6.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Glutasyon redüktaz aktivitesi NADPH oksidasyonuna dayanan Carlberg ve Mannervik'in (1985) metoduna göre ölçülmüştür.

96 kuyucuklu plaklara:

- 20 µl hücre süpernatantı,
- 40 µl fosfat tamponu (0.5 M, pH 7.4),
- 20 µl EDTA (10 mM),
- 80 µl ddH₂O

- 20 µl GSSG (20mM)
- 20 µl NADPH (2mM) eklenmiştir.

Kuyucuklara konan maddeler pipetleme yapılarak iyice karıştırıldıktan sonra 30°C’de 5 dakika bekletilerek 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Glutasyon redüktaz aktivite düzeyleri units/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{GR Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GR Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.3)$$

3.6.4. Glutasyon Miktarının Ölçülmesi

Total GSH içeriği, GR varlığında NADPH tarafından 5,5-dithiobis (2-nitrobenzezoic) asitin azalmasını esas alarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Beutler 1975). 40 mikrolitre PB-EDTA-10 mikrolitre GSSG veya 20 mikrolitre PB-EDTA- 30 mikrolitre GSH gibi farklı oranlarda hazırlandıktan sonra üzerlerine 100’er mikrolitre karışımda (1 mM DTNB, 1mM NADPH, 0.1 MNaPB, 2 unit Glutasyon redüktaz) konularak 405 nm’de, 30°C’de ölçüm yapılmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için Minitap Release 13.0 programı kullanılmıştır. Gruplar arası karşılaştırma için ANOVA-GLM (General Linear Model) yöntemi ve sonuçların değerlendirilerek farkların önem seviyesini belirtmek için Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır (www.minitab.com/products/minitab).

4. BULGULAR

4.1. Resveratrolün ve H1299 ve MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, Cell Titer-Blue^R viability assay kiti kullanılarak ölçülmüştür. Cell Titer-Blue^R hücre canlılığı testinin esası, canlı hücrelerin rezozurini, floresan bir ürün olan resorufine çevirme yeteneğine dayanır. Ölü hücreler ise metabolik kapasitelerini çok çabuk kaybetmelerinden dolayı floresan sinyali oluşturan ürün üretemezler. Flaskta üretilmiş hücreler tripsinize edildikten sonra sayılarak 96-kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. DMSO içerisinde çözülmüş olan resveratrol, seri olarak besiyeri ile seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış ve içerisinde hücre bulunan kuyucuklara konulmuştur. Hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin rezozurini resofurine redüksiyonunun floresanspektrofotometrede ($560_{\text{Eks}}/590_{\text{Ems}}$) ölçülmesiyle IC_{50} (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{50} 'den küçük değerler ($IC_{10}, IC_{20}, IC_{30}$) ve IC_{70} değerleri hesaplanmıştır.

4.1. 1. Resveratrolün H1299 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Resveratrolün farklı konsantrasyonlarının H1299 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonunda sitotoksik etkisi araştırılmış, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). H1299 hücreleri 24, 48 ve 72 saat süreyle artan konsantrasyonlarda Resveratrole maruz bırakılarak IC_{50} ve IC_{70} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca antioksidan deneylerinde kullanılmak üzere Resveratrolün Ayrıca resveratrol ile 72 saat inkübasyon sonucu IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} değerleri de hesaplanmıştır. Resveratrol konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

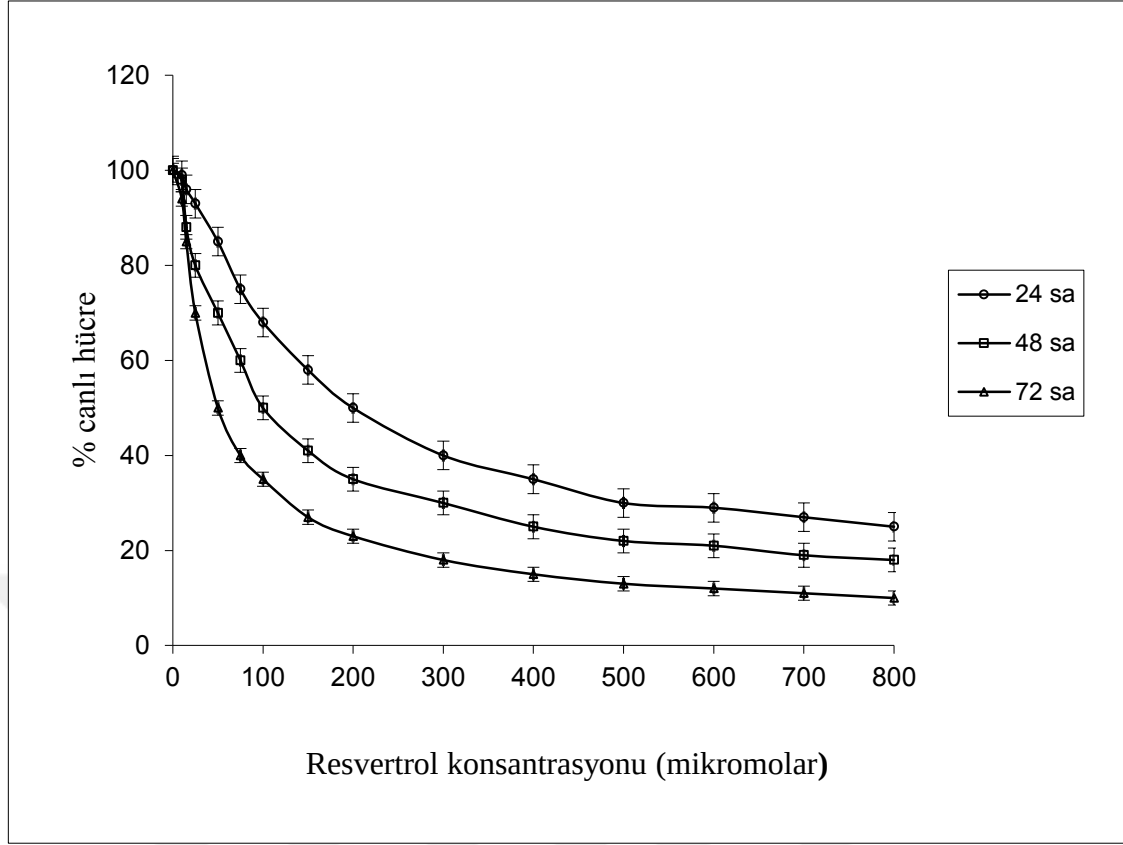
H1299 hücrelerinin farklı resveratrol konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu Resveratrolün %50 sitotoksik etki (IC_{50}) gösteren konsantrasyonu $200 \mu\text{M}$ olarak bulunurken, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla $100 \mu\text{M}$ ve $50 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Resveratrolün IC_{70} değerleri ise 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla $500 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ ve $125 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca resveratrol ile 72 saat inkübasyon sonucu IC_{10} değeri $13 \mu\text{M}$, IC_{20} değeri $17 \mu\text{M}$ ve IC_{30} değeri $25 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır ve bu konsantrasyonlar antioksidan etki deneylerinde kullanılmıştır. En yüksek resveratrol konsantrasyonunu hazırlamak için çözücü olarak kullandığımız %0.5 DMSO konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında hücre canlılığını önemli derecede etkilemediği bulunmuştur.

Sitotoksik etki konsantrasyona ve zamana paralel olarak artmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p < 0.05$) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Resveratrol konsantrasyonlarının H1299 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi

Resveratrol konsantrasyonu μM	% Canlı hücre 24 saatlik inkübasyon $\bar{X} \pm \text{S.H.}$	% Canlı hücre 48 saatlik inkübasyon $\bar{X} \pm \text{S.H.}$	% Canlı hücre 72 saatlik inkübasyon $\bar{X} \pm \text{S.H.}$
10	$99 \pm 1.7 \text{ j}$	$98 \pm 2.1 \text{ j}$	$94 \pm 1.9 \text{ ij}$
15	$96 \pm 1.8 \text{ j}$	$88 \pm 2.3 \text{ i}$	$85 \pm 1.2 \text{ hi}$
25	$93 \pm 1.5 \text{ ij}$	$80 \pm 2.2 \text{ hi}$	$70 \pm 1.0 \text{ g}$
50	$85 \pm 2.1 \text{ hi}$	$70 \pm 1.08 \text{ g}$	$50 \pm 0.8 \text{ e}$
75	$75 \pm 2.3 \text{ gh}$	$60 \pm 1.0 \text{ f}$	$40 \pm 0.7 \text{ d}$
100	$68 \pm 2.2 \text{ g}$	$50 \pm 1.1 \text{ e}$	$35 \pm 0.3 \text{ cd}$
150	$58 \pm 1.5 \text{ f}$	$41 \pm 0.8 \text{ de}$	$27 \pm 0.1 \text{ c}$
200	$50 \pm 1.4 \text{ e}$	$35 \pm 0.9 \text{ cd}$	$23 \pm 0.8 \text{ bc}$
300	$40 \pm 1.3 \text{ d}$	$30 \pm 0.5 \text{ c}$	$18 \pm 0.2 \text{ b}$
400	$35 \pm 1.2 \text{ cd}$	$25 \pm 0.4 \text{ bc}$	$15 \pm 0.3 \text{ ab}$
500	$30 \pm 1.0 \text{ c}$	$22 \pm 1.0 \text{ bc}$	$13 \pm 0.7 \text{ ab}$
600	$29 \pm 0.6 \text{ c}$	$21 \pm 0.3 \text{ bc}$	$12 \pm 0.3 \text{ ab}$
700	$27 \pm 0.8 \text{ c}$	$19 \pm 0.8 \text{ b}$	$11 \pm 1.0 \text{ ab}$
800	$25 \pm 0.2 \text{ bc}$	$18 \pm 0.5 \text{ b}$	$10 \pm 0.1 \text{ a}$
KONTROL	$100 \pm 1.1 \text{ j}$	$100 \pm 1.3 \text{ j}$	$100 \pm 1.4 \text{ j}$
%0.5 DMSO	$99 \pm 2.0 \text{ j}$	$99 \pm 2.0 \text{ j}$	$98 \pm 1.2 \text{ j}$

X: Beş tekrarın ortalaması olup ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). S.H. : Standart Hata.



Şekil 4.1. H1299 hücrelerinde artan resveratrol konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığı

4.1.2. Resveratrolün MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Resveratrolün MRC-5 hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi araştırılmış, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.2). MRC-5 hücreleri 24, 48 ve 72 saat süreyle artan konsantrasyonlarda Resveratrole maruz bırakılarak IC_{50} ve IC_{50} değerleri bulunmuştur. Resveratrol konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

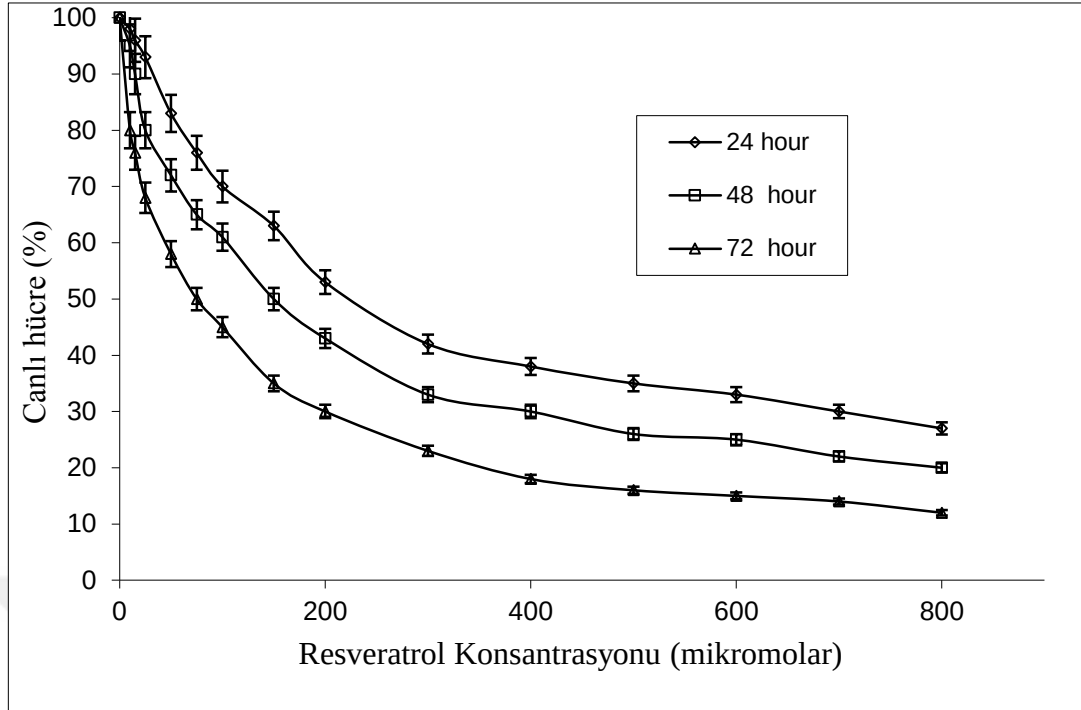
MRC-5 hücrelerinin farklı resveratrol konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu Resveratrolün %50 sitotoksik etki (IC_{50}) gösteren konsantrasyonu 250 μ M olarak bulunurken, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla 150 μ M ve 75 μ M olarak bulunmuştur. Resveratrolün IC_{70} değerleri ise 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla 700 μ M, 400 μ M ve 200 μ M olarak bulunmuştur. Ayrıca antioksidan deneyleri için, ' ile 72 saat inkübe edilen hücrelerde IC_{10} değeri 8 μ M, IC_{20} değeri 10 μ M ve IC_{30} değeri 18 μ M olarak hesaplanmıştır. Farklı sürelerde inkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p < 0.05$) Çizelge 4.2’de verilmiştir.

En yüksek resveratrol konsantrasyonunu hazırlamak için çözücü olarak kullandığımız %0.5 DMSO konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında hücre canlılığını önemli derecede etkilemediği bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Resveratrol konsantrasyonlarının MRC-5 hücre dizisi üzerine sitotoksik etkisi

Resveratrol konsantrasyonları μ M	% Canlı hücre 24 saatlik inkübasyon $X \pm S.H.$	% Canlı hücre 48 saatlik inkübasyon $X \pm S.H.$	% Canlı hücre 72 saatlik inkübasyon $X \pm S.H.$
10	98 ± 1.9 ij	95 ± 2.2 i	80 ± 1.9 gh
15	96 ± 1.7 ij	90 ± 2.3 hi	76 ± 1.8 gh
25	93 ± 1.8 i	80 ± 1.7 gh	68 ± 1.6 fg
50	83 ± 1.8 h	72 ± 1.6 g	58 ± 1.3 ef
75	76 ± 1.6 g	65 ± 1.5 f	50 ± 1.4 de
100	70 ± 1.9 fg	61 ± 1.6 f	45 ± 1.2 d
150	63 ± 1.8 f	50 ± 1.4 de	35 ± 1.1 c
200	53 ± 1.4 e	43 ± 1.3 d	30 ± 1.1 bc
300	42 ± 1.6 d	33 ± 1.4 c	23 ± 1.9 b
400	38 ± 1.5 cd	30 ± 0.9 bc	18 ± 1.0 ab
500	35 ± 1.4 c	26 ± 0.4 bc	16 ± 0.9 ab
600	33 ± 1.3 c	25 ± 0.7 b	15 ± 0.6 a
700	30 ± 1.2 bc	22 ± 0.8 b	14 ± 0.4 a
800	27 ± 0.9 bc	20 ± 0.5 ab	12 ± 0.3 a
KONTROL	100 ± 2.1 ij	100 ± 2.3 ij	100 ± 1.8 ij
% 0.5 DMSO	99 ± 2.3 ij	98 ± 2.0 ij	98 ± 1.9 ij

X: Beş tekrarın ortalaması olup ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). S.H. : Standart Hata.



Şekil 4.2. MRC-5 hücrelerinde artan resveratrol konsantrasyonlarına karşı hücre canlılığı

Resveratrolün değişik konsantrasyonlarının (0-800 µM) H1299 ve MRC-5 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucu her iki hücre dizisinde de Resveratrolün zamana ve konsantrasyona bağlı olarak prooksidan gibi davranarak sitotoksitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Yapılan sitotoksite ölçümleri sonucunda 24, 48 ve 72 saat için IC_{50} ve IC_{70} değerleri belirlenmiş ve Çizelge 4.3’de verilmiştir. Her iki hücre dizisini karşılaştırdığımızda, resveratrol sitotoksitesine karşı H1299 hücreleri MRC-5 hücrelerinden daha duyarlı bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücre dizilerinde hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri

Hücreler	24 saatlik inkübasyon	48 saatlik inkübasyon	72 saatlik inkübasyon
H1299 (IC_{50})	200 µM	100 µM	50 µM
H1299 (IC_{70})	500 µM	300 µM	125 µM
MRC-5 (IC_{50})	250 µM	150 µM	75 µM
MRC-5 (IC_{70})	700 µM	400 µM	200 µM

Resveratrol'le 72 saat inkübasyonu sonucu H1299 hücrelerinin IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri sırasıyla 50 µM ve 125 µM olarak belirlenirken MRC-5 hücrelerinin IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri sırasıyla 75 µM ve 200 µM olarak belirlenmiştir. Resveratrolün antioksidan (koruyucu) etkisinin belirlenmesinde, MDA ve glutasyon miktarlarının belirlenmesinde ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesinde 72 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen sitotoksik verileri kullanılmıştır.

Her iki hücre dizisinde de literatür bilgilerinde antioksidan olarak bilinen resveratrol, çalışmamızda artan konsantrasyonlarda sitotoksik etkisini arttırarak prooksidan gibi etki göstermiştir.

4.2. Hidrojen Peroksitin H1299 ve MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Hidrojen Peroksitin (H₂O₂) H1299 ve MRC-5 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, Cell Titer-Blue^R viability assay kiti kullanılarak ölçülmüştür. Flaskta üretilmiş hücreler tripsinize edildikten sonra sayılarak 96-kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. H₂O₂ konsantrasyonları seri olarak besiyeri ile seyreltilerek içerisinde hücre bulunan kuyucuklara konulmuştur. Hücreler 72 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin rezozurini resofurine redüksiyonunun floresanspektrofotometrede (560_{Eks}/590_{Ems}) ölçülmesiyle IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC₇₀ (hücrelerin %70'ini öldüren konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır.

4.2.1. Hidrojen Peroksitin H1299 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

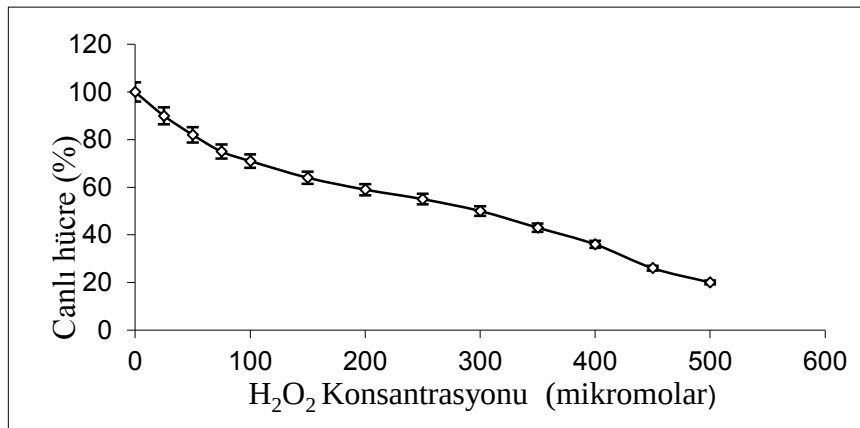
Çok güçlü bir oksidan olan H₂O₂'in hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi hücrelerin farklı konsantrasyonlarda (0-500 µM) H₂O₂'e 72 saat maruz bırakılmasıyla bulunmuştur. H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarının H1299 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.3).

