ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
VFT-YL-2009-0001

RESVERATROLÜN STREPTOZOTOSİN TARAFINDAN OLUŞTURULAN GENOTOKSİK HASARI ÖNLEYİCİ ETKİSİ

Ecz. Burcu MERİÇLİ ÇANKIR

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN

AYDIN – 2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
VFT-YL-2009-0001

RESVERATROLÜN STREPTOZOTOSİN TARAFINDAN OLUŞTURULAN GENOTOKSİK HASARI ÖNLEYİCİ ETKİSİ

Ecz. Burcu MERİÇLİ ÇANKIR

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN

AYDIN - 2009

ÖNSÖZ

Günümüzde henüz tedavisi geliştirilmemiş hastalıklara çare aranmakla birlikte, diğer yandan hastalıklara yakalanmadan önlenmesi için de yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu hastalıkların en sık görülenlerinden biri, tıptaki adıyla "diabetes mellitus", günlük dildeki adıyla "şeker hastalığı"dır. Diabetes mellitus, pankreasta insülin üreten β hücrelerinin tahribatı sonucu oluşan insülin eksikliği yada hedef hücrede insülin reseptöründe rezitans gelişmesi ile oluşan kronik bir hastalıktır. Diabetes mellitus hastalığında birçok faktör etkilidir. Bunlar arasında genetik sebepler, obezite, aşırı protein içerikli diyet ve son zamanlarda üzerinde sıkça durulan oksidatif stres gibi değişik faktörler vardır.

Oksidatif stres vücuttaki oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar yönünde artması olarak nitelendirilebilir. Bu durum serbest radikaller olarak bilinen türlerin, hücre içi veya hücreler arası sistemlerde, biyomolekülleri indirgemesinden kaynaklanır. Serbest radikallerin bu etkileri sadece şeker hastalığı değil yaşlanma ve kanser gibi birçok hastalığın ve/veya bu hastalıkların komplikasyonlarının patogenezinde rol oynamaktadır. Reaktif oksijen radikalleri DNA, proteinler ve lipitler gibi makromoleküllerle etkileşerek DNA hasarı, lipit peroksidasyon ve protein oksidasyonuna neden olarak hücrenin bütünlüğünü bozarlar. Vücutta serbest radikallerin bu etkilerini engellemek amacıyla antioksidan sistemler gelişmiştir. Fakat bu sistemler vücudun korunmasını tamamen sağlayamadıkları için oksidatif stres kaynaklı veya etkili bazı hastalıklarda dışarıdan antioksidan ilavesi gerekebilmektedir. Doğal ürünlerin büyük bir bölümü, hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki olası klinik özellikleri açısından araştırılmaktadır. Fitoaleksin olarak bilinen bitki antibiyotiklerini içeren ve güçlü antifungal özellikli olan polimerler (viniferinler) familyası bu doğal ürünler arasındadır. Bu grubun en etkili üyelerinden birisi resveratroldür. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, resveratrol şu ana dek bulunan en güçlü antioksidan madde olarak literatüre geçmiştir. Bu çalışmada streptozotozin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda resveratrolün DNA hasarını koruyucu ve antioksidatif etkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırma, "Resveratrolün Streptozotosin Tarafından Oluşturulan Genotoksik Hasarı Önleyici Etkisi" isimli ve VFT-09002 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin desteği ile gerçekleştirilmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AU:	Arbitrary unit
VLDL:	Çok düşük dansiteli lipoprotein
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DM:	Diabetes mellitus
LDL:	Düşük dansiteli lipoprotein
LMPA:	Düşük erime noktalı agar
EDTA:	Etilen diamin tetra aset asidi
GHI:	Genetik hasar indeksi
HETE:	Hidroksieikosatetraenoik asit
IDDM:	İnsüline bağımlı diabetes mellitus
NIDDM:	İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus
Ca^{+2}	Kalsiyum
µM:	Mikro molar
MAPK:	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
L-NNA:	NG–nitro-L-Arjinin
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NO:	Nitrik oksit
eNOS:	Nitrik oksit sentetaz
N:	Normal
NMA:	Normal erime noktalı agar
PBS:	Phosphate buffered saline
KCL:	Potasyum klorür
PKC:	Protein kinaz C
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RSV:	Resveratrol
COX-1:	Siklooksijenaz- 1
COX-2:	Siklooksijenaz 2
NaOH:	Sodyum hidroksit
NaCl:	Sodyum klorür
STZ:	Streptozotosin
TAS:	Total antioksidan
TOS:	Total oksidan