Artan H₂O₂ konsantrasyonuna paralel olarak sitotoksik etki de artmıştır. Uygulanan H₂O₂ konsantrasyonları Çizelge 4.4'de verilmiştir. H1299 hücrelerinin H₂O₂ ile 72 saatlik inkübasyonu sonucunda IC₅₀ değeri 300 µM, IC₇₀ değeri 420 µM bulunmuştur. H₂O₂ konsantrasyonlarının uygulamalarında ortaya çıkan sitotoksik etkilerdeki istatistiksel farklılıklar (p<0.05) Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. H₂O₂ konsantrasyonlarının H1299 hücre dizisine sitotoksik etkisi

H ₂ O ₂ konsantrasyonu (μM)	% Canlı hücre 72 saatlik inkübasyon X ± S.H.
0	100 ± 1.9 hi
25	90 ± 1.6 h
50	82 ± 2.1 gh
75	75 ± 1.4 fg
100	71 ± 1.3 fg
150	64 ± 1.8 ef
200	59 ± 1.5 de
250	55 ± 1.3 de
300	50 ± 1.1 d
350	43 ± 1.2 cd
400	36 ± 1.1 c
450	26 ± 1.3 ab
500	20 ± 1.2 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05) S.H.: Standart Hata

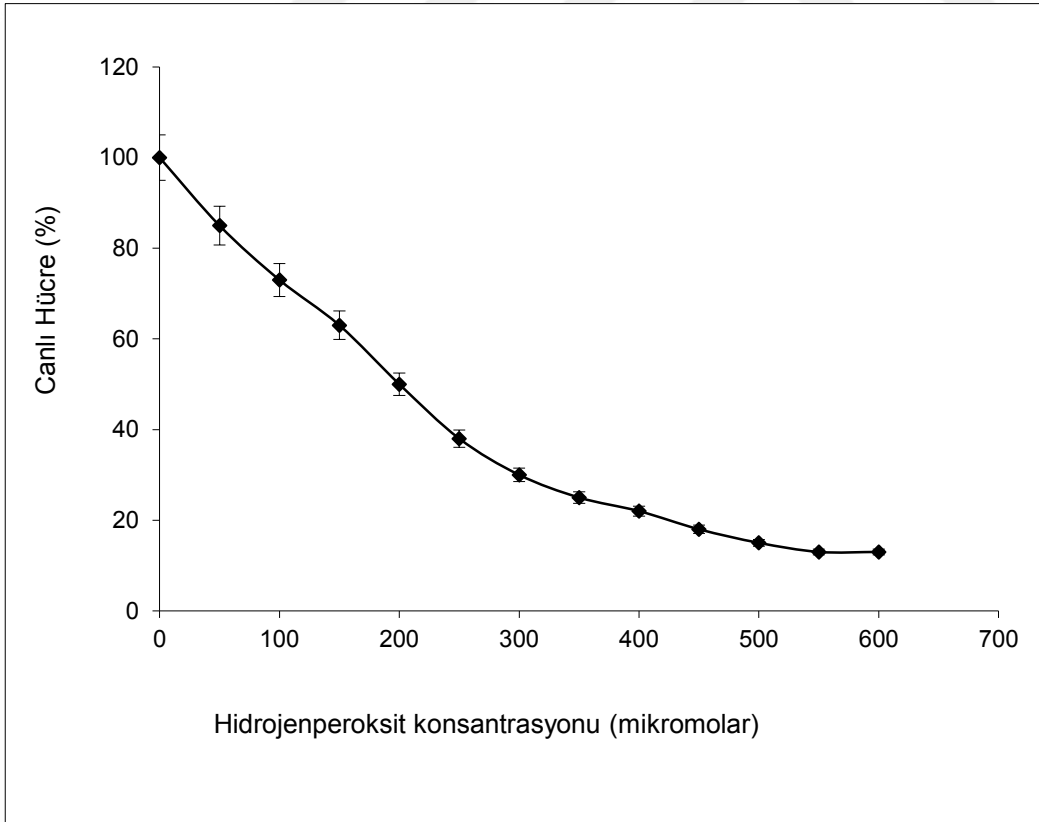
Şekil 4.3. H₂O₂'in H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

4.2.2. Hidrojen Peroksit'in MRC-5 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

H_2O_2 'in hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisi hücrelerin farklı konsantrasyonlarda (0-500 μM) H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakılmasıyla bulunmuştur. H_2O_2 'in farklı konsantrasyonlarının MRC-5 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.4).

Uygulanan H_2O_2 konsantrasyonları Çizelge 4.5'de verilmiştir. MRC-5 hücrelerinin H_2O_2 ile 72 saatlik inkübasyonu sonucunda IC_{50} değeri 200 μM , IC_{70} değeri 300 μM bulunmuştur. H_2O_2 konsantrasyonlarının uygulamalarında ortaya çıkan sitotoksik etkilerdeki istatistiksel farklılıklar ($p < 0.05$) Çizelge 4.5'de verilmiştir.

H_2O_2 'nin değişik konsantrasyonlarının H1299 ve MRC-5 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucu her iki hücre dizisinde de H_2O_2 konsantrasyona bağlı olarak sitotoksitesinin arttığı görülmüştür. Yapılan sitotoksik ölçümleri sonucunda 72 saat için IC_{50} değerleri belirlenmiştir. H_2O_2 ile 72 saat inkübasyonu sonucu H1299 hücrelerinin IC_{50} ve IC_{70} değerleri sırasıyla 300 μM ve 420 μM olarak belirlenirken MRC-5 hücrelerinin IC_{50} ve IC_{70} değerleri sırasıyla 200 μM ve 300 μM olarak belirlenmiştir. H_2O_2 'nin 72 saat uygulamalarından elde edilen IC_{50} ve IC_{70} değerlerine göre MRC-5 hücrelerinin H_2O_2 'e daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.4. H_2O_2 'nin MRC-5 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Çizelge 4.5. H₂O₂ konsantrasyonlarının MRC-5 hücre dizisine sitotoksik etkisi

H ₂ O ₂ konsantrasyonu (µM)	% Canlı hücre 72 saatlik inkübasyon X ± S.H.
50	85 ± 1.4 h
100	73 ± 1.3 g
150	63 ± 1.2 f
200	50 ± 1.1 de
250	38 ± 0.8 cd
300	30 ± 0.9 bc
350	25 ± 1.1 b
400	22 ± 1.4 b
450	18 ± 1.3 ab
500	15 ± 1.2 a
550	13 ± 1.1 a
KONTROL	100 ± 1.3 i

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05) S.H.: Standart Hata

4.3. Resveratrolün Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi

Resveratrolün hücreler üzerine koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymak için, hücreler IC₅, IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ (<IC₅₀) konsantrasyonlarında ayrı ayrı resveratrol ile bir saat ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra, devamında 72 saat boyunca güçlü bir prooksidan olan H₂O₂'e (IC₅₀, IC₇₀) maruz bırakılmıştır. Sitotoksikite sonuçlarına bakılarak Resveratrolün H₂O₂'e karşı en yüksek koruyucu (antioksidan) etki gösterdiği kombinasyon konsantrasyonu belirlenmiştir.

4.3.1. Resveratrolün H1299 Hücreleri Üzerine Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi

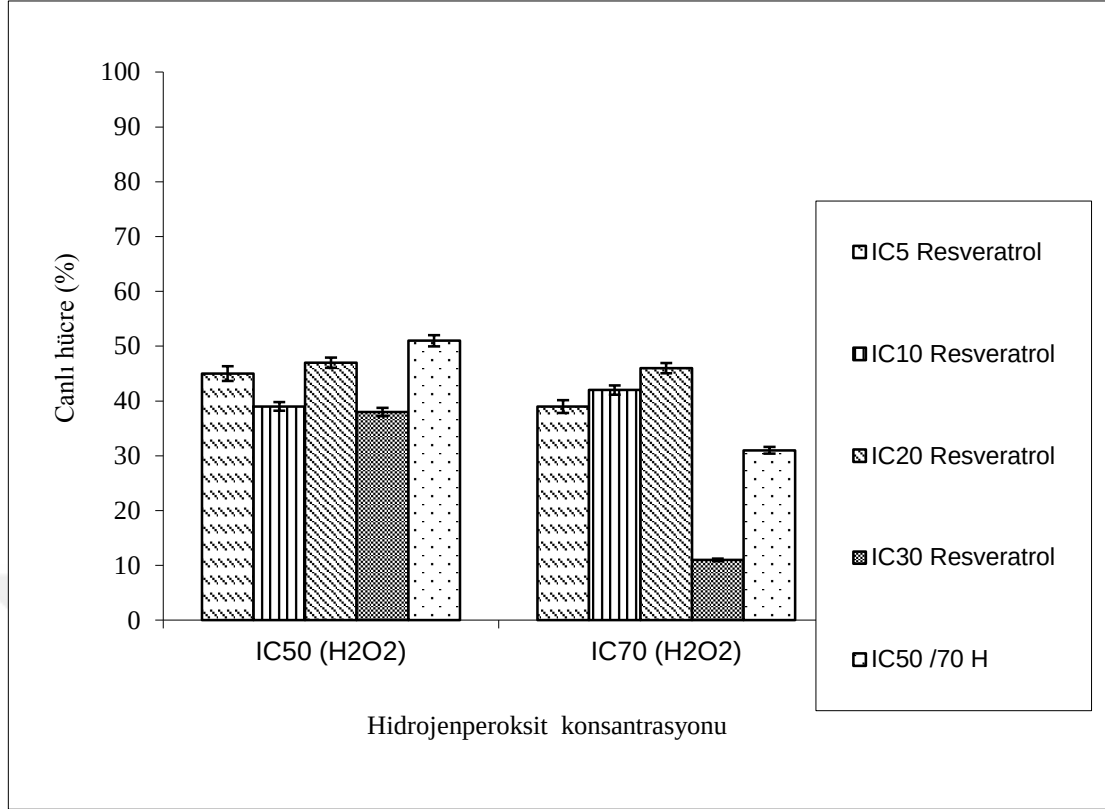
IC₅, IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ konsantrasyonlarında resveratrol ile ön uygulamaya maruz bırakılan H1299 hücrelerinde Resveratrolün güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı antioksidan (koruyucu) etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.5). Resveratrol ile ön

uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 72 saat H_2O_2 'e maruz bırakılarak elde edilen sitotoksik etki sonuçları ve istatistiksel farklılıkları ($p<0.05$) çizelge 4.6'da verilmiştir. H1299 hücrelerinde hem IC_{50} hem de IC_{70} H_2O_2 konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC_{30} resveratrol konsantrasyonu ile kombinasyonda görülmüştür.

Çizelge 4.6. H_2O_2 sitotoksitesine karşı Resveratrolün ($<IC_{50}$) H1299 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi

Resveratrol konsantrasyonları (μM) + H_2O_2 (μM) konsantrasyonları	% Canlı hücre $X \pm S.H.$	Artan canlı hücre oranları
$IC_{50} H + IC_5 R$	$45 \pm 1.2 d$	1
$IC_{50} H + IC_{10} R$	$39 \pm 1.3 cd$	0.65
$IC_{50} H + IC_{20} R$	$47 \pm 1.2 de$	0.98
$IC_{50} H + IC_{30} R$	$38 \pm 1.4 cd$	1.9
$IC_{50} H$	$51 \pm 1.6 e$	1.02
$IC_{70} H + IC_5 R$	$39 \pm 1.3 cd$	1.56
$IC_{70} H + IC_{10} R$	$42 \pm 1.4 d$	2.1
$IC_{70} H + IC_{20} R$	$46 \pm 1.2 de$	4.6
$IC_{70} H + IC_{30} R$	$11 \pm 1.1 a$	11
$IC_{70} H$	$31 \pm 1.3 c$	1.03
KONTROL	$100 \pm 1.9 f$	1

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda aynı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p<0.05$) S.H.: Standart Hata



Şekil 4.5. H₂O₂ sitotoksitesine karşı farklı konsantrasyonlarda Resveratrolün (<IC₅₀) H1299 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi

4.3.2. Resveratrolün MRC-5 Hücreleri Üzerine Antioksidan (Koruyucu) Etkilerinin Belirlenmesi

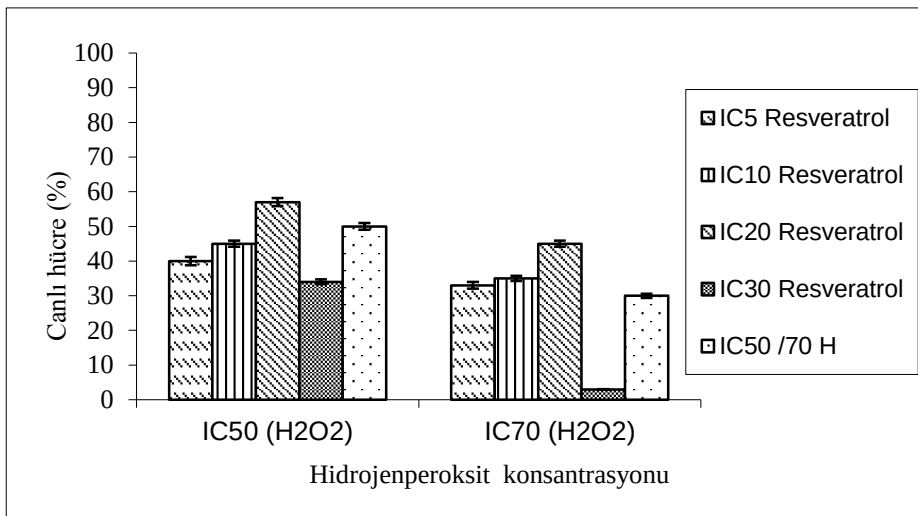
Resveratrol ile ön uygulamaya maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde IC₅, IC₁₀, IC₂₀ ve IC₃₀ resveratrol konsantrasyonlarının güçlü bir oksidan olan H₂O₂'e karşı antioksidan (koruyucu) etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.6). Resveratrol ile ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 72 saat H₂O₂'e maruz bırakılarak bulunan sitotoksik etki sonuçları ve istatistiksel farklılıklar (p<0.05) Çizelge 4.7'de verilmiştir. MRC-5 hücrelerinde hem IC₅₀ hem de IC₇₀ H₂O₂ konsantrasyonlarına karşı en yüksek antioksidan etki IC₂₀ resveratrol konsantrasyonunda görülmüştür.

Yapılan sitotoksikite ölçümleri sonucunda en yüksek koruyucu etki gösteren konsantrasyon H1299 hücrelerinde IC₃₀ olarak belirlenirken MRC-5 hücrelerinde IC₂₀ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. H₂O₂ sitotoksitesine karşı Resveratrolün (<IC₅₀) MRC-5 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi

Resveratrol konsantrasyonları (μ M) +H ₂ O ₂ (μ M) konsantrasyonları	% Canlı hücre X $\pm$ S.H.	Artan canlı hücre oranları
IC ₅₀ H + IC ₅ R	40 $\pm$ 0.9 de	0.8
IC ₅₀ H + IC ₁₀ R	45 $\pm$ 1.1 e	1.125
IC ₅₀ H + IC ₂₀ R	57 $\pm$ 1.2 fg	1.9
IC ₅₀ H + IC ₃₀ R	34 $\pm$ 1.3 d	1.7
IC ₅₀ H (kontrol)	50 $\pm$ 1.2 ef	1
IC ₇₀ H+IC ₅ R	33 $\pm$ 1.4 d	1.32
IC ₇₀ H+IC ₁₀ R	35 $\pm$ 1.3 d	1.75
IC ₇₀ H+IC ₂₀ R	45 $\pm$ 1.5 e	4.5
IC ₇₀ H+IC ₃₀ R	3 $\pm$ 1.0 a	3
IC ₇₀ H (kontrol)	30 $\pm$ 1.1 cd	1
KONTROL	100 $\pm$ 1.6 h	1

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri kapsayan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05) S.H.: Standart Hata.

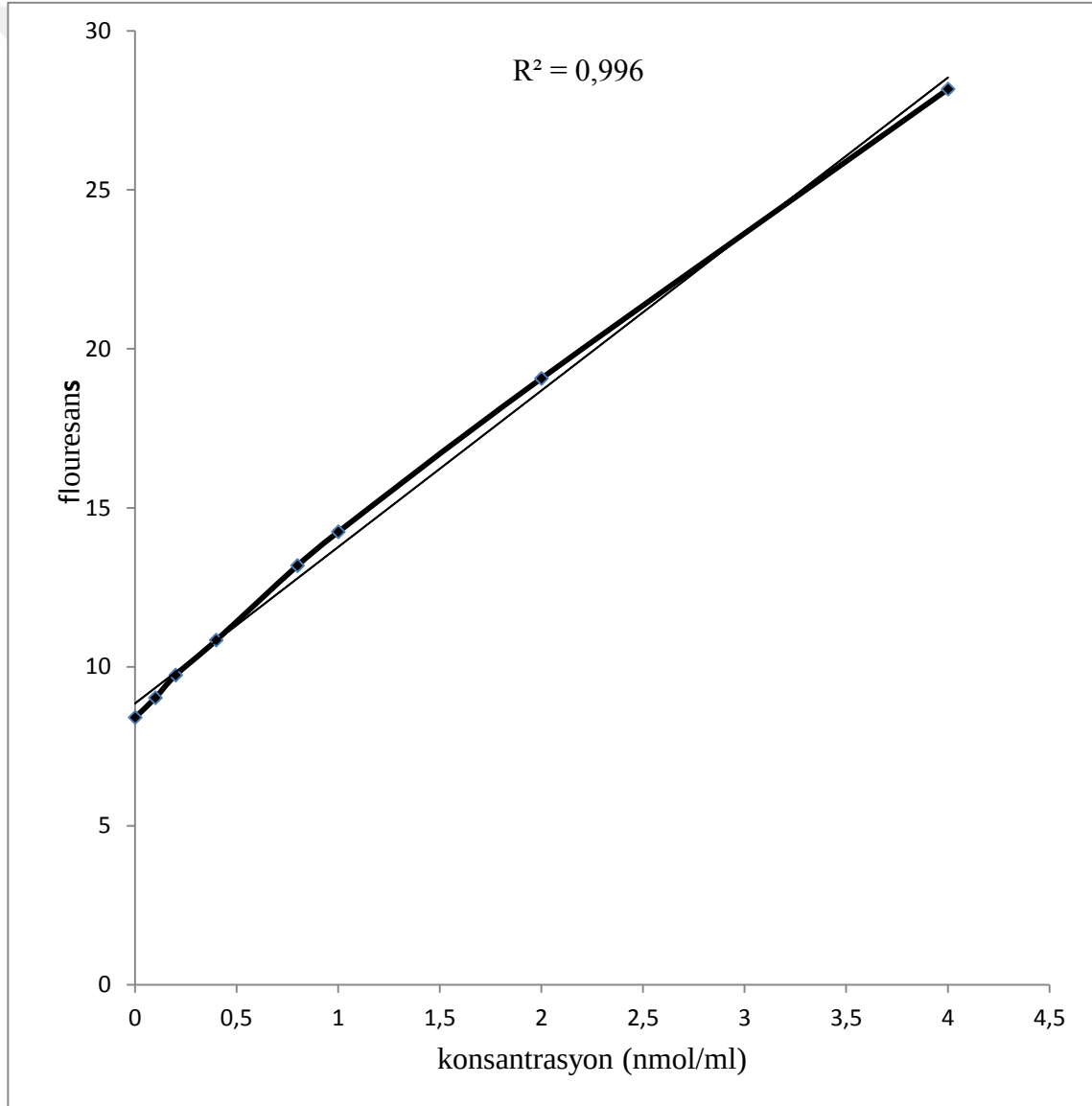


Şekil 4.6. H₂O₂ sitotoksitesine karşı farklı konsantrasyonlarda Resveratrolün (<IC₅₀) MRC-5 hücreleri üzerine antioksidan (koruyucu) etkisi

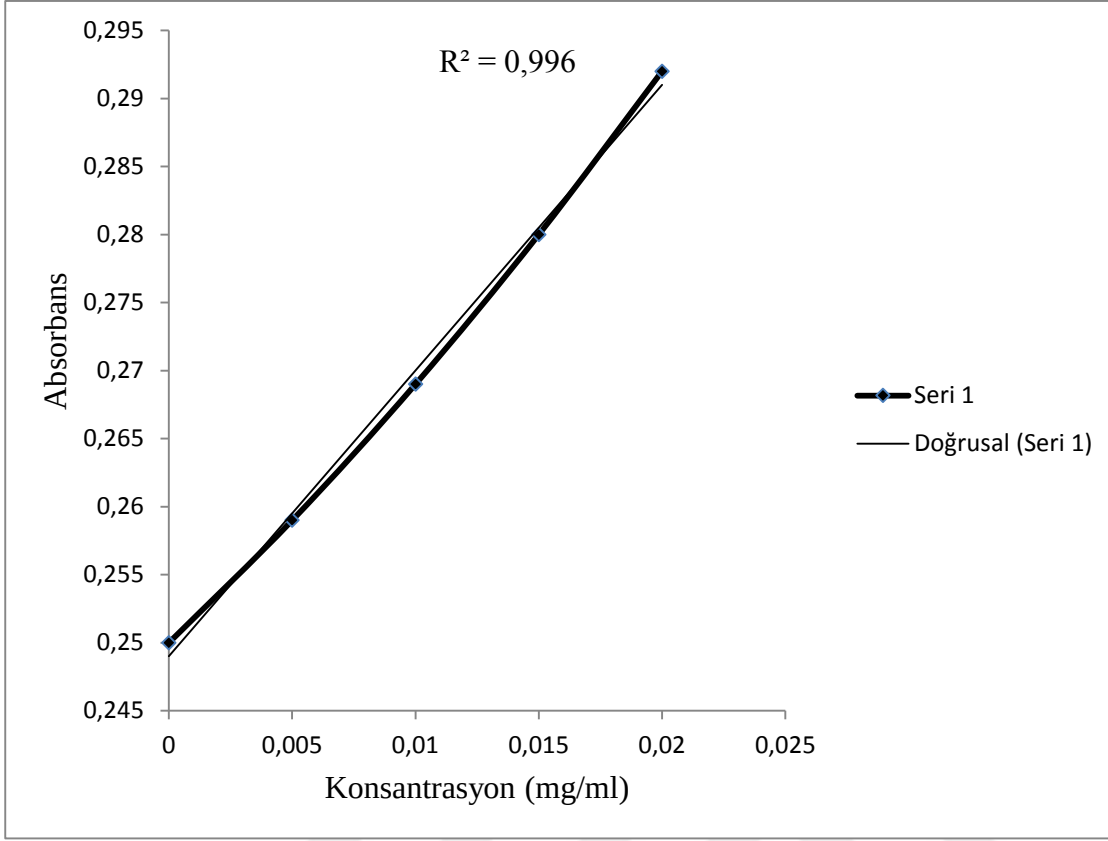
4.4. Resveratrolün Hücre Membranı Üzerine Etkisi

H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC_{30}/IC_{20} , IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki Resveratrole ve IC_{50} ve IC_{70} H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca Resveratrolün H_2O_2 'e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC_{30} (H1299 hücrelerinde) ve IC_{20} (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona bırakılmış devamında 72 saat H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılarak MDA (malondealdehit) miktarlarındaki değişim araştırılmıştır. MDA miktarları MDA ve BSA standart grafiğinden yararlanılarak nmol/mg protein olarak belirtilmiştir.

MDA standart grafiği ($y=4,921x + 8,851$) şekil 4.7'de verilmiştir. BSA standart grafiği ($y=2,1x + 0,249$) Şekil 4.8'de verilmiştir.



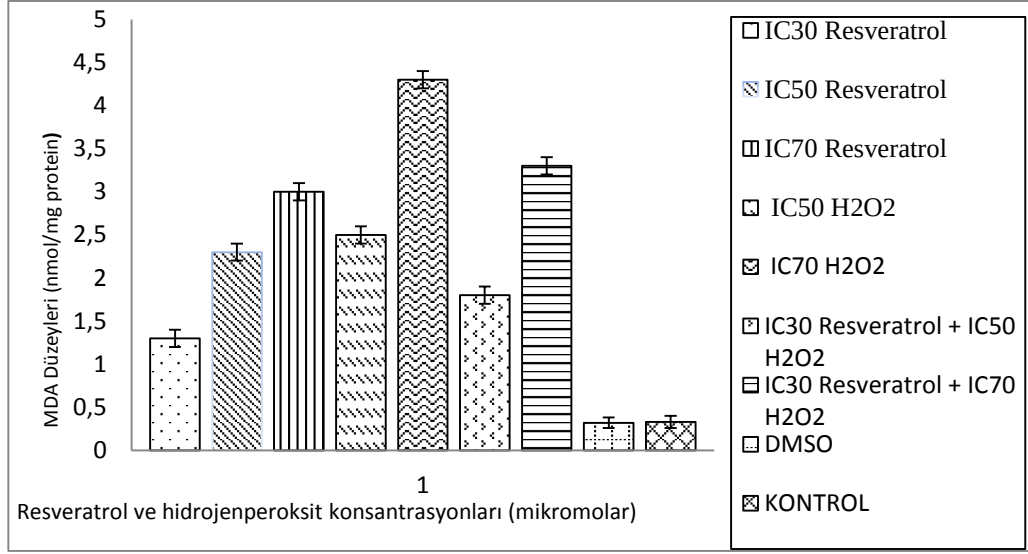
Şekil 4.7. MDA standart grafiği



Şekil 4.8. BSA standart grafiği

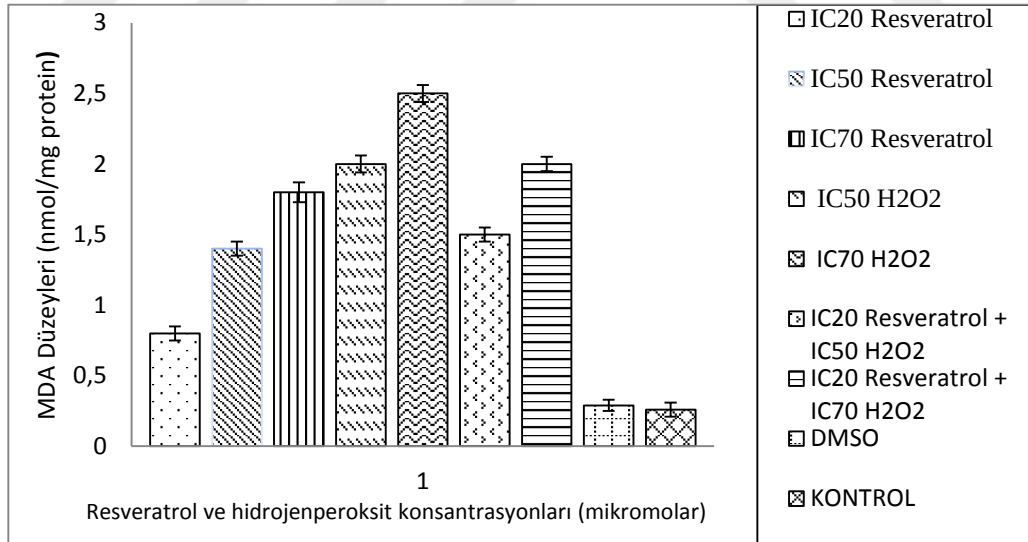
Tek başına Resveratrole (IC_{30} , IC_{50} , IC_{70}), H_2O_2 'e (IC_{50} , IC_{70}) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 hücrelerinde MDA miktarı, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.8). Konsantrasyona bağlı olarak MDA miktarındaki farklılıklar istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) önemlidir.

Resveratrolün IC_{30} konsantrasyonu (H1299 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücreleri, devamında IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre membranı koruyucu (antioksidan) etkisi ortaya konmuştur (Şekil 4.9). IC_{30} resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında oluşan MDA miktarları, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücelere göre %28 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu MDA miktarındaki artış tek başına uygulamaya göre %23 azalmıştır. H_2O_2 'in tek başına ve resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki MDA miktarındaki azalış Resveratrolün membran koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.9. Resveratrole maruz bırakılan H1299 hücrelerinde MDA miktarı.

Hücrelerin tek başına Resveratrolün farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla oluşan MDA miktarı konsantrasyona bağlı olarak değişim göstermiştir (Çizelge 4.8). IC₅₀ ve IC₇₀ resveratrol konsantrasyon uygulamalarında konsantrasyonun artmasıyla MDA miktarı da artmıştır ve bu konsantrasyonlardaki artış birbirlerinden ve kontrolden farklı ($p < 0.05$) bulunmuştur.



Şekil 4.10. Resveratrole maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde MDA miktarı.

Resveratrolün IC₂₀ konsantrasyonu (MRC-5 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücreleri, devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre membranı koruyucu (antioksidan) etkisi ortaya konmuştur (Şekil 10). IC₂₀ resveratrol

konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında oluşan MDA miktarları, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %25 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu MDA miktarındaki artış tek başına uygulamaya göre %20 azalmıştır. H₂O₂'in tek başına ve resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki MDA miktarındaki azalış Resveratrolün membran koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.05).

Ancak, resveratrol düşük konsantrasyonlarda güçlü bir oksidanla kombine uygulamalarda antioksidan gibi davranarak hücre zarını korurken, tek başına artan (IC₅₀, IC₇₀) konsantrasyonlarda kontrole göre MDA miktarını arttırması prooksidan gibi davrandığını göstermektedir.

Her iki hücre tipinde de kontrole göre en yüksek MDA miktarı IC₇₀ H₂O₂ uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.8)

Çizelge 4.8. Resveratrol'ün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde hücre membranı üzerine etkileri

Uygulanan Konsantrasyonlar	H1299 hücreleri MDA (nmol/mg protein) X $\pm$ S.H.	(MRC-5 cells) MDA (nmol/mg protein) X $\pm$ S.H.
IC ₃₀ / IC ₂₀ Resveratrol	1.3 $\pm$ 0.20 b	0.8 $\pm$ 0.03 ab
IC ₅₀ Resveratrol	2.3 $\pm$ 0.32 c	1.4 $\pm$ 0.03 b
IC ₇₀ Resveratrol	3.0 $\pm$ 0.45 cd	1.8 $\pm$ 0.04 bc
IC ₅₀ H ₂ O ₂	2.5 $\pm$ 0.45 c	2.0 $\pm$ 0.06 bc
IC ₇₀ H ₂ O ₂	4.3 $\pm$ 0.34 e	2.5 $\pm$ 0.08 c
Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	1.8 $\pm$ 0.25 bc	1.5 $\pm$ 0.03 b
Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	3.3 $\pm$ 0.45 d	2.0 $\pm$ 0.03 bc
DMSO	0.32 $\pm$ 0.13 a	0.29 $\pm$ 0.02 a
Kontrol	0.33 $\pm$ 0.15 a	0.26 $\pm$ 0.01 a

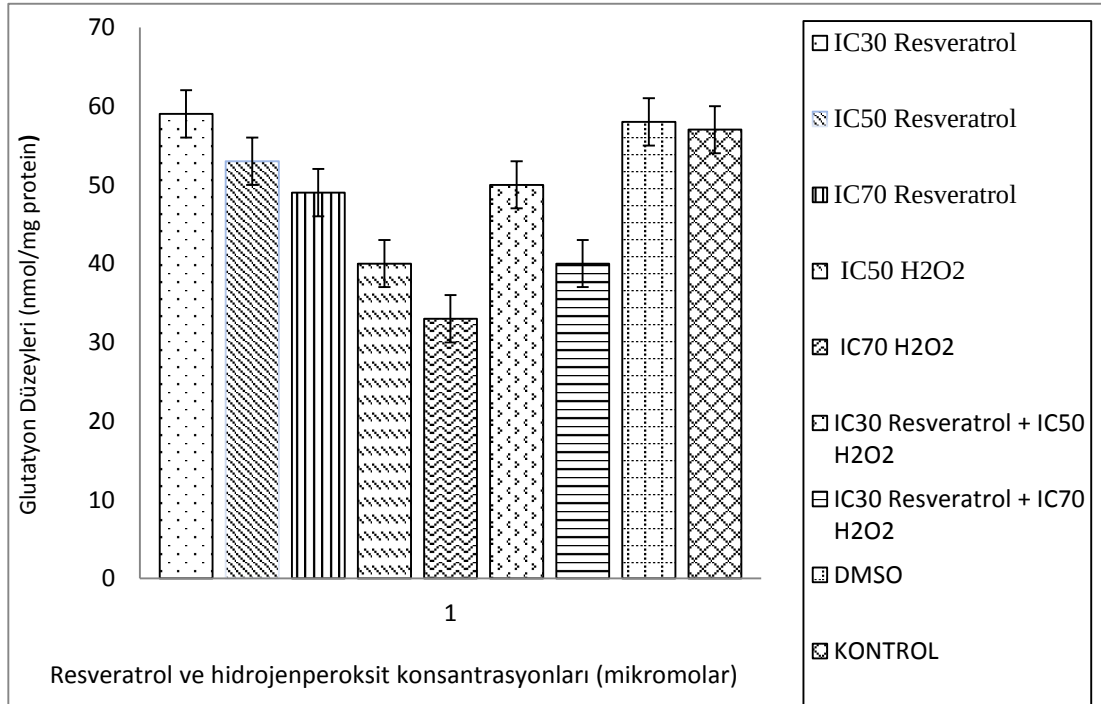
X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önem de farklı bulunmuştur (p<0,05). S.H.; Standart Hata

4.5. Resveratrolün Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi

H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC₃₀/IC₂₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki Resveratrole ve IC₅₀ ve IC₇₀ H₂O₂'e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca Resveratrolün H₂O₂'e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC₃₀ (H1299 hücrelerinde) ve IC₂₀ (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona bırakılmış devamında 72 saat H₂O₂'e (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılarak glutasyon miktarlarındaki değişim araştırılmıştır.

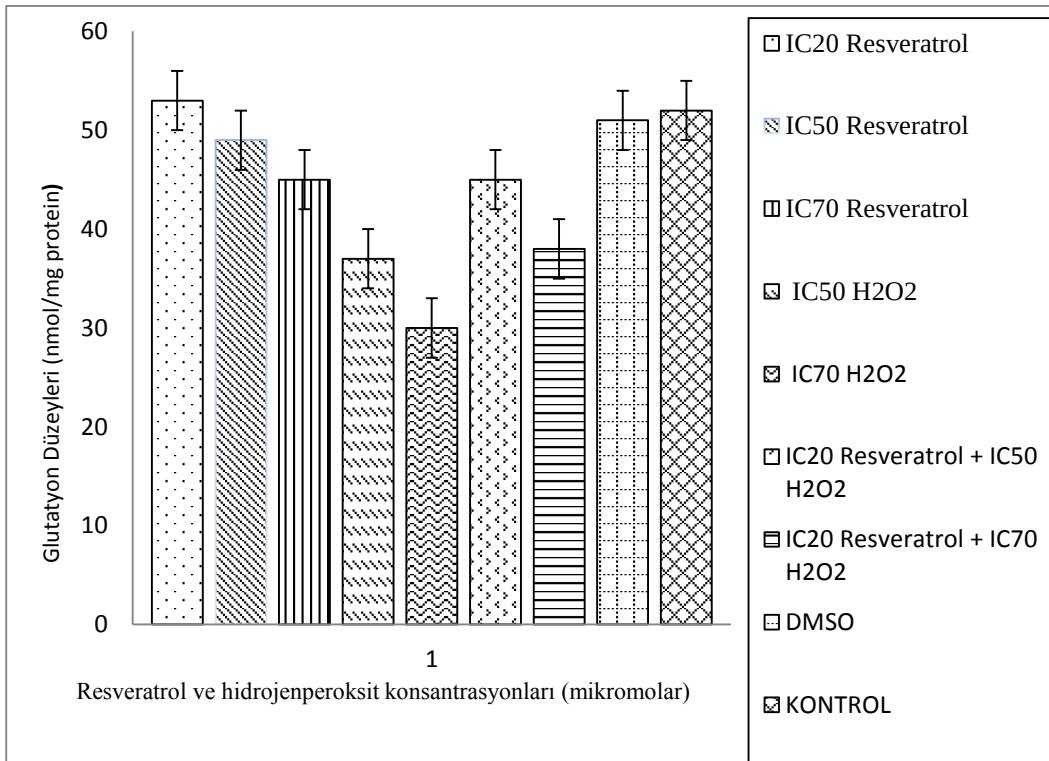
Farklı konsantrasyonlarda tek başına Resveratrole (IC₃₀, IC₅₀, IC₇₀), H₂O₂'e (IC₅₀, IC₇₀) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 hücrelerinde glutasyon miktarı, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.9). Konsantrasyona bağlı olarak glutasyon miktarındaki farklılıklar istatistiksel açıdan (p<0.05) önemlidir.

Resveratrolün IC₃₀ konsantrasyonuyla (H1299 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücreleri, devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün glutasyon miktarına (antioksidan) etkisi ortaya konmuştur (şekil 4.11). IC₃₀ resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında azalan GSH miktar, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücelere göre %25 daha azdır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GSH miktarındaki azalış tek başına uygulamaya göre %21 daha az bulunmuştur.



Şekil 4.11. Resveratrolün H1299 hücrelerinde glutasyon miktarına etkisi.

Resveratrolün IC_{20} konsantrasyonu (MRC-5 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücreleri, devamında IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oksidasyonuna karşı Resveratrolün glutatyon miktarına (antioksidan) etkisi ortaya konmuştur (şekil 4.12). IC_{30} resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında azalan GSH miktarı, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılana hücrelere göre %21 daha azdır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu GSH miktarındaki azalış, tek başına uygulamaya göre %27 daha az bulunmuştur.



Şekil 4.12. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde glutatyon miktarına etkisi.