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Resveratrol	4
1.1.1. Resveratrol İçeren Bitkiler	5
1.1.2. Resveratrolün Kimyasal Yapısı	7
1.1.3. Resveratrolün Biyosentezi	9
1.1.4 Resveratrolün Etkileri	10
1.1.4.1.Resveratrolün Antioksidan Etkisi	10
1.1.4.2. Resveratrolün Kanserden Koruyucu Etkisi	11
1.1.4.3. Resveratrolün Vazodilatör Etkisi	15
1.1.4.4. Resveratrolün Lipid Profili Üzerine Etkisi	16
1.1.4.5.Resveratrolün Östrojenik Etkisi	17
1.1.4.6. Resveratrolün Antienflamatuvar Etkisi	19
1.1.4.7. Resveratrolün Kardiyovasküler Sisteme Etkisi	19
1.2. Deneysel Diyabet Modelleri	21
1.2.1. Cerrahi Diyabet	21
1.2.2. Kimyasal Diyabet	21
1.2.3. Spontan Diyabet	23
1.2.4. Viral Diyabet	24
1.2.5. Transgenik Diyabet	24
1.3. Diyabet ve Oksidatif Stres	24
1.4. Comet Assay Yöntemi	26
1.5. Çalışmanın Amacı	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Gereç.	28
2.1.1. Cihazlar	28

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 29
2.1.3. Hayvan Materyali 29
2.2. Kullanılan Analiz Kitleri 30
2.3. Comet Assay Yöntemi 31
2.3.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 31
2.3.2. Lamların Hazırlanması 33
2.3.3. Lizis Aşaması 33
2.3.4. Elektroforez Tamponu 34
2.3.5. Elektroforezde Yürütme 34
2.3.6. Nötralizasyon 34
2.3.7. Boyama 34
2.3.8. Değerlendirme 34
2.3.9. İstatistik Analizler 36
3. BULGULAR 37
3.1. Vücut Ağırlığı Değişimleri 37
3.2. Kan Glukoz Düzeyi Değişimleri 39
3.3. Plazma Total Oksidan Kapasite Düzeyleri 41
3.4. Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri 42
3.5. Lökosit DNA Hasar Düzeyi Değişimleri 43
4. TARTIŞMA 45
5. SONUÇ 50
ÖZET 51
SUMMARY 52
KAYNAKLAR 53
ÖZGEÇMİŞ 63
TEŞEKKÜR 64

ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.1.	Bitkilerde gözlenen resveratrolün dimerleri	6
Çizelge 1.2.	Bitkilerde gözlenen resveratrolün trimerleri	6
Çizelge 1.3.	Bitkilerde gözlenen resveratrolün tetramerleri	7
Çizelge 2.1.	Çalışmada kullanılan gruplar	30
Çizelge 2.2.	Araştırmada kullanılan standart sıçan yeminin bileşimi	30
Çizelge 3.1.	Grupların 0. gün ve 45. gün canlı ağırlık değerleri	37
Çizelge 3.2.	Grupların 0. gün ve 45. gün kan glukoz değerleri	39
Çizelge 3.3.	Grupların 45. gün plazma TOS değerleri	41
Çizelge 3.4.	Grupların 45. gün plazma TAS değerleri	42
Çizelge 3.5.	Grupların 45. gün genetik hasar indeksleri	43

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.	Resveratrolün kimyasal yapısı	7
Şekil 1.2.	Trans -resveratrolün (a) ve Cis-resveratrolün (b) kimyasal formülü	9
Şekil 1.3.	Resveratrolün biyosentezi	10
Şekil 1.4.	Resveratrolün uyardığı apoptoza neden olan farklı yollar	13
Şekil 1.5.	Stilben, flavon, linan ve isoflavon arasındaki ilişki	18
Şekil 2.1.	DNA hasar derecesine göre Comet kategorileri	35
Şekil 3.1.	Sıçan 0. gün canlı ağırlıkları	38
Şekil 3.2.	Sıçan 45. gün canlı ağırlıkları	38
Şekil 3.3.	Sıçan 0. gün tokluk kan glukoz düzeyleri	40
Şekil 3.4.	Sıçan 45. gün tokluk kan glukoz düzeyleri	40
Şekil 3.5.	Grupların 45. gün plazma TOS indeksleri	41
Şekil 3.6.	Grupların 45. gün plazma TAS indeksleri	42
Şekil 3.7.	Grupların 45. gün genetik hasar indeksleri	44

1.GİRİŞ

Bilim dünyasında, bir yandan hastalıkların tedavisi için yeni imkanlar araştırılırken, diğer yandan da sağlıklı bir yaşam sürdürebilme ve hastalıkların var olmadan önlenmesi yolunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda son yıllarda üzerinde en fazla durulan konu beslenmedir. Özellikle antioksidanlar bu konuda oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Schiller ve ark 1993, Seven ve Candan 1996). Canlıda biriken oksitleyici serbest radikaller DNA kopyalanma sürecini bozarak, DNA'nın zarar görmesine neden olabilirler. Oksidasyonun insan vücudunda kanser eğilimini tetikleyebilir veya bağışıklık sistemine zarar verebilir olduğuna yönelik bulgular mevcuttur (Halliwell 1991, Valko ve ark 2007).