H_2O_2 'in tek başına uygulamasında GSH miktarındaki azalış, resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki GSH miktarındaki azalıştan daha fazla olması, Resveratrolün antioksidan etkisini ortaya koymuştur (çizelge 4.9). Elde edilen veriler istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0.05$). Ancak, resveratrol düşük konsantrasyonlarda güçlü bir oksidanla kombine uygulamalarda antioksidan gibi davranırken, tek başına artan (IC_{50} , IC_{70}) konsantrasyonlarda kontrole göre GSH miktarını azaltarak prooksidan gibi davranmıştır. Resveratrolün IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyon uygulamalarındaki glutatyon miktarı her iki hücre dizisinde de azalmıştır.

Her iki hücre tipinde de kontrole göre en düşük glutatyon miktarı IC_{70} H_2O_2 uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.9)

Çizelge 4.9. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde glutatyon miktarı üzerine etkileri

Uygulanan konsantrasyonlar	H1299 Hücreleri (nmol/mg protein $\pm$ S.H.)	MRC-5 Hücreleri (nmol/mg protein $\pm$ S.H.)
IC ₃₀ /IC ₂₀ Resveratrol	59 $\pm$ 2.10 d	53 $\pm$ 2.32 cd
IC ₅₀ Resveratrol	53 $\pm$ 2.34 cd	49 $\pm$ 2.38 c
IC ₇₀ Resveratrol	49 $\pm$ 2.21 c	45 $\pm$ 2.28 bc
IC ₅₀ H ₂ O ₂	40 $\pm$ 2.33 b	37 $\pm$ 2.29 b
IC ₇₀ H ₂ O ₂	33 $\pm$ 2.20 a	30 $\pm$ 2.28 a
Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	50 $\pm$ 2.55 cd	45 $\pm$ 2.35 bc
Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	40 $\pm$ 2.45 b	38 $\pm$ 2.41 b
DMSO	58 $\pm$ 2.63 d	51 $\pm$ 2.43 cd
Kontrol	57 $\pm$ 1.58 d	52 $\pm$ 1.40 cd

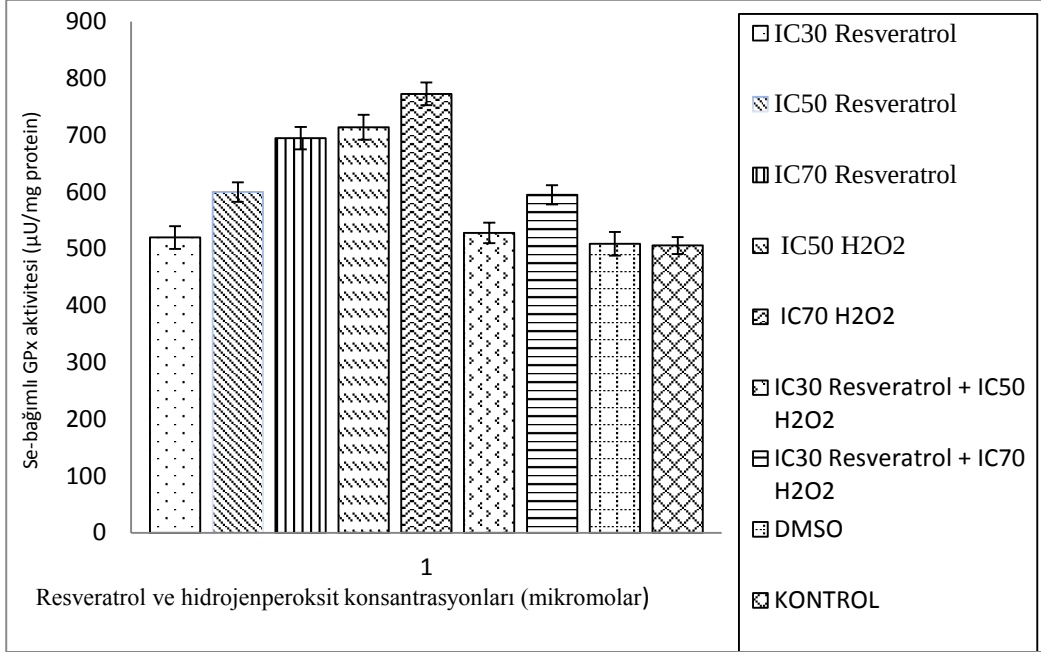
X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0,05). S.H.; Standart Hata

4.6. Resveratrolün Se-bağımlı ve Se-bağımsız Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

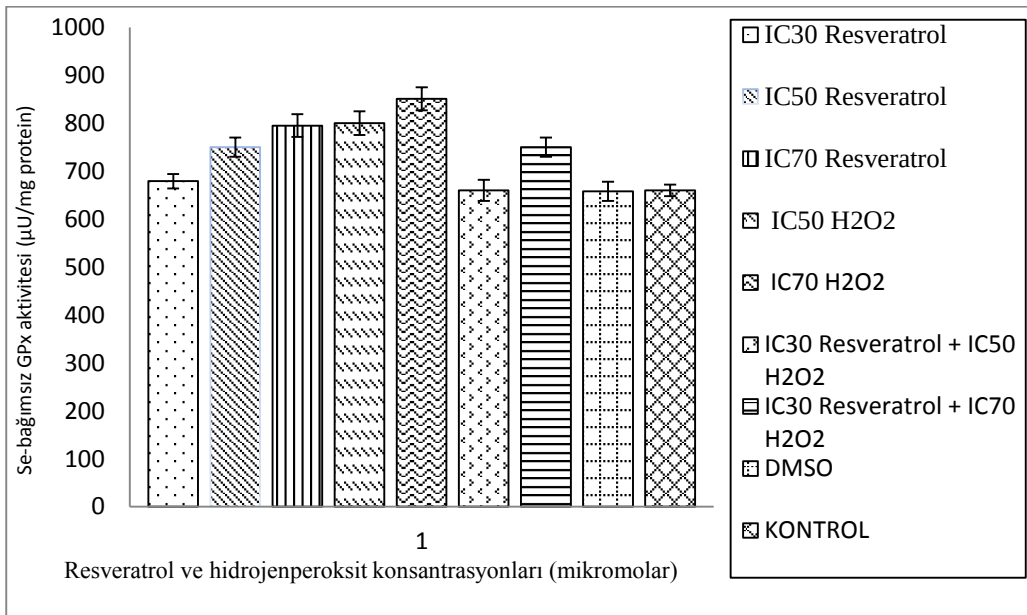
Se-bağımlı-GPx H₂O₂ ve organik hidroperoksitleri indirgeyebilir. Selenyum-bağımsız glutyon peroksidaz (Se-bağımsız-GPx) H₂O₂ için inaktif olup sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizlerler. Hücrelerin antioksidan enzimlerindendir. Hücreler, prooksidan/oksidan bir ajana maruz kaldıklarında kendilerini oksidatif strese karşı korumak için bu enzimi sentezlerler. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkileri Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da gösterilmiştir

H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC₃₀/IC₂₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki Resveratrole ve IC₅₀ ve IC₇₀ H₂O₂’e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca Resveratrolün H₂O₂’e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC₃₀ (H1299 hücrelerinde) ve IC₂₀ (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona bırakılmış devamında 72 saat H₂O₂’e (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılarak Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki değişim araştırılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda tek başına Resveratrole (IC_{30} , IC_{50} , IC_{70}), H_2O_2 'e (IC_{50} , IC_{70}) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 hücrelerinde Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Şekil 4.13 ve 4.14). Uygulanan resveratrol ve H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak değişen Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) önemli bulunmuştur.



Şekil 4.13. Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.14. Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkisi.

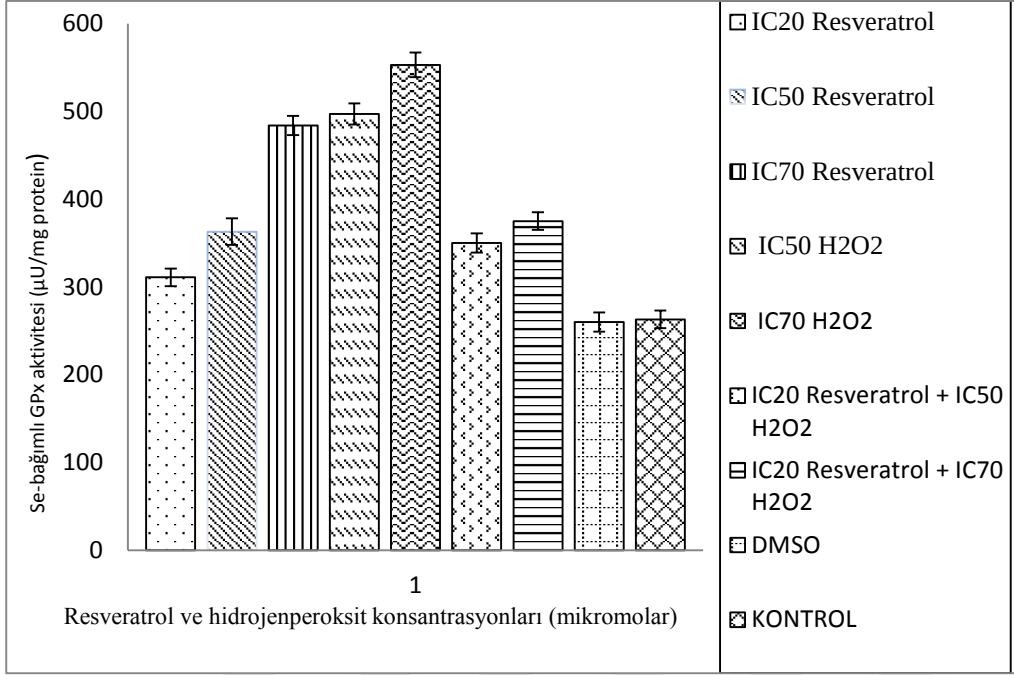
Resveratrolün IC₃₀ konsantrasyonu ile H1299 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücreleri, devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesine etkisi ortaya konmuştur (Çizelge 4.10.). IC₃₀ resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında artan Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre sırasıyla yaklaşık olarak %26 ve %18 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre sırasıyla yaklaşık olarak %23 ve %12 daha az bulunmuştur.

Farklı konsantrasyonlarda tek başına Resveratrole (IC₂₀, IC₅₀, IC₇₀), H₂O₂'e (IC₅₀, IC₇₀) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). Uygulanan resveratrol ve H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak değişen Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan (p<0.05) önemlidir (Çizelge 4.11).

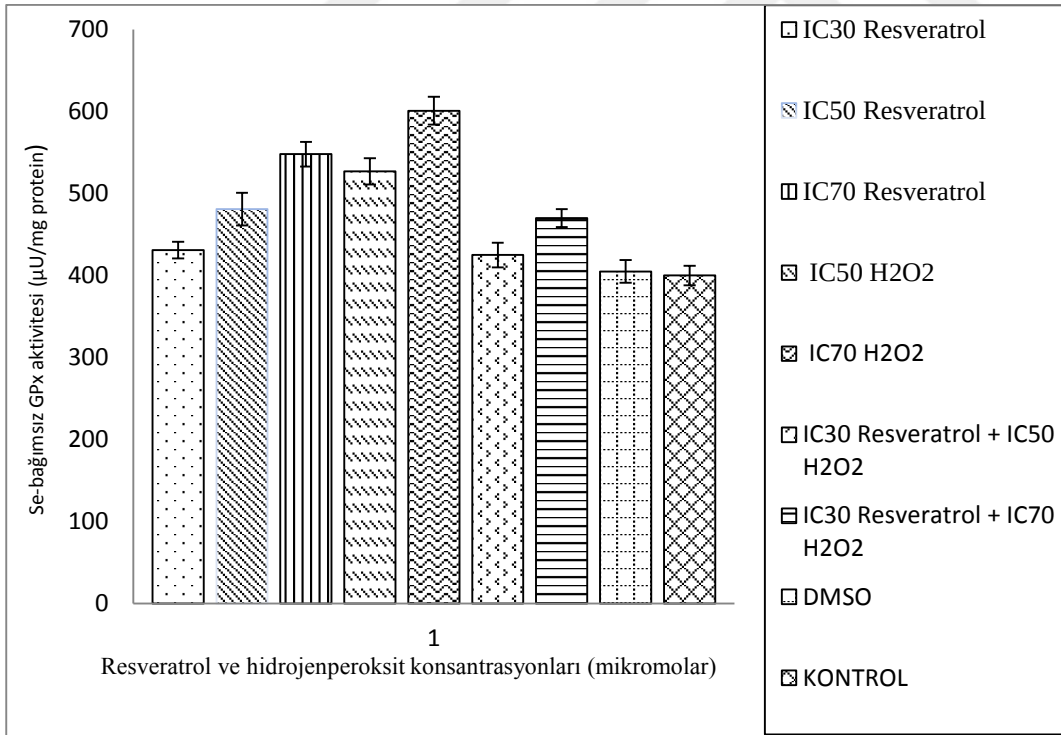
Çizelge 4.10. Resveratrolün H1299 hücrelerinde Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkileri

Uygulanan konsantrasyonlar	Se-bağımlı GPx (μ U/mg $\pm$ SH)	Se-bağımsız GPx (μ U/mg $\pm$ SH)
IC ₃₀ Resveratrol	520 $\pm$ 12 ab	679 $\pm$ 11 b
IC ₅₀ Resveratrol	600 $\pm$ 11 b	750 $\pm$ 12 c
IC ₇₀ Resveratrol	695 $\pm$ 11 c	795 $\pm$ 14 d
IC ₅₀ H ₂ O ₂	714 $\pm$ 13 c	800 $\pm$ 14 d
IC ₇₀ H ₂ O ₂	773 $\pm$ 12 d	851 $\pm$ 15 e
IC ₃₀ Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	528 $\pm$ 14 ab	660 $\pm$ 13 a
IC ₃₀ Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	595 $\pm$ 12 b	750 $\pm$ 14 c
DMSO	509 $\pm$ 12 a	658 $\pm$ 13 a
Kontrol	506 $\pm$ 13 a	660 $\pm$ 14 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0,05). S.H.; Standart Hata



Şekil 4.15. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.16. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkisi.

Resveratrolün IC₂₀ konsantrasyonu (MRC-5 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücreleri,

devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesine etkisi ortaya konmuştu. IC₂₀ resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında artan Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre sırasıyla yaklaşık olarak %30 ve %23 daha az bulunmuştur. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki artış da tek başına uygulamaya göre sırasıyla yaklaşık olarak %32 ve %22 daha az bulunmuştur.

72 saat süreyle IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede artmıştır. (p<0.05). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

Her iki hücre tipinde de en yüksek Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi kontrole göre en yüksek IC₇₀ H₂O₂ uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.10 ve 4.11)

Çizelge 4.11. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi üzerine etkileri

Uygulanan konsantrasyonlar	Se-bağımlı-GSH-Px (μ U/mg $\pm$ SH)	Se-bağımsız-GSH-Px (μ U/mg $\pm$ SH)
IC ₂₀ Resveratrol	311 $\pm$ 12 ab	431 $\pm$ 10 a
IC ₅₀ Resveratrol	363 $\pm$ 11 b	481 $\pm$ 11 b
IC ₇₀ Resveratrol	484 $\pm$ 11 c	527 $\pm$ 12 b
IC ₅₀ H ₂ O ₂	497 $\pm$ 13 c	548 $\pm$ 14 bc
IC ₇₀ H ₂ O ₂	553 $\pm$ 12 cd	601 $\pm$ 13 c
IC ₂₀ Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	350 $\pm$ 14 ab	425 $\pm$ 12 a
IC ₂₀ Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	375 $\pm$ 12 ab	470 $\pm$ 11 b
DMSO	260 $\pm$ 12 a	405 $\pm$ 13 a
Kontrol	263 $\pm$ 13 a	400 $\pm$ 13 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0,05). S.H.; Standart Hata

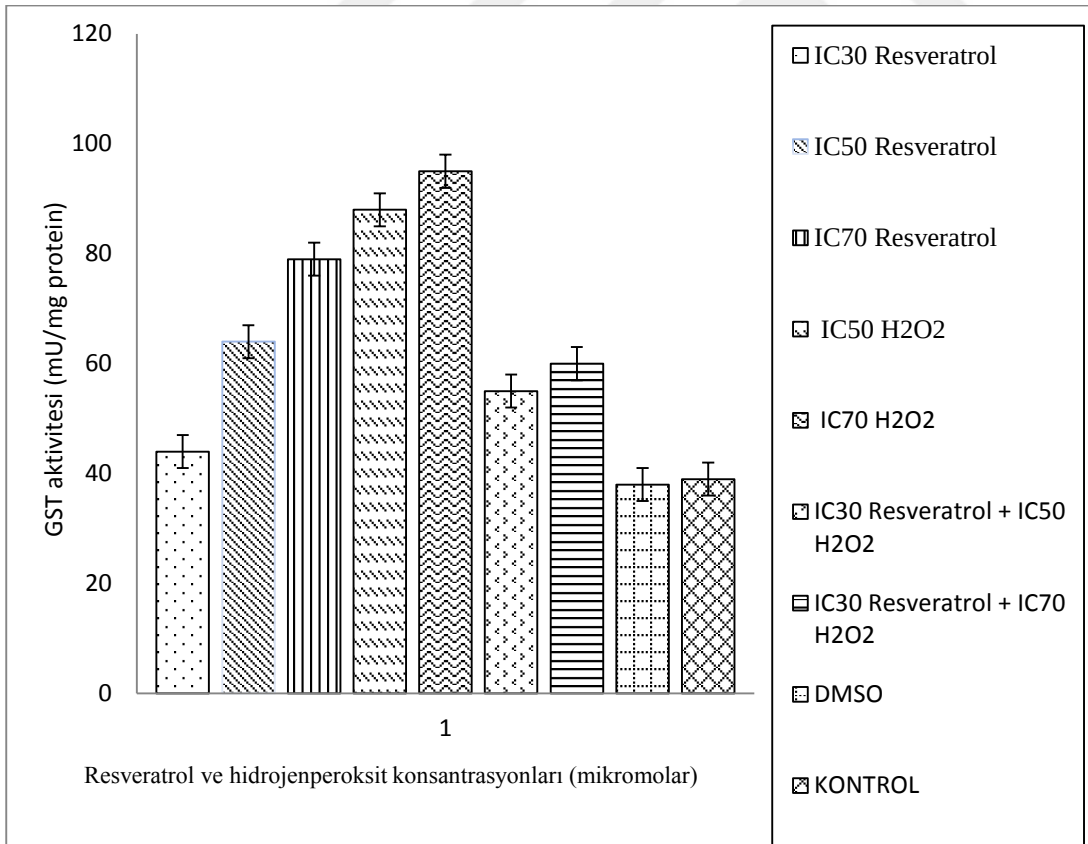
72 saat süreyle IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede artmıştır. (p<0.05). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

Her iki hücre tipinde de en yüksek Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi kontrole göre en yüksek IC₇₀ H₂O₂ uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.10 ve 4.11)

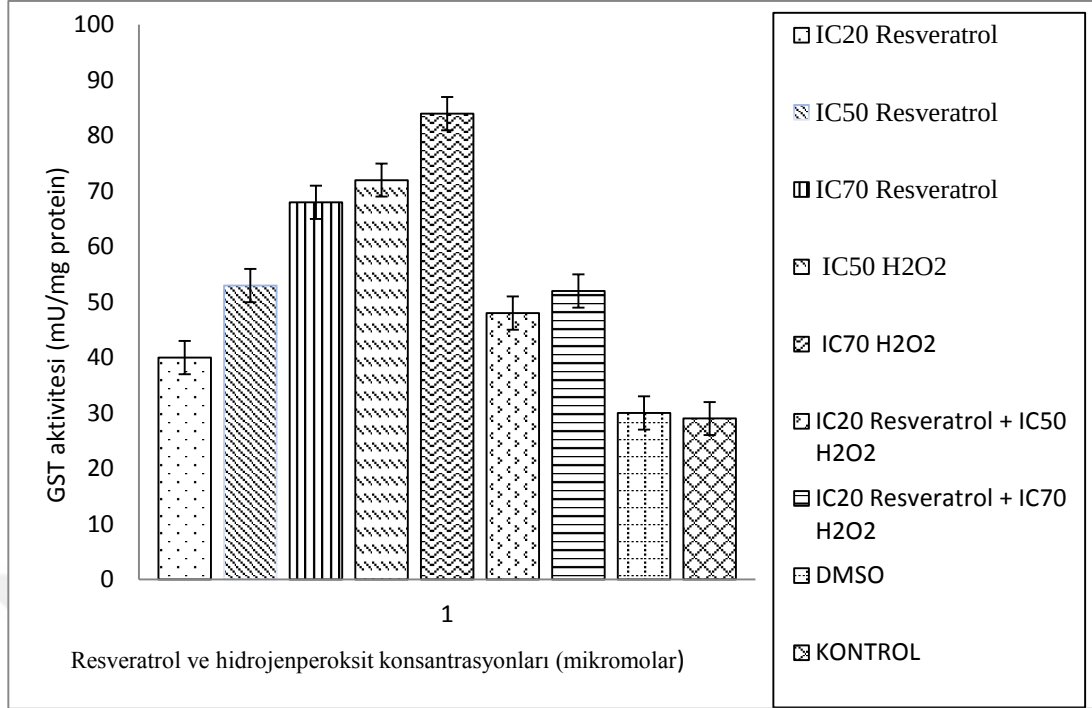
4.7. Resveratrolün Glutasyon S-Transferaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Glutasyon transferazlar, tanımlandığından beri kullanılan ismiyle glutasyon S-transferazlar, endojen ve ekzojen kaynaklı, elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak, genellikle daha kolay atılabilen ve daha az toksik metabolitlere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir.

Glutasyon S-transferaz (GST) hücrelerin koruyucu enzimlerindendir. Hücreler, prooksidan/oksidan bir ajana maruz kaldıklarında kendilerini oksidatif strese karşı korumak için bu enzimi sentezlerler. Resveratrolün GST aktivitesi üzerine etkileri Şekil 4.17 ve 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Resveratrolün H1299 hücrelerinde GST aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.18. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde GST aktivitesi üzerine etkisi.

H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC₃₀/IC₂₀, IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarındaki Resveratrole ve IC₅₀ ve IC₇₀ H₂O₂'e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca Resveratrolün H₂O₂'e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC₃₀ (H1299 hücrelerinde) ve IC₂₀ (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona bırakılmış devamında 72 saat H₂O₂'e (IC₅₀ ve IC₇₀) maruz bırakılarak GST aktivitesindeki değişim araştırılmıştır.

Tek başına Resveratrolün (IC₃₀, IC₅₀, IC₇₀), H₂O₂'in (IC₅₀, IC₇₀) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 hücrelerinde GST aktivitesi, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.12). Konsantrasyona bağlı olarak GST aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan (p<0.05) önemlidir.

Resveratrolün IC₃₀ konsantrasyonu ile H1299 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücreleri, devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisi GST aktivitesindeki değişikliklerle ortaya konmuştur (Çizelge 4.12). IC₃₀ resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GST aktivitesindeki artış, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücelere göre %38 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GST aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %37 azalmıştır. H₂O₂ tek başına uygulandığında artan GST aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GST aktivitesi, Resveratrolün

hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.12. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulanan konsantrasyonlar	H1299 Hücreleri (mU/mg $\pm$ SE)	MRC-5 Hücreleri (mU/mg $\pm$ SE)
IC ₃₀ / IC ₂₀ Resveratrol	44 $\pm$ 4.33 ab	40 $\pm$ 3.01 b
IC ₅₀ Resveratrol	64 $\pm$ 2.33 cd	53 $\pm$ 4.33 c
IC ₇₀ Resveratrol	79 $\pm$ 3.33 e	68 $\pm$ 2.22 e
IC ₅₀ H ₂ O ₂	88 $\pm$ 3.22 f	72 $\pm$ 3.44 ef
IC ₇₀ H ₂ O ₂	95 $\pm$ 4.12 fg	84 $\pm$ 3.54 fg
Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	55 $\pm$ 2.46 bc	48 $\pm$ 2.49 c
Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	60 $\pm$ 2.66 c	52 $\pm$ 3.36 cd
DMSO	38 $\pm$ 1.31 a	30 $\pm$ 1.01 a
Kontrol	39 $\pm$ 1.99 a	29 $\pm$ 1.99 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p<0,05$). S.H.; Standart

Tek başına Resveratrolün (IC₂₀, IC₅₀, IC₇₀), H₂O₂'in (IC₅₀, IC₇₀) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde GST aktivitesi, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.12). Konsantrasyona bağlı olarak GST aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan ($p<0.05$) önemlidir.

Resveratrolün IC₂₀ konsantrasyonu (MRC-5 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücreleri, devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisi GST aktivitesindeki değişikliklerle ortaya konmuştur (Çizelge 4.12). IC₂₀ resveratrol konsantrasyonu ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GST aktivitesindeki artış, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %33 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₂₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GST aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %38 azalmıştır. H₂O₂ tek başına uygulandığında artan GST aktivitesi, diğer taraftan

resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GST aktivitesi, Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve GST enzim aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.05$).

72 saat süreyle IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde GST aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede artmıştır. ($p<0.05$). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

Her iki hücre tipinde de en yüksek GST aktivitesi kontrole göre en yüksek IC_{70} H_2O_2 uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.12)

4.8. Resveratrolün Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

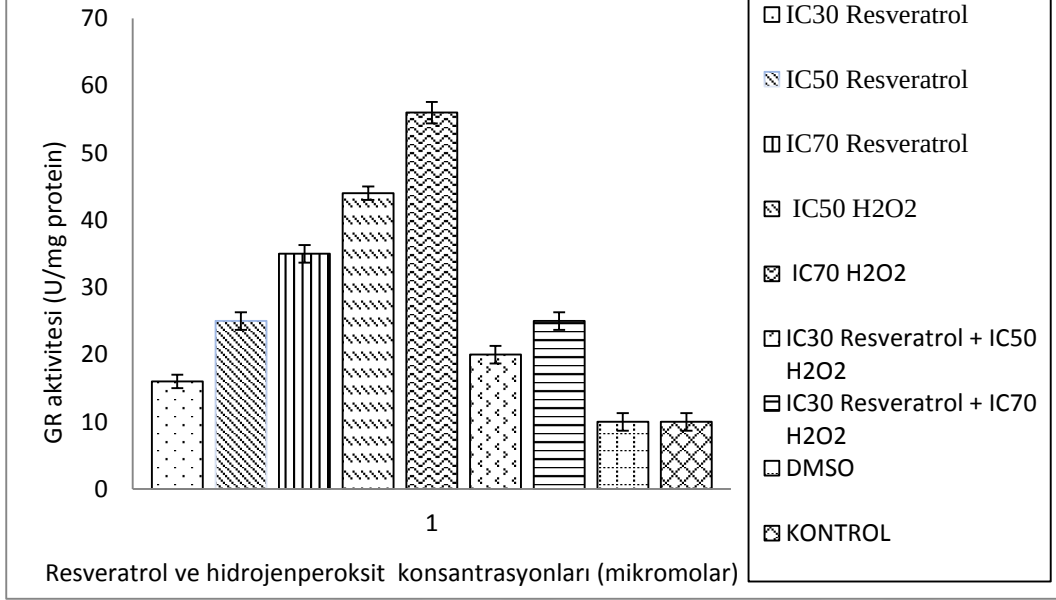
Glutasyon redüktaz (GRx) bir flavo proteindir. NADPH varlığında glutasyon disülfiti ya da okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) katalizler. Glutasyonun dengede tutulmasını sağlar. GPx tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. GRx da oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatyona dönüştürür.

H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC_{30}/IC_{20} , IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki Resveratrole ve IC_{50} ve IC_{70} H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca Resveratrolün H_2O_2 'e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC_{30} (H1299 hücrelerinde) ve IC_{20} (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona bırakılmış devamında 72 saat H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılarak GRx aktivitesindeki değişim araştırılmıştır.

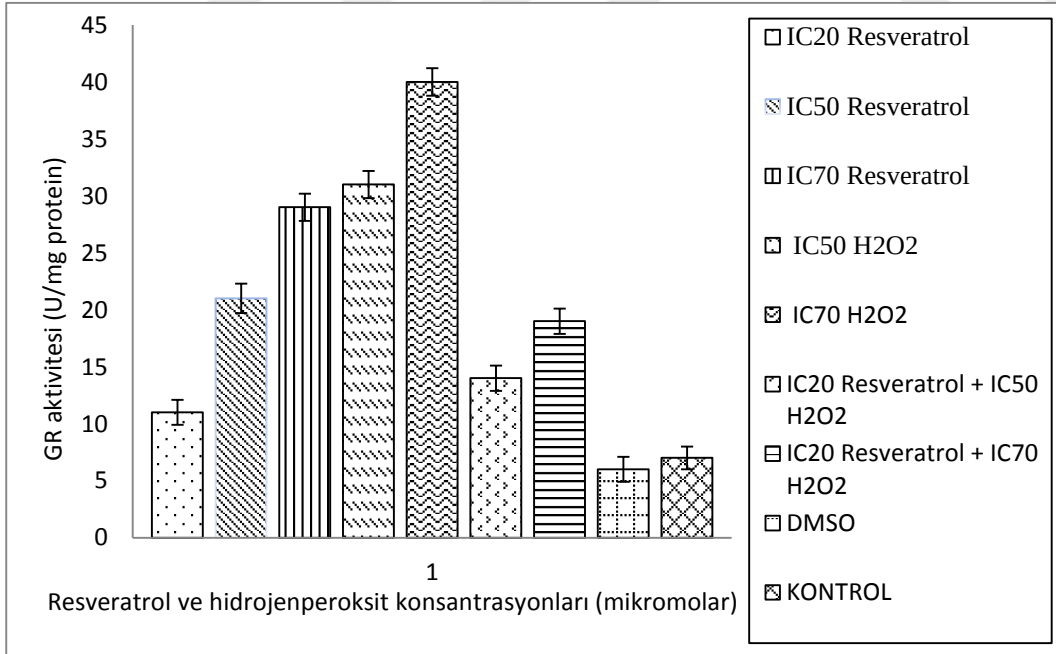
Tek başına Resveratrolün (IC_{30} , IC_{50} , IC_{70}), H_2O_2 'in (IC_{50} , IC_{70}) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 hücrelerinde GRx aktivitesi, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.13). Konsantrasyona bağlı olarak GRx aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan ($p<0.05$) önemlidir.

Resveratrolün IC_{30} konsantrasyonu (H1299 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücreleri, devamında IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında H_2O_2 'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H_2O_2 oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisi GRx aktivitesindeki değişikliklerle ortaya konmuştur (Şekil 4.19). IC_{30} resveratrol konsantrasyonu ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GRx aktivitesindeki artış, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %56 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu GRx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %55 azalmıştır. H_2O_2 tek başına uygulandığında artan GRx aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GRx aktivitesi, Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve elde edilen veriler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Tek başına Resveratrolün (IC_{20} , IC_{50} , IC_{70}), H_2O_2 'in (IC_{50} , IC_{70}) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan MRC-5 hücrelerinde GRx aktivitesi, konsantrasyon artışına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.13). Konsantrasyona bağlı olarak GSH-Rx aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) önemli bulunmuştur..



Şekil 4.19. Resveratrolün H1299 hücrelerinde GRx aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.20. Resveratrolün MRC-5 hücrelerinde GRx aktivitesi üzerine etkisi.

Resveratrolün IC_{20} konsantrasyonu (MRC-5 hücrelerinde en güçlü antioksidan etki konsantrasyonu) ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücreleri,

devamında IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında H₂O₂'e 72 saat süre maruz bırakılarak güçlü bir oksidan olan H₂O₂ oksidasyonuna karşı Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisi GRx aktivitesindeki değişikliklerle ortaya konmuştur (Şekil 4.20). IC₃₀ resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GRx aktivitesindeki artış, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %55 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GRx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %53 azalmıştır. H₂O₂ tek başına uygulandığında artan GRx aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GRx aktivitesi, Resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur ve GRx enzim aktivitesindeki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.05).

Çizelge 4.13. Resveratrolün H1299 ve MRC-5 hücrelerinde GRx aktivitesi üzerine etkisi

Uygulanan konsantrasyonlar	H1299 Hücreleri GRx (Unite/mg protein) X ± S.H.	MRC-5 Hücreleri GRx (Unite/mg protein) X ± S.H.
IC ₃₀ /IC ₂₀ Resveratrol	16 ± 1.9 b	11 ± 1.0 ab
IC ₅₀ Resveratrol	25 ± 2.5 bc	21 ± 1.5 bc
IC ₇₀ Resveratrol	35 ± 2.9 cd	29 ± 1.3 c
IC ₅₀ H ₂ O ₂	44 ± 3.5 de	31 ± 2.6 cd
IC ₇₀ H ₂ O ₂	56 ± 3.6 f	40 ± 3.1 d
Resveratrol + IC ₅₀ H ₂ O ₂	20 ± 1.2 b	14 ± 0.8 ab
Resveratrol + IC ₇₀ H ₂ O ₂	25 ± 1.0 bc	19 ± 0.9 b
DMSO	10 ± 0.9 a	6 ± 0.7 a
Kontrol	10 ± 0.8 a	7 ± 0.4 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0,05). S.H.; Standart Hata

72 saat süreyle IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde G-Rx aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan

önemli derecede artmıştır. ($p<0.05$). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

Her iki hücre tipinde de kontrole göre en yüksek GRx aktivitesi IC_{70} H_2O_2 uygulamasında görülmüştür (Çizelge 4.13).



5. TARTIŞMA

Kanser insanların ilk çağlardan beri mücadele ettiği, günümüzde ise, hızla artış eğilimi gösteren ölümcül bir hastalıktır. Bu artışta değiştirilemez genetik faktörlerin yanında değiştirilebilir çevresel faktörler önemli rol oynamaktadır. Çevresel faktörler arasında sayılan meslek, yaşam biçimi yanında beslenme de kuşkusuz bu faktörlerin en başında gelmektedir.

Dünyada her yıl 14 milyon kişiye kanser tanısı konulmakta ve bu hastalardan her yıl yaklaşık 8,2 milyonu kanser nedeniyle ölmektedir (Wild 2015). Akciğer kanseri erkeklerde ve kadınlarda ölüm oranlarına bakıldığında ilk sırada yer almaktadır (Siegel vd 2016).

Akciğer kanseri görülme sıklığı fazla olduğu ve başlıca ölüm nedenleri arasında olduğu için önlem, tanı ve tedavisi üzerine yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Hastalığın görülme sıklığı arttıkça deneysel modellerde yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Bu amaçla birçok doğal ve yapay kimyasal maddeler önlem ve tedavi amaçlı kullanılmak üzere denenmektedir. Özellikle antioksidan özellikteki fitokimyasallar literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Fitokimyasallar, antioksidan gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip, bitkilerde bulunan kimyasal bileşiklerdir. Fitokimyasallar, hücre içi sinyal yolları, onkogen yollar, hücre dışı inflamasyon, oksidasyon ve kalıtsal genetik mutasyonlar gibi hücrenin kritik homeostatik mekanizmalarını düzenleyen süreçlerde etkili olabilmektedirler. Diğer saptanan etki mekanizmaları ise, DNA tamir genlerinin ve hücre siklusunu kontrol eden genlerin modülasyonunun, apoptozun uyarılmasının, angiogenezin engellenmesi ve tümör hücresinin invazyonunun ve yayılmasının düzenlenmesidir (Kelley ve Fishel 2008). Son dönemlerde, antioksidan özelliğe sahip doğal maddelerin ve besinlerin serbest radikallerin neden olduğu hücre hasar üzerine olan olası faydaları birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Resveratrol de polifenolik bir antioksidan olup son yıllarda çok çalışılan fitokimyasallardan biridir. Polifenoller, çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan etkili bileşikler olup insan diyetinin önemli bir parçasıdır. Polifenolik bileşiklerin özellikleri farklı mekanizmalarla açıklanabilmektedir. Bu bileşikler serbest radikallerin oluşumunu engellemekte veya doğrudan serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırmaktadırlar (Tsao 2010).

Antioksidan aktiviteleri, serbest radikaller, esas olarak reaktif oksijen türleri, (ROS) ve reaktif nitrojen türleri, (RNS) ile yakından ilgilidir. Vücudumuzda normal metabolik süreçler sırasında oluşabildiği gibi, farklı dış etkenlerin etkisiyle, değişik kimyasallara maruziyet ile ve çeşitli patolojik durumlarda oluşabilmektedirler. Serbest radikaller, lipid, protein ve nükleik asitler gibi hücrenin temel bileşenlerinde kimyasal modifikasyona yol açabilmektedir. Özellikle hücre membranında bulunan doymamış yağ asitleri serbest radikallerin oksidatif ataklarına karşı çok duyarlıdır. Bu yüzden, serbest radikallerin kanser, ateroskleroz, artrit, amiloidoz, psikiyatrik bozukluklar ve hipertansiyon gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Bayır 2005).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızında artma veya ortadan kaldırılma hızında azalma bu dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu durum

serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarı, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (Serafini ve Del Rio 2004, Bozkurt 2012).

Polifenoller çok geniş bir yelpazede farmakolojik aktivitelere de sahiptirler. Bu aktiviteler antioksidan, aneljik, anti-inflamatuar özelliklerinin yanı sıra endotel fonksiyonları artırması ve bakteri, fungi, protozoa ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilerine dayanmaktadır (Tomas-Barberan ve Andres-Lacueva 2012). Fenolik bileşenler sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunurlar ve düzenli tüketilmeleri kardiyovasküler, metabolik ve dejeneratif hastalıklar ve kanser başta olmak üzere oksidatif stresin neden olduğu kronik hastalıkların riskini azaltırlar. Bu bağlamda resveratrol gibi bazı önde gelen antioksidan fenolik bileşikler, tek başına veya klasik kemoterapi ile kombinasyon halinde yardımcı tedavi olarak potansiyel antikanserojen olarak da önerilmektedir. Çoğu durumda konsantrasyona bağlı olarak polifenolik bileşenler antioksidan ya da pro-oksidan olarak davranabilmektedir (León-González vd 2015).

Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizmayla açıklanmaktadır. Bunlardan biri, koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğer, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, sonucusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur. Birçok çalışmada resveratrolün hem süperoksit hem de hidroksil radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün antioksidan aktivitesi, birçok polifenolik bileşik gibi, fenolik hidroksil gruplarının varlığı ve kimyasal yapısındaki elektron delokalizasyon potansiyeline bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Henry-Vitrac 2006, Kerameti vd 2010).

Bizim çalışmamızda resveratrolün öncelikle H1299 ve MRC-5 hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Resveratrolün bu hücrelerde glutatyon (GSH) miktarı, selenyum-bağımlı glutatyon peroksidaz (Se-bağımlı-GPx), selenyum-bağımsız glutatyon peroksidaz (Se-bağımsız-GPx), glutatyon redüktaz (GRx) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerine bakılarak resveratrolün antioksidan mekanizma üzerine etkisi, membran hasarı sonucu oluşan malondialdehit miktarı ölçülerek de membran üzerine prooksidan özelliği değerlendirilmiştir. Bileşenin antioksidan özelliğini ortaya koymak için hücrelerde güçlü bir oksidan olan hidrojen peroksit tarafından indüklenerek oluşturulmuş oksidatif hasara karşı resveratrolün bu parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda resveratrolün sitotoksik etkisinin zamana ve doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. H1299 hücrelerinin farklı resveratrol konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu Resveratrolün %50 sitotoksik etki (IC_{50}) gösteren konsantrasyonu 200 μM olarak bulunurken, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla 100 μM ve 50 μM olarak bulunmuştur. Resveratrolün IC_{70} değerleri ise 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla 500 μM , 300 μM ve 125 μM olarak bulunmuştur. MRC-5 hücrelerinin farklı resveratrol konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu Resveratrolün %50 sitotoksik etki (IC_{50}) gösteren konsantrasyonu 250 μM olarak bulunurken, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu sırasıyla 150 μM ve 75 μM olarak bulunmuştur. Resveratrolün IC_{70} değerleri ise 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucu

sırasıyla 700 μM , 400 μM ve 200 μM olarak bulunmuştur. Resveratrolün güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'ye karşı koruyucu etkilerini ortaya koymak için de IC_{50} 'den küçük konsantrasyonlar çalışılmıştır. IC_5 , IC_{10} , IC_{20} ve IC_{30} konsantrasyonlarında resveratrol ile ön uygulamaya maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde Resveratrolün güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e karşı antioksidan (koruyucu) etki gösterdiği bulunmuştur H1299 hücrelerinde en etkili konsantrasyon IC_{30} iken MRC-5 hücrelerinde IC_{20} olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterirken düşük konsantrasyonlarda hücreyi koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda resveratrolün akciğer kanseri H1299 hücrelerinde hem de sağlıklı hücre olan MRC-5 hücrelerinde doz arttıkça sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Resveratrol ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda IC_{50} değerleri sırasıyla 200, 100 ve 50 μM bulunurken MRC-5 hücrelerinde sırasıyla 250, 150 ve 75 μM bulunması sağlıklı ve kanser hücrelerinde dozun ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. Çok kuvvetli bir oksidan olan H_2O_2 tek başına sitotoksik etkiye sahiptir. Her iki hücre de düşük dozda resveratrol ($<\text{IC}_{50}$) ile ön uygulamaya maruz bırakıldığında resveratrol H_2O_2 'ye karşı hücre canlılığını artırarak koruyucu etki göstermiştir. H1299 hücrelerinde en etkili dozerin IC_{30} olduğu görülürken MRC-5 hücrelerinde IC_{20} olduğu görülmüştür.

Yapılan literatür taramaları sonucunda resveratrolün bir çok hücre dizisinde de zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür ve sonuçlar bizim çalışmamızı desteklemektedir. Resveratrolün karaciğer kanseri hücre hattı Huh7 üzerinde yapılan sitotoksik çalışmalar da doza ve zamana bağlı olarak sitotoksitenin arttığını göstermektedir. Huh7 hücrelerinde 100 μM resveratrol, 24 saat inkübasyon sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının %35.22'ye düşmesine sebep olurken aynı konsantrasyonda 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı %42.2'dir. Resveratrol konsantrasyonu 200 μM 'a yükseltildiğinde hücrelerin canlılık oranı 24 saat inkübasyon sonucu %33.66, 48 saat inkübasyon sonucu %23.52'dir. Hücre proliferasyonunda %50 inhibisyona (IC_{50}) neden olan resveratrol konsantrasyonu 24 saat için 77,2 μM , 48 saat için 86,5 μM olarak hesaplanmıştır (Sırma, 2013). Yine aynı hücre hattında yapılan bir çalışmada hücreler 48 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda resveratrol ile inkübe edilmiş ve bunun sonucunda 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için hücre ölümünü %49.9 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon için hücre ölümünü %72.9 olarak saptanmıştır (Liao vd 2010). T24 kan kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda resveratrol uygulaması sonucu IC_{50} değerleri 12, 24 ve 48 saat için sırasıyla 250, 180 ve 160 μM olarak bulunmuştur (Bai vd 2010). Resveratrolün östrojen pozitif (ER+) meme kanseri MCF-7 hücreleri, hepatoma (ER+) HepG2 hücreleri ve transforme olmamış maymun fibroblast (ER-) VERO hücrelerinde 24 saatte düşük konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığı ancak 100 mikromolar konsantrasyonla zaman arttıkça 48 saat ve 72 saatte sitotoksik olduğu belirtilmiştir (Kocsis vd 2005). Farklı hücrelerle yapılan çalışmalar resveratrolün antiproliferatif etkisini ortaya koymaktadır. Ayrıca güçlü bir oksidan olan hidrojen peroksit ile muamele edilmiş mide adenokarsinoma hücrelerinde resveratrolün bazı sinyal yollarını inhibe ederek hücre proliferasyonunu engellediği ve hidrojen peroksit ile muamele edilen mesane kanseri hücrelerinde resveratrolün yüksek dozlarda hücre ölümünü teşvik ettiği, düşük dozlarda ise koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Aquilano vd 2009, Stocco vd 2012).

Resveratrolün farklı hücrelerde farklı mekanizmalarla doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki göstererek apoptozisi indüklediğini ve hücre proliferasyonunu engellediği ve antikanserojen etkisini gösteren çalışmalar da vardır. HT-29 ve RKO insan kolon kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, hücre kültür ortamına 10, 25 ve 60 μM dozlarında resveratrol uygulanmıştır. 37°C’ de 24 saat inkübasyon sonrasında, bu iki hücre tipinde de proliferasyonun inhibe olduğu saptanmıştır. Yüksek doz resveratrol (60 μM) uygulamasının periferik kan mononükleer hücrelerinden IL-6 ve IL-10 salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsan kolon kanser hücrelerinde yapılan çalışma bulguları, resveratrolün antikanserojen etkilerini ortaya koymaktadır (Bergman vd 2013). MCF-7 meme kanser hücrelerinin resveratrol ile 25 -100 μM dozda 24 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrasında, apoptozis indeksinin yaklaşık %50 oranında arttığı saptanmıştır. İnkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak bu etkinliğin kısmen arttığı saptanmıştır. Resveratrolün proapoptotik proteinlerden Bax ve Fas-associated death domaini (FADD) artırarak apoptotik indeksin artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu bulgu, resveratrolün meme kanserinde yararlı olabileceğine işaret etmektedir (Soyocak vd 2013). Meme kanser hücrelerinden MCF-7 ve MDA-MB-231 kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise 10, 25 ve 50 μM dozlarda resveratrol inkübasyonunun, tümör süpresör etkinliği bilinen ring finger protein 20’yi (RNF20) doz bağımlı olarak artırdığı saptanmıştır. RNF20 geninin çıkarılması ise, resveratrolün etkisinin ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bu mekanizma, resveratrolün en agresif kanser hücrelerinden MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerinde yeni antikanserojen etki mekanizması olarak tanımlanmıştır (Lin vd 2013). Resveratrolün H838 ve H520 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde Bcl-2 ve Bax proteini ekspresyonu, mitokondride sitokrom c salınımı ve mitokondrial membran potansiyelinin depolarizasyonu ile ilişkili olarak doza ve zamana bağlı hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ma vd 2015).

Serbest oksijen radikalleri yapısal özellikleri nedeni ile lipid, protein ve nükleik asit gibi hücre bileşenlerini okside etme kapasitesine sahiptir. Özellikle hücre mebran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri oksidasyona duyarlıdır ve bunların oksidasyonu lipid zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olmaktadır. Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü malodialdehit (MDA) ‘tır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Doymamış yağ asitleri ile serbest radikaller arası reaksiyondan açığa çıkan ve hücrel membranlarda lipid peroksidasyonu ana ürünü olan hücrel MDA içeriği lipid peroksidasyonunun derecesinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (Yu vd 2008).

Çalışmamızda H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına $\text{IC}_{30}/\text{IC}_{20}$, IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki resveratrole ve IC_{50} ve IC_{70} H_2O_2 ’e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca resveratrolün H_2O_2 ’e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC_{30} (H1299 hücrelerinde) ve IC_{20} (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona maruz bırakılmış devamında 72 saat H_2O_2 -e (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılarak MDA miktarlarındaki değişim araştırılmıştır. Bunun sonucunda membran hasarı sonucu oluşan MDA miktarı ölçülerek resveratrolün

membran üzerine prooksidan özelliği değerlendirilmiştir. Tek başına Resveratrole (IC_{30} , IC_{50} , IC_{70}), H_2O_2 'e (IC_{50} , IC_{70}) ve kombine uygulamalara maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde MDA miktarı, konsantrasyon artışına bağlı olarak artış göstermiştir. Resveratrolle ön muamele sonucu H_2O_2 'ye karşı resveratrolün MDA miktarını azalttığı görülmüştür. MDA miktarındaki azalış resveratrolün membran koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur. Ancak, resveratrol düşük konsantrasyonlarda güçlü bir oksidanla kombine uygulamalarda antioksidan gibi davranarak hücre zarını korurken, tek başına artan (IC_{50} , IC_{70}) konsantrasyonlarda kontrole göre MDA miktarını arttırması prooksidan gibi davrandığını göstermektedir.

Yapılan literatür taramalarında resveratrolün MDA miktarını azaltarak koruyucu etkisi olduğu ortaya konmaktadır. Resveratrolün hücre membranında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi RAW 264.7 ve JB6 hücrelerinde gösterilmiştir (Leonard vd 2003). Grissa ve ekibinin resveratrolün etanole bağlı lipid peroksidasyonunu önlemedeki etkinliğine baktıkları çalışmalarında resveratrolün lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeylerini azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu olduğu saptanmıştır (Grissa vd 2006). Yine yapılan bir başka çalışmada insan bronşiyal epitelyum hücresi (HBE) ve insan fetal akciğer fibroblast hücre (MRC-5) dizisinde resveratrolün radyasyon sonucu oluşturulan oksidatif strese karşı MDA düzeyini azaltarak koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Fu vd 2012). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HBE hücrelerinde arsenik trioksit ile indüklenen oksidatif hasara karşı resveratrolün ROS oluşumunu azaltarak ve MDA artışını bastırarak koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir (Chen vd 2015). NSC hücrelerinde (nöral kök hücre), resveratrolün hücre proliferasyonunu arttırdığı, apoptozisi ve MDA miktarını azalttığı bildirilmiştir (Shen vd 2016).

Normal şartlarda antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasında bir denge söz konusudur. Bu denge sayesinde serbest radikaller zararsız hale getirilmektedirler. Dengenin oksidanlar tarafına doğru kayması, oksidatif strese ve hasarlayıcı olayların başlamasına neden olur (Sanchez 2002). Oksidatif stres, vücuttaki antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerine karşı yetersiz kalması sonucu oluşan bir süreçtir. Antioksidan moleküller, bu oksidatif strese neden olan serbest radikalleri etkisiz hale dönüştürmelerinden dolayı önemli moleküllerdir (Vural 1996). Enzimatik antioksidanlar içinde GPx gibi enzimler ve glutatyon (GSH) mekanizması, antioksidan dengede önemli bir rol oynar. Dokuların oksijenasyonu ile oluşan serbest radikalleri normal şartlar altında hücresel enzimatik antioksidan mekanizmalar etkisiz hale getirir. GSH vücudun en önemli hücre içi antioksidan moleküllerinden biridir. GSH pek çok serbest oksijen radikalini detoksifiye eder. Bununla birlikte peroksinitritin de üretimini azaltarak oksidasyon/reduksiyon dengesinin sağlanmasında önemli rol üstlenir. GSH düzeyindeki göreceli düşüklük ROS'un artmasına ve bunlar aracılığıyla oluşan doku hasarına neden olur (Hall vd 2005). Patolojik şartlar altında antioksidanlar tarafından etkilenen okside ve redukte form düzenlenerek glutatyon seviyesi aktive edilir (Mazo ve Ros 1998, Prbasheela ve Basaran 2014). GSH, Glutatyon reduktaz (GRx), Glutatyon Peroksidaz (GPx) ve Glutatyon-S- Transferaz (GST) glutatyon bağımlı anti-peroksit sistemin ana bileşenleridir. GSH insanlardaki temel antioksidan sistemin bir parçası olarak hidrojen peroksitin detoksifikasyonu sürecinde GPx'in ve GRx'in substratıdır (Kulinski ve Kolesnichenko 1990, Prbasheela ve Baskaran 2014). Oksidatif stres sürecinde GSH konsantrasyonu azalırken GSSG (yüksek oranda sitotoksit) radikallerin süpürülmesi sonucu ya da peroksitlerin indirgenmesi sonucunda artar (Davies 1993,

Halliwell ve Gutteridge 2007). Bu durumda biriken H_2O_2 ve organik hidroperoksitler glutatyon peroksidaz ve redüktaz etkisiyle ortadan kaldırılırlar. Bu bileşiğin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır. GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Proteinlerdeki - SH gruplarının redükte halde kalmasını sağlar ve bu grupları oksidasyona karşı korur (Halliwell ve Gutteridge 2007). GSH hücre farklılaşması ve hücre çoğalması gibi çok sayıda hücreyel olayda önemli rol oynamaktadır. Apoptoz ve GSH homeostazındaki bozukluklar, kanser başta olmak üzere birçok insan hastalıklarının etiyolojisinde ve ilerlemesinde rol oynar. GSH eksikliği veya GSH/glutatyon disülfür (GSSG) oranındaki bir azalma, kanser gelişiminde rol oynayan oksidatif strese karşı artmış bir duyarlılığa neden olur. Artmış GSH düzeyleri, birçok kanser hücresinde görülen oksidatif strese karşı antioksidan kapasiteyi ve direnci artırır (Traverso vd 2013).

Çalışmamızda H1299 ve MRC-5 hücreleri tek başına IC_{30}/IC_{20} , IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarındaki resveratrole ve IC_{50} ve IC_{70} H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca resveratrolün H_2O_2 'e karşı en yüksek antioksidan etki gösterdiği IC_{30} (H1299 hücrelerinde) ve IC_{20} (MRC-5 hücrelerinde) konsantrasyonlarıyla bir saat ön inkübasyona maruz bırakılmış devamında 72 saat H_2O_2 'e (IC_{50} ve IC_{70}) maruz bırakılarak glutatyon miktarlarındaki değişim araştırılmıştır. IC_{30} resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında azalan GSH miktarı, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %25 daha azdır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu GSH miktarındaki azalış tek başına uygulamaya göre %21 daha az bulunmuştur. IC_{20} resveratrol konsantrasyonu ile ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında azalan GSH miktarı, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %21 daha azdır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu GSH miktarındaki azalış, tek başına uygulamaya göre %27 daha az bulunmuştur. H_2O_2 'in tek başına uygulamasında GSH miktarındaki azalış, resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki GSH miktarındaki azalıştan daha fazla olması, Resveratrolün GSH miktarını artırdığını ve antioksidan etkisini ortaya koymuştur.

Yapılan literatür taramaları resveratrolün GSH mekanizmasında etkili olduğunu göstermektedir. Resveratrolün kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, ratların serum ve dokularında incelemeler yapılmıştır. Serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri, doku tiobarbitürik asit reaktif madde ve GSH düzeyi, resveratrol ve kontrol gruplarında kadmiyum gruplarından daha düşük çıkmıştır. Doku (karaciğer, böbrek, beyin, kalp) SOD aktivitesi kadmiyum verilen gruplarda düşüktür. Kadmiyumla birlikte resveratrol verilmesinin, değerleri kontrol grubuna yaklaştırdığı bildirilmiştir (Göktaş 2007). Jannin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, insan akciğer epitel hücrelerinde transpozisyona yol açan, sigaranın neden olduğu oksidatif stresin, resveratrol ile engellenebileceği bildirilmiştir. Çalışmada sigara, GSH seviyelerinde azalmaya neden olmuştur ve resveratrol verilmesi GSH seviyelerini yükseltmiştir (Jannin vd 2004).

Hücreler, prooksidan/oksidan bir ajana maruz kaldıklarında kendilerini oksidatif strese karşı korumak için glutatyon peroksidaz enzimi sentezlerler. GPx, GSH'tan

yararlanarak hidroksi bileşiklerine karşı birçok organik ve inorganik hidroperoksiti indirgeyen bir enzim ailesinden oluşur. Fagositik hücrelerde önemli bir fonksiyonu vardır. Solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açar. GPx, hem lipid peroksidasyonunun başlamasını önler, hem de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlar (Masella vd 2005). Çalışmamızda IC₃₀ resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında artan Se-bağımlı-glutasyon peroksidaz (Se-bağımlı-GPx) ve Se-bağımsız-glutasyon peroksidaz (Se-bağımsız-GPx) aktivitesi, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre sırasıyla yaklaşık olarak %26 ve %18 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu Se-bağımlı- ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre sırasıyla yaklaşık olarak %23 ve %12 daha az bulunmuştur. IC₂₀ resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında artan Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre sırasıyla yaklaşık olarak %30 ve %23 daha az bulunmuştur. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu Se-bağımlı-GPx ve Se-bağımsız-GPx aktivitesindeki artış da tek başına uygulamaya göre sırasıyla yaklaşık olarak %32 ve %22 daha az bulunmuştur. 72 saat süreyle IC₅₀ ve IC₇₀ konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde Se-bağımlı ve Se-bağımsız-GPx aktivitesi kontrol grubuna göre artmıştır. Resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir. Ancak düşük konsantrasyonlarda GPx aktiviteleri kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur. Bu da resveratrolün düşük konsantrasyonlarda antioksidan gibi davrandığını göstermektedir.

Glutasyon S-transferaz (GST) hücrelerin koruyucu enzimlerindendir. Gerek organizmaya dışarıdan gelen, gerekse biyotransformasyon reaksiyonlarıyla oluşan zararlı bileşikler, ya etkili bir nükleofil olan glutasyon ile konjuge olur ya da GST tarafından katalizlenen bir dizi reaksiyonla suda çözünür hale getirerek organizmadan uzaklaştırılırlar. Bir multienzim ailesi olan glutasyon transferazlar detoksifikasyon işleminden sorumludur (Fang 2002, Halliwell ve Gutteridge 2007). Hem GPx hem de GST hücre içi total GSH düzeyini düşürürler (Lu 2000). Hücreler, prooksidan/oksidan bir ajana maruz kaldıklarında kendilerini oksidatif strese karşı korumak için bu enzimi sentezlerler. Çalışmamızda IC₃₀ resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GST aktivitesindeki artış, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %38 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₃₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GST aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %37 azalmıştır. IC₂₀ resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC₅₀ konsantrasyonunda H₂O₂'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GST aktivitesindeki artış, tek başına IC₅₀ H₂O₂ konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %33 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC₂₀) kombine uygulanan IC₇₀ H₂O₂'in neden olduğu GST aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %38 azalmıştır. H₂O₂ tek başına uygulandığında artan GST aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GST aktivitesi, Resveratrolün hücre koruyucu

(antioksidan) etkisini ortaya koymuştur. H_2O_2 tek başına uygulandığında artan GST aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GST aktivitesi, resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur. 72 saat süreyle IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde GST aktivitesi kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştır ($p<0.05$). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

GRx hücre içinde tiyollerini azaltır ve oksidasyonu önleyerek oksidatif hasarı önler (Bryant vd 1982, Prabasheela ve Baskaran 2014). GPx tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipid peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutatyon, okside glutatyonla dönüşmektedir. Bir flavoprotein olan glutatyon redüktaz, NADPH yardımıyla okside glutatyonun (GSSG), glutatyonla indirgenmesini katalize eder. Glutatyonun indirgenmiş halde kalması birçok antioksidan enzim aktivitesi için önemlidir (Halliwell ve Gutteridge 2007). Çalışmamızda IC_{30} resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış H1299 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GRx aktivitesindeki artış, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %56 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu Gx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %55 azalmıştır. IC_{20} resveratrol konsantrasyonuyla ön uygulamaya maruz bırakılmış MRC-5 hücrelerinin devamında IC_{50} konsantrasyonunda H_2O_2 'e 72 saat maruz bırakıldıklarında GRx aktivitesindeki artış, tek başına IC_{50} H_2O_2 konsantrasyonuna maruz bırakılan hücrelere göre %55 azalmıştır. Aynı şekilde resveratrol ile (IC_{30}) kombine uygulanan IC_{70} H_2O_2 'in neden olduğu GRx aktivitesindeki artış tek başına uygulamaya göre %53 azalmıştır. H_2O_2 tek başına uygulandığında artan GRx aktivitesi, diğer taraftan resveratrol ile kombine uygulamaları sonucundaki azalan GRx aktivitesi, resveratrolün hücre koruyucu (antioksidan) etkisini ortaya koymuştur. 72 saat süreyle IC_{50} ve IC_{70} konsantrasyonlarında Resveratrole maruz bırakılan H1299 ve MRC-5 hücrelerinde GRx aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede artmıştır ($p<0.05$). Burada da resveratrol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi etki göstermiştir.

İkincil bir bitki metaboliti olan resveratrol, polifenol grubunda yer alan oldukça güçlü bir antioksidandır. Resveratrol hücre içi antioksidan miktarını artırabilir, GPx, GST ve GRx gibi birçok antioksidan enzimin de artışına neden olabilir (Pedras, 2005). Das ve arkadaşları resveratrolün insan lenfositlerinde, GRx ve GST gibi GSHmetabolizması ile ilgili enzimlerin miktarını arttırdığını göstermişlerdir (Das ve Maulik 1994). Ungvari ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, resveratrolün vasküler oksidatif stres direncini arttırdığı saptanmıştır. Resveratrolün bu etkiyi serbest radikallerden H_2O_2 'i bağlayarak, oksidatif stres tarafından uyarılan epitel hücre apoptozunu engellenmesine bağlı olarak gösterdiği kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra, resveratrolün UV ile uyarılmış DNA hasarını GSH, GPx, katalaz ve oksijenaz-1 ekspresyonunu artırarak oluşturduğu gösterilmiştir. Bu bulgular resveratrolün kardiyovasküler sistem üzerindeki olumlu etkilerinin antiapoptotik ve antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir (Ungvari vd 2007). Resveratrol ile beslenen ratlarda doza bağlı olarak resveratrolün karaciğer hücrelerinde ilaç metabolizmasını düzenlediği, GST gibi faz I enzimlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Hebbar 2005). Sengottuvelan ve ekibinin (2009) yaptığı bir çalışmada resveratrolün sıçanlarda oksidatif stresi önleyerek kolorektal kanseri baskıladığı kanıtlanmıştır. Resveratrol destekli tedavinin enzimatik antioksidanları (SOD, CAT, GRx, GPx ve GST) ve

enzimatik olmayan antioksidanları (indirgenmiş glutatyon, vitamin E, vitamin C ve beta karoten) arttırdığı buna karşılık lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Sengottuvelan vd 2009).Ratlarla yapılan başka bir çalışmada mangenez nörotoksisitesine karşı resveratrolün koruyucu etkisine bakılmıştır. Çalışmada Wistar tipi ratlar kullanılmış ve resveratrol besin olarak verilmiştir. Ratlardan beyin dokusu çıkarılıp beyin homejanatı hazırlanmıştır. Resveratrolle ön uygulama yapıldığında mangenezin indüklediği GSSG/GSH artışına karşı koruduğu görülmüştür (Gawlik vd 2017). Ayrıca insan lenfosit hücrelerinde (Yen vd 2003) ve insan kardiyomiyositlerinde (H9C2) (Cao ve Li 2004) zamana ve doza bağlı olarak GSH miktarı ile GSH-GPx ve GSH-Rx enzim aktivitelerini artırarak oksidatif DNA hasarını engellediği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, oksidatif strese indüklenen sıçan karaciğer hücrelerinde, resveratrolün, detoksifikasyon mekanizmalarını düzenlediği, özellikle katalaz, SOD, GRx NADPH kinon oksiredüktaz ve GST enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı belirtilmektedir (Rubilio vd 2008). Aynı çalışmanın devamında, resveratrolün, SOD, GRx katalaz gibi enzimlerin ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörü Nrf2 üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Rubilio vd 2008). Promiyelositik lösemi hücrelerinde yapılan çalışmada, arsenik trioksitle indüklenen oksidatif hasara karşı resveratrolün glutatyon düzeyini artırarak ve GGPx ve GRx enzim aktivitelerini artırarak koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Chen vd 2015). RAW 264.7 hücrelerinde titanyum parçacıklarıyla indüklenen oksidatif strese karşı, toksik olmayan dozlarda resveratrol uygulamasının doza bağlı olarak nitrik oksit ürünlerini ve ROS üretimini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. CAT, SOD, GRx ve GPx içeren antioksidanenzimlerin gen ekspresyonunu ve aktivitelerini artırmıştır (Luo vd 2017). Yapılan bir başka çalışmada C6 astroglial hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelere bütinyonin sülfoksimin uygulanarak sitotoksik etki oluşturulmuş ve GSH miktarı, GPx ve GRx antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir. Resveratrol uygulamasının ardından GSH miktarında, GPx ve GRx enzim aktivitelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca heme oksijenaz 1 farmakolojik olarak inhibe edildiğinde resveratrolün oksidatif hasara ve inflamatuvar yaralanmaya karşı koruyuculuğunun ortadan kalktığı belirtilmiştir. Bu da resveratrolün C6 astroglial hücrelerinde heme oksijenaz yolağı aracılığıyla GSH sistemini düzenlediğini göstermiştir (Arús vd 2017).

Çalışmamızda, resveratrolün H1299 (insan akciğer kanseri) ve MRC-5 (insan embriyonik akciğer fibroblast) hücre dizileri üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Hücrelerin farklı resveratrol konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında hücre canlılığının azalması resveratrolün sitotoksik etkisini göstermiştir ve kullanılan doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı tespit edilmiştir. Güçlü bir antioksidan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) karşı resveratrolün düşük dozlarda koruyucu olduğu görülmüştür ve yine düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'e karşı hücre membranını koruduğu ortaya konmuştur. Resveratrolün düşük konsantrasyonlarının H_2O_2 'e karşı hücreler üzerindeki koruyucu etkisi gösterilerek, düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak davrandığı ortaya konmuştur. Bu sonuçlar resveratrolün membran hasarı üzerindeki etkisine ve GSH miktarı ve antioksidan enzim aktivitelerine bakılarak da desteklenmiştir. GSH düzeyleri ve enzim aktiviteleri ölçülerek resveratrolün oksidatif hasarı azalttığı ve antioksidan özellik gösterdiği ortaya konmuştur. Son yıllarda yapılan fitokimyasallarla ilgili birçok çalışma mevcuttur. Özellikle polifenolik bir antioksidan olan resveratrolle yapılan çalışmalarda resveratrolün antioksidan aktivitelerinin ve

farklı kanser hücre dizileri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün daha iyi anlaşılmasının kanser tedavilerine yeni stratejiler getireceğine inanıyoruz.



6. SONUÇ

Bu çalışmada resveratrolün H1299 insan akciğer kanseri hücre dizisi üzerindeki antioksidan etkisi araştırılmıştır. MRC-5 insan embriyonik fibroblast hücreleri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Resveratrolün bu hücreler üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Resveratrolün düşük konsantrasyonlarının H1299 ve MRC-5 hücrelerinde çok güçlü bir oksidan olan H_2O_2 'e karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilerek, hücreler üzerindeki antioksidan aktivitesi MDA miktarı, GSH miktarı ve antioksidan enzim aktivitelerine bakılarak ortaya konmuştur. Resveratrolün farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla oluşan MDA miktarı, yüksek resveratrol konsantrasyonlarında artarken düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'in oluşturduğu membran hasarının azaldığı görülmüştür ve resveratrolün hücreler üzerindeki membran koruyucu özelliği ortaya konmuştur. GSH düzeyleri ve enzim aktiviteleri ölçülerek resveratrolün oksidatif hasarı azalttığı ve antioksidan özellik gösterdiği ortaya konmuştur. Resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda prooksidan gibi düşük konsantrasyonlarda ise antioksidan özellikte davrandığı ortaya konmuştur.

Literatürde birçok canlıya ait doku, normal hücre ve kanser hücrelerinde önemli bir fitokimyasal ve polifenolik bir antioksidan olan resveratrolle yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamızda en sık görülen ve ölüme sebebiyet veren kanserlerden olan akciğer kanseri hücreleri üzerinde resveratrolün antioksidan mekanizmasını ortaya koyması sebebiyle literatüre katkı sağlayacaktır. Resveratrolün özelliklerinin ve etkilerinin daha iyi anlaşılması kanserin önlenmesinde ve tedavisinde yeni stratejiler getirecektir.

7. KAYNAKLAR

- ABDULLA, A., ZHAO, X., YANG, F. 2013. Natural Polyphenols Inhibit Lysine-Specific Demethylase-1. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 1: 56-63.
- AGGARWAL, B. B. 2004. Nuclear factor-kappa B: the enemy within. *Cancer Cell*, 6: 203-208.
- AGGARWAL, B. B., BHADWAJ, A., AGGARWAL, R. S., SEERAM, N. P., SHISHODIA, S., TAKATA, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 24: 2783-2840.
- AKKOCLU, A. 2006. Akciğer kanserleri. Türk Toraks Derneği, Sunular. <http://www.toraks.org.tr/SunuMerkezi/?s=3A2E22585A3B5858573D563F365E56>
- AKKUS, İ. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri , Mimoza Yayınevi, Konya, 1-77.
- AKYUZ, M.F. 2006. Evre III B 64 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastada eş zamanlı ve ardışık kemoradyoterapinin karşılaştırmalı iki yıllık cevap oranları. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkoloji Kliniği, İstanbul, 63 s.
- ALBERG, A.J., BROCK, M.V., SAMET, J.M. 2005. Epidemiology of Lung Cancer: Looking to the Future. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (14): 3175-3185.
- ALBERG, A.J., SAMET, J.M. 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21-49.
- ALTAN, N., DINCEL, A.S., KOCA, C. 2006. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 31 (2): 51-56.
- ALTINTAS, S. 2006. Kahramanmaraş'ta bazı iş kollarında çalışan boya işçilerinde plazma ve eritrosit membranı sialik asit, glutatyon, plazma nitrik oksit ve lipid peroksidasyonu düzeylerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 62 s.
- ANDERSON, M.E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 1-14.
- ANEKONDAN, T.S. 2006. Resveratrol-A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*, 52 (2) : 316-326.
- ANTMEN, S.E. 2005. Beta talesemide oksidatif stres. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Çukurova Üniversitesi, Adana, 91 s.
- AQUILANO, K., BALDELLI, S., ROTILLO, G., CIRIOLO, M. R. 2009. trans-Resveratrol inhibits H2O2-induced adenocarcinoma gastric cells proliferation

via inactivation of MEK1/2-ERK1/2-c-Jun signalling axis. *Biochemical Pharmacology*, 77: 337-347.

- ARASIMOWICZ, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J., MILCZAREK, G., JELONEK, T. 2009. Nitric oxide, induced by wounding, mediates redox regulation in pelargonium leaves. *Plant Biol (Stuttg)* 11: 650-663.
- ARUS, B.A., SOUZA, D.G., BALLAVER, B., SOUZA, D.O., GONCAVESI, C.A., QUINCOZES-SANTOS, A. and BOBERMIN, L.D. 2017. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Mol Cell Biochem.* 428: 67–77.
- ATHAR, M., BACK, J.H., TANG, X., KIM, K.H., KOPELOVICH, L., BICKERS, D.R., KIM, A.L. 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224: 274-283.
- BAI, Y., MAO, Q.Q., QIN, J., ZHENG, X. Y., WANG, Y. B., YANG, K., SHEN, H. F., XIE, L. P. 2010. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Science*, 101: 488-493.
- BAUR, J.A. and SINCLAIR, D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5: 439-506.
- BAYIR H. 2005. Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 33 (12): 498-501.
- BELITZ, D., GROSCH, W. 2009. Food Chemistry. Springer, 988 s.
- BERGMAN, M., LEVIN, G.S., BESSLER, H., DJALDETTI, M. and SALMAN, H. 2013. Resveratrol affects the cross talk between immune and colon cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 67(1): 43-7.
- BEUTLER, E. 1975. Glutathione peroxidase. In: Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, Grune & Stratton, 71-73, New York.
- BHARATH, S., HSU, M., KAUR, D., RAJAGOPALAN, S., ANDERSEN, J.K., 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64: 1037-1048.
- BOUCHARDY, C., BENHAMOU, S., JOURENKOVA, N., DAYER, P., HIRVONEN, A. 2001. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109-112.
- BOUYAED, J., BOHN, T. 2010. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: health effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(4): 228-237.
- BOZKURT, S. 2012. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *Journal of Pediatric Surgery*. 47 (9) : 1735-41.

- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7: 395-405.
- BRYANT, R.W., SIMON, T.C. and BAILEY, J.M. 1982. Role of glutathione peroxidase and monophosphate shunt in the platelet lipoxygenase pathway. *JBiolChem*. 257: 14937-43.
- BURCHAM, P.C. 1998. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*, 13: 287-305.
- BURKITT, M.J., DUNCAN, J. 2000. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxylradical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys*, 381 (2): 253-63.
- CAN, G., CAKIR, Z., KARTAL, M., GUNDUZ, U., BARAN, Y. 2012. Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer Research*, 32: 2673-2678.
- CAO, Z., LI, Y., 2004. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *European Journal of Pharmacology*, 489: 39-48.
- CANORUÇ, N., CICEK, R., ATAMER, A., DURSUN, M., TURGUT, C., GUNELI, E. and CANORUC, F. 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stres-induced ulcer formation in rats. *Turk J med Sci*, 31: 199-203.
- CARLBERG, I. and MANNERVIK, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods of Enzymology*, 113: 448-490.
- CARRIZZO, A., FORTE, M., DAMATO, A., TRIMARCO, V., SALZANO, F., BARTOLO, M., MACIAG, A., PUCA, A.A., VECCIONE, C. 2013. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol*, 61: 215-226.
- CELOTTI, E., FERRARINI, R., ZIRONI, R. and CONTE, L. S. 1996. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes : Recioto and Amarone. *J. Chromatog*. 730: 47-52.
- CHAKRABORTY, P. K., MUSTAFI, S. B., GANGULY, S., CHATTERJEE, M., RAHA, S. 2008. Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70. *Cancer Science*, 99: 1109-1116.
- CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49 (3): 481-493.

- CHEN, C., JIANG, X., LAI, Y., LIU, Y. and ZHANG, Z. 2015. Resveratrol Protects Against Arsenic Trioxide-Induced Oxidative Damage Through Maintenance of Glutathione Homeostasis and Inhibition of Apoptotic Progression. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56: 333-346.
- CIGHETTI, G., DUCA, L., BORTONE, L., SALA, S., NAVA, I., FIORELLI, G., CAPPELLINI, M.D. Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 32: 55-601.
- CLEMENT, M.V., HIRPARA, J.L., VHAWDHURY, S.H., PERVAIZ, S. 1998. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 92: 996-1002.
- CORREIDA-DA-SILVA, M., SOUSA, E., DUARTE, B., MARQUES, F., CUNHA-RIBERIO, L.M., PINTO, M.M. 2010. Dual anticoagulant/antiplatelet persulfated small molecules. *Eur J Med Chem.*, 46 (6): 2347-58.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J., van BLADEREN, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- COLLARD, C.D, GELMAN, S. 2001. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94: 1133-8.
- CURE E. 2007. Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinin etkinliğinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta. 43s.
- CAVDAR, C., SIFIL, A., CAMSARI, T. 1997. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3(4): 92-95.
- DAS, D.K. and MAULIK, N. 1994. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* 233: 601-610.
- DAVIS, CD., TSUJI, PA., MILNER, JA. 2012. Selenoproteins and Cancer Prevention. *Annual Review of Nutrition* 32:73-95.
- DAVIES, K.J. 1993. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 6: 1- 31.
- DELMAS, D., LIN, H.Y. 2011. Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: Consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res*, 55: 1142-1153.
- DEMİR, V. 2008. İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, plazma vasküler endotelial büyüme faktörleri ve trombosit faktör 4 düzeylerinin prognostik önemi ve sağkalım süreleri ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne 74 s

- DEMROW, H.S., SLANE, P. R., FOLTS, J.D. 1995. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1: 1182-1188.
- DI ILIO, C., SACCHETTA, P., ANGELUCCI, S., ZEZZA, A., TENAGLIA R. And ACETO, A. 1995. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in cancerous and non cancerous human kidney tissues. *Cancer letters*, 91: 19-23.
- ECONOMU, P., LECHNER, J. F., SAMET, J.M. 1994. Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer. *Lung biology in health and disease*, 74: 353-396.
- ERTURK, B. 2006. Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması. Uzmanlık Tezi, T. C. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 72s.
- ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. and ZOLLNER, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 11: 81-128.
- ESTRELA, J.M., ORTEGA, A., OBRADOR, E. 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 43: 143–181.
- FANG, Y., YANG, S., WU, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872–879.
- FENG, Z., HUA, W., MARNETT, L. J. and TANG, M.-S. 2006. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research*, 601: 125–136.
- FILOMENI, G., ROSILIO, G., CIRILIO, M.R. 2002. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1057–1064.
- FITZPATRICK, D.F., HIRSCHFIELD, S.L., COFFEY, R.G. 1993. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American journal of physiology*, 265: 774-778.
- FLORA, S.J. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol.*, 53: 1-2.
- FONG, K.W., SEKIDO, Y., MINNA, J.D. 1999. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 118: 1136-1152.
- FONG, K.M., MINNA, J.D. 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 23 (1): 83-101.
- FRANKEL, E.N., KANNER, J., GERMAN, J.B., PARKS, E., KINSELLA, J.E. 1993. Inhibition of oxidation of human low density-lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341: 454-457.

- FREMONT, L. 2000. Biological effects of resveratrol (minireview). *Life science*, 66: 663-673.
- FU, X., XUE, j., ZHOU, L., WANG, Y., HUANG, M., JUAN, L., LI, L. and LU, Y. 2012. The Protection Effects of Resveratrol on Irradiated Human Pneumonic Cell Lines and Its Mechanism. *J Sichuan Univ (Med Sci Edi)* 43(3): 319-324.
- FUKAGAWA, N.K. 1999. Aging: Is Oxidative Stress a Marker or Is It Causal? DOI:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-146.x
- GAMBINI, J., INGLES, M., OLASO, G., LOPEZ-GRUESO, R., BONET-COSTA, V., GIMENO-MALLENCH, L., MAS-BARGUES, C., ABDELAZİZ, K.M., GOMEZ-CABRERA, M.C., VINA, J., BORRAS, C. 2015. Properties of Resveratrol: In vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2015: 837042.
- GATOUILLAT, G., BALASSE, E., JOSEPH-PIETRAS, D., MORJANI, H. and MADOULET, C. 2010. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 110: 893-902.
- GILES, F., LECTURE, F., DEVERUX, T.R., TAYLOR, J.A., BARRET, J.C. 1996. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*. 109 (3): 14-19.
- GAWLIK, M., GAWLIK, M.B., SMAGA, I. and FILIP, M. 2017. Manganese neurotoxicity and protective effects of resveratrol and quercetin in preclinical research. *Pharmacological Reports*. 69: 322–330.
- GILES, G.I. 2006. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 12: 4427–4443.
- GLOECKNER, H., JOULEIT, T., and LEMKE, H. D. 2001. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *Journal of Immunological Methods*, 252: 131-138.
- GOKTAS, Ö. 2007. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine resveratrolün koruyucu etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Malatya, 65s.
- GRIFFITH, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 922-935.
- GRISSA, A.K., MORNAGUI, B., AOUANI, E., HAMMAMI, M., GHARBI, N. and KAMOUN, A. 2006. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol and Alcoholism*. 41: 1-4.
- GUPTA, S.C., KANNAPPAN, R., REUTER, S., KIM, J.H., AGGARWAL, B.B. 2011. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215: 150-160.

- GUTTERIDGE, J.M.C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry* 41: 1819-1828.
- GULCIN, İ., BEYDEMİR, S., SAT, G., KUFREVİOĞLU, O.I. 2005. Evaluation of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus Mas* L.). *Food Chemistry*, 34: 193-202.
- HABIG, W. H. and JAKOBY, W. B. 1974. Assay for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods in Enzymology*, 77: 398-405.
- HALL, N.J., ALI, J., PIERRO, A. and EATON, S. 2005. Total glutathione is not decreased in infants with necrotizing enterocolitis. *J pediatr Surg*. 94: 132-137.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed.; Oxford University Press, pp. 10-121. New York.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford , pp. 188-196.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. 2007. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 4th ed. Oxford.
- HAMED, R., FARID, N.M., ELOWA, S.H.E., ABDALLA, A.M., 2003. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist*, 23: 313-322.
- HASTURK, S. 2000. Akciğer Kanseri'nin Moleküler Biyolojisi. In: Akciğer Kanseri. 1st ed. Özlem Grafik Matbaacılık, İstanbul, 392.
- HEBBAR, V., SHEN, G., HU R., KIM, B. R., CHEN, C., KORYTO, P. J., CROELL, J. A., LEVINE, B. S., KONG, A. N. 2005. Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sciences*, 76: 2299–2314.
- HECHT, S. S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (14): 1194-1210.
- HENRY-VITRAC, C., DESMOULIE'RE, A., GIRARD, D. and ME'RILLION, J.M. 2006. Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr*. 45: 376-382.
- <http://www.kanser.gov.tr/>
- <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>
- HUSSAIN, S.P., HARRIS, C.C. 2000. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutation Research*, 462: 311-322.
- JACOBSON, D. 1999. Lung tumors: fundamental biology and clinical management: Ras mutations in lung cancer. Editors: Brambilla, C., Brambilla, E., 1st edition, Marcel Dekker, New York, pp. 139–156.

- JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K. V., THOMAS, C.F., *et al.* 1997. Cancer chemoprevention activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-227.
- JANNIN, B., MENZEL, M., BERLOT, J.P., DELMAS, D., LANCON, A., LATRUFFE, N. 2004. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol*, 68 (6): 1113-1118.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E., FORMAN, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61: 69–90.
- KASDALLAH-GRISSA, A., MORNAGUI, B., AOUANI, E., HAMMAMI, M., MAY, M.E., GHARBI, N., KAMOUN, A., EL-FAZAA, S. 2007. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*, 80 (11): 1033-1039.
- KELLEY, M.R. and FISHEL, M.L. 2008. DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem*. 8(4): 417-25.
- KERAMATI, V., JAMILI, S., RAMIN, M., 2010. Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of *Rutilus rutilus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science?*
- KIDD, P.M., 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews*, 2: 155-176.
- KNAPEN, M.F.C.M., ZUSTERZEEL P.L.M., PETERS, W.H.M., STEEGERS E.A.P. 1999. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82: 171-184.
- KOC,S. 2008. Glutatyon S–transferaz genindeki delesyonların (gstt1, gstm1) koroner arter, hastalığı ve akut miyokart infarktüsü ile ilişkisi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- KOCATURK, P. A., OZELCI KAVAS, G., BUYUKKAGNICI, D. İ. 2007. Resveratrol: Is There Any Effect On Healthy Subject?. *Biological Trace Element Research*, 118: 250-254.
- KOCSIS, Z., MARCSEK, Z.L., JAKAB, M.G. , SZENDE, B. and TOMPA, A. 2005. Chemopreventive properties of trans - resveratrol against the cytotoxicity of chloroacetanilide herbicides in vitro. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*. 208: 211–218.
- KOKTURK, N., KIRISOĞLU C.E., OZTURK C. 2003. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum* 5: 127-138.
- KOKTURK, N., OZTURK, C., KIRISOĞLU, C.E. 2003. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 5 (3): 139-145.

- KOUR, H., PERKINS, M.J. 1991. The free radical chemistry of food additives, In Ed: Arvoma O.I, Halliwell B. *Free radicals and food additives*, 1991; New York.
- KRAFT, T.E., PARISOTTO, D., SCHEMPP, C., EFFERT, T. 2009. Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49: 782–799.
- KULLINSKY, V. I., KOLESNICHENKO, L.S. 1990. USP. *SOVR BIOL*. 110: 20 -23.
- KUMAR, S. 2011. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*. 2 (1): 129-135.
- KUMAR, B., IQBAL, M.A., SINGH, R.K. and BAMEZAI, R.N. 2015. Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. *Biochimie*. 118: 26-35.
- KUNDU, J.K. and SURH, Y.J. 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett*, 269: 243–61.
- KURUTAS BELGE, E., INANC GULER, F., KILINC, M. 2004. Serbest Radikaller. *Arşiv*, 13: 120-130.
- LAWRENCE, R.A., and BURK, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemistry and Biophysic Research communication*, 71: 952-958.
- LEON-GONZALEZ, A.J., AUGER, C. and SCHINI-KERTH, V.B. 2015. *Biochemical Pharmacology* 98: 371–380.
- LEONARD, S. S., XIA, C., JIANG, B.-H., STINEFELT, B., KLANDORF, H., HARIS, G. K., SHI X. 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309: 1017-102.
- LIAO, P.C., NG, L. T., LIN, L. T., RICHARDSON, C. D., WANG, G. H. and LIN, C. C. 2010. “Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells”. *Journal of Medicinal Food* 13 (6) : 1415-23.
- LIN, C.Y., HSIAO, W.C., WRIGHTB, E.D., HSU, C.L., LO, Y.C. and KAO, C.F. 2013. Resveratrol activates the histone H2B ubiquitin ligase, RNF20, in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Functional Foods*. 5: 790 –800.
- LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8): 118-126.
- LOIZZO M. R., MENICHINI, F., CONFORTI, F., TUNDIS, R., BONESI, M., SAAB, O. A. M., STATTI, G. A., CINDIGO, B., HOUGHTON, P. J., MENICHIMI, F., FREGA, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 117: 174–180.

- LU, S.C. 2000. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul.* 36: 95 – 116.
- LUO, G., LI, Z., WANG, Y., WANG, H., ZHANG, Z., CHEN, W., ZHANG, Y., XIAO, Y., LI, C., GUO, Y. and SHENGI, P. 2016. Resveratrol Protects against Titanium Particle-Induced Aseptic Loosening Through Reduction of Oxidative Stress and Inactivation of NF- κ B. *Inflammation.* 39(2): 775-784.
- MA, L., LI, W. and WANG, R. 2015. Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *International journal of oncology.* 47 (4): 1460-1468.
- MABRY, M. 1998. Biology of Lung Cancer: Activating oncogenes in lung cancer. Editors: Kane, M., Bunn, P. , New York, Marcel Dekker, 122: 391–412.
- MARNETT, L. J. and PLASTARAS, J. P. 2001. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.*, 17: 214-221.
- MARTIN, AR., VILLEGAS, I., SANCHEZ-HIDELGO, M., DE LA LASTRA, CA. 2006. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br. J. Pharmacol*, 147: 873–885.
- MARTINEZ, J., MORENO, J.J. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol*, 59 (7): 865-70.
- MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARI, R., FILESI, C. and GOVANNINI, C. 2005. Novel mechanism of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione – related enzymes. *Journal of nutritional Biochemistry.* 16: 577 -586.
- MASON R.J., BOUSEY, H.A. 2000. Textbook of respiratory medicine. W.B. Saunders Co pp. 1395-1407. Philadelphia.
- MATEOS, R., LECUMBERRI, E., RAMOS, S., GOYA, L. and BRAVO, L. 2005. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, 827: 76-82.
- MAZO, V.K., ROS, Z. 1998. Gastroenterol. *Gepatol.Koloproktol* 1: 47 – 53.
- MEISTER, A. 1995. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.*, 251: 3–7.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760.
- MEMISOGULLARI, R. 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3: 30-39.

- MIKULSKI,, D., GORNIK, R., MOLSKE, M. 2010. A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. *Eur. J. Med. Chem.* 45: 1015-1027.
- MUSELLIM B. 2007. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum Dizisi No:58 I -113-118.
- NEVES, A. R., LUCIO, M., LIMA, J. L.C. and REIS, S. 2012. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. *Current Medicinal Chemistry*, 19(11): 1663-1681.
- NDIAYE, M., KUMAR, R., AHMAD, N. 2011. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1215: 144-149.
- NONOMURA, S., KANAGAWA, H., MAKIMOTO, A. 1963. Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc)]. *Yakugaku Zasshi*, 83: 988–990.
- NORDBERG, J., ARNER, E.S.D. 2001. Reactive Oxygen Species, Antioksidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31 (11): 1287-1317.
- OLAS, B., NOWAK, P., KOŁODZIEJCZYK, J., PONCZEK, M., WACHOWICZ, B. 2006. Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7 (2) : 96-102.
- OZBASOGLU, K. 2013. Akciğer kanseri ve akciğer kanserinde kullanılan tümör markörleri. Bitirme Tezi. T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri, 59 s.
- OZKAYA, A. 2007. Oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- PAGLIA, D.E. and VALENTINE, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70:158-169.
- PARABASHEELA, B. and BASKARAN, S. 2014. Alteration of glutathione dependent enzymes in pre and post operative breast carcinoma. *Med. Res. Chron.*1 (1): 73-77.
- PARKIN, M., TYCZNSKI, J.E., BOFFETTA, P., SAMET, J., SHIELDS, P., CAPORASO, N. 2004. Pathology and genetics of tumors of the lung. WHO Publications Center, pp. 5-12.

- PEDRAS, M.S.C., and AHIAHONU, P.W.K. 2005. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry*, 66: 391–411.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphatepoisoned marine bivalves. *Chemosphere*, 47: 485-497.
- QUEIROZ, A.N., GOMES, B.A.Q., MORAES, J.W.M., BORGES, R.S. 2009. A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur. J. Med. Chem*, 44: 1644-1649.
- RENAUD, S. and DE LORGERIL, M. 1992. Wine, Alcohol, Platelets and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet*, 339: 1523-1526.
- RODRIGO, R., BOSCO, C. 2006. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. *Com Biochem Phys A*, 142: 317-327.
- RUBILIO, J.A., MITHIEUX, G., VEGA, F.V. 2008. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*, 591: 66-72.
- RUBILIO, J.A., VEGA, V.F. 2008. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother*, 62 (9): 606-612.
- SANCHEZ, A.R., ALMEDIA, A. and MEDIANA, J.M. 2002. Oxidative stress in preterm rat brain is due to mitochondrial dysfunction. *Pediatr Res*, 51 (1): 34–39.
- SELLERS, T. A., BAILEY-WILSON, J. E., ELSTON, R. C., WILSON, A. F., ELSTON, G. Z., OOI, W. L., ROTHCHILD, H. 1990. Evidence for Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 82 (15): 1272-1279.
- SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRIDHAR, C., REDDY, Y.S.R., DE, B. 2010. Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences* 3 (1): 91-100.
- SENGOTTUVELAN, M., DEEPTHA, K. and NALINI, N. 2009. Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact*. 181(2): 193-201.
- SERAFINI, M. and DEL RIO, D. 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report* 9: 145-152.

- SHEN, C., CHENG, W., YU, P., WANG, L., ZHOU, L., ZENG, L. and YANG, Q. 2016. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in vitro. *Molecular Medicine Reports*. 14: 3646-3654.
- SIEGEL, R.L., MILLER, K.D. and JEMAL, A. 2016. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 66: 7-30.
- SIEMANN, E. H., CREASY, L. L. 1992. Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 49-52.
- SIRMA, E. 2013. Bitkisel flavonoid silimarın ve fenolik asit stilbenoid resveratrolün karaciğer kanseri hücrelerindeki antikanser etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli. 87s.
- SORG, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327 (7): 649-662.
- SOYOCAK, A., COŞAN, D.T., BAŞARAN, A., GÜNEŞ, H.V., DEĞİRMENCİ, İ. and MUTLU, F.Ş. 2013. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by tannic acid and resveratrol African Journal of Biotechnology. 12(12): 1431-1437.
- STEINMAN, H.M., 1982. Superoxide Dismutases: Protein Chemistry Relationship. In LW Oberley ed. Superoxide Dismutase. Vol 1. CRC Press, Boca.
- STOCCO, B., TOLEDOA, K., SALVADORA, M., PAULOA, M., KOYAMAA, N., TORQUATI TOLOIA, M. R. 2012. Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. *Mutiritas*, 72: 72-78.
- STOCKER, R. 2004. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal*, 6 (5): 841-9.
- STOJANOVIC, S., SPRINZ, H., BREDE, O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391: 79-89.
- SZEKERES, T., SAIKO, F., FRITZER-SZEKERES, M., DJAVAN, B., JAGER, W. 2011. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1215: 89-95.
- SZEWCZUK, L.M., Forti L, Stivala LA, Penning TM (2004). Resveratrol is a Peroxidase-mediated Inactivator of COX-1 but Not COX-2. *The Journal Of Biological Chemistry* 279 (21): 22727-22737.
- TAKAOKA, M.J. 1940. The phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *J Faculty Sci, Hokkaido Imperial University*, 3: 1-16.

- TANG, J.J., FAN, G.J., DAI, F., DING, D.J., WANG, Q., LU, D.L., LI, R.R., LI, X.Z., HU, L.M., JIN, X.L., ZHOU, B. 2011. Finding more active antioxidants and cancer chemoprevention agents by elongating the conjugated links of resveratrol. *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (10): 1447-1457.
- TOMAS-BARBERAN F.A. and ANDRES-LACUEVA, C. 2012. Polyphenols and health: current state and progress, *J. Agric. Food Chem.* 60: 8773–8775.
- TOWSEND, D.M., TEW, K.D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369–7375.
- TOWSEND, D.M., TEW, K.D., TAPIERO, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother*, 57: 145–155.
- TRAVERSO, N., RICCIARELLI, R., NITTI, M., MARENGO, B., FURTARO, A.L., PRONZATO, M.A., MARINARI, U.M. and DOMENICOTTI, C. 2013. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2013, Article ID 972913, 10 pages.
- TRELA, B.C., WATERHOUSE, A.L. 1996. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem*, 44: 1253-1257.
- TSAO, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2 (12): 1231-46.
- UCAR, G. 2007. Akciğer kanserlerinde siklooksijenaz-2, vasküler endotelial büyüme faktörü, osteopontin ve Human Papilloma Virüsün Prognostik Önemi. Uzmanlık Tezi, T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, 67 s.
- UCAR, O.2010. Akciğer Kanserinde PET/BT Bulguları İle Bilinen Prognostik Faktörlerin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, T. C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, 75 s.
- UNGVARI, Z., OROSZ, Z., RIVERA, A., LABINSKVY, N., XIANGMIN, Z., OLSON, S., PODLUTSKY, A. and CSISZAR, A. 2007. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(5): 2417-24.
- URPI-SARDA, M., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., JAEGER, W. 2005. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 77: 3149-3155.
- UYSAL, M. 1998. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengelyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336-41.

- VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact*, 160 (1): 1-40.
- VURAL, N. 1996. Toksikoloji. Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları. Ankara.
- WANG, Z.R., ZOU, J. G., CAO, K.J., HSIEH, T.C., HUANG, Y.Z., et al. 2005. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipids levels. *International journal of molecular medicine*, 16: 533-540.
- WASOWICS, W., NEVE, J. and PETRETZ, A. 1993. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbitric acid-reactive substances in serum; importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clinical Chemistry*, 39: 2522-2526.
- WILD, B.S. 2015. World cancer report. *IARC press Lyon*. 57.
- WISEMAN, H. 1996. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7 (1): 2-15.
- www.cancer.org/acs/groups/content/@research/.../acspc-047079.pdf
- YAR, A.S., MENEVSE, S., ALP, E., HELVACIOĞLU, F., TAKE, G. 2010. The effects of resveratrol on COX-1 and COX-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Mol Biol Rep.*, 37: 2323–2331.
- YEN, G.C., DUH, P.D., LIN, C.W. 2003. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radical Research*, 37: 509-514.
- YU, M., LI, S-M., LI, X-Y., ZHANG, B-J. and WANG, J-J . 2008. Acute Effects of 1-Octyl-3-Methylimidazolium Bromide Ionic Liquid on The Antioxidant Enzyme System of Mouse Liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 903-90.

ÖZGEÇMİŞ



Öznur YURDAKUL 1986 yılında Dazkırı/Afyon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2005 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girdi. 2010 yılında Biyolog olarak mezun oldu ve Biyoloji öğretmeni olarak özel sektörde çalışmaya başladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2014 yılında pedagojik formasyon eğitimi aldı. 2015 yılında Denizli ili Kale ilçesine Biyoloji öğretmeni olarak atandı. Halen Denizli'de görev yapmaktadır.