Son yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir (Hallivell 1989, Cheeseman ve Slater 1993, Murrant ve Reid 2001). Bu ortaklanmamış elektronlar molekülü çok kararsız hale getirirler. Serbest radikal, dış yörüngedeki elektronun ortaklanmasını sağlamak için diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek şekilde reaktif bir yapı göstermektedir (Freeman ve Crapo 1982, Gutteridge ve Halliwell 1994).

Serbest radikaller aerobik hücrelerin tüm fraksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelebilmekte ve hücrelerde tersinir ya da tersinmez değişikliklere neden olabilmektedirler (Ames ve ark 1993). Bu değişiklikler, oksidasyon, fragmantasyon, köprüleşme (disülfit bağlantısı, protein - protein bağlantısı, protein- lipid bağlantısı), protein sarmalında kesilme, floresans şeklinde olmaktadırlar. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve/veya organ hasarı meydana gelebilmektedir (Yu 1994, Yanbeyi 1999).

Serbest radikaller, kirli havada, sigara dumanında, radyasyonda (ışınım), bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında (yiyeceklerden enerji açığa çıkarma işlemi esnasında) bulunmaktadırlar ve bunlar vücuttaki hücrelere saldırırarak tahrip etmektedirler. İlk saldırıda öncelikli olarak yeni bir serbest radikal oluşmakta ve bunun ardından kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlamaktadır.Yiyecekler, kozmetikler, ilaçlar, sigara dumanı (aktif veya pasif şekilde etkilenen) ve modern yaşamın getirdiği diğer pek çok zararlı kimyasallar sayesinde de serbest radikal atağıyla karşı karşıya kalınmaktadır. İster dışarıdan gelsin ister vücut içinde oluşsun serbest radikaller vücut sağlığına zarar verirler ve herhangi bir hasar vermeden önce etkisiz hale getirilmeleri gerekmektedir (Kenneth ve ark 1998) .

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini nötralize ederek onların neden oldukları dejeneratif hastalıklar ve erken yaşlanma süreçlerini başlatan zincirleme tepkimeleri engelleyen moleküllerdir (Adewuyi 2001). Serbest radikaller kararsız ve reaktif moleküller olmalarına yol açan elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmak üzere onlara saldırmaktadırlar. Antioksidanlarsa, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluşturmaktadırlar. Eğer serbest radikaller almak istedikleri elektronu antioksidanlardan sağlarlarsa başka bir yapıya zarar vermezler (Kenneth ve ark 1998). Antioksidan mekanizmalar rutin biyokimyasal olaylarda ortaya çıkan serbest radikalleri ortadan kaldırabilir. Çesitli patolojik süreçler sonucu oksidan- antioksidan sistemin dengesi bozulabilir. Bu durumda antioksidan mekanizmalar tükenir (deplesyon). Sonuç olarak serbest radikal etkinliği artarak hücre zedelenmesi ve ölüm gelişebilir (Akkuş 1995).

Vücutta antioksidanlar şöyle sınıflandırılabilirler;

A. Etki mekanizmalarına göre

- Primer antioksidanlar (toplayıcı etki)
- Sekonder antioksidanlar (zincir kırıcı)
- Tersiyer antioksidanlar (onarıcı etki)

B. Kaynaklarına göre

- Endojen antioksidanlar

- Eksojen antioksidanlar

Vücutta meydana gelen ve genellikle oksijen kaynaklı serbest radikallerin başlattığı oksidatif hücre hasarı sürecine oksidatif stres denir. Meydana gelen serbest radikallerin toksisitesi ya direkt olarak radikal temizleyicilerle yada indirekt olarak antioksidanlarla antagonize edilir. Direkt radikal temizleyiciler, radikallerin başlattıkları zincirleme reaksiyonları ilk basamaklarda durdurarak radikallerin etkisinin artmasını önlerler. İndirek radikal temizleyiciler ise radikal süpürücü etki ile reaksiyona girmeden daha zararsız moleküllere dönüştürerek veya diğer moleküllerden serbest radikal oluşmasını engelleyerek antioksidan etki yaparlar (Cheeseman ve Slater 1993, Akgül ve ark 1999, Onat ve ark 2002).

Antioksidanların bir kısmı vücudumuzda üretilebilmekteyken, bir kısmı da dışarıdan alınmaktadırlar. Yapılan araştırmalar sonucunda besinlerle alınan antioksidanların hazır olarak satılan, tablet veya kapsül formlarından daha yararlı olduğu gözlenmiştir. Bir besinin içinde bulunan farklı unsurların beraber tüketilmesi, muhtemelen daha etkili olmaktadır (Fremont 2000). Sindirim sistemimiz ve hücrelerimiz antioksidanların doğal olanlarını daha kolay ve doğru kullanmaktadırlar. Piyasada satılan antioksidan desteklerin yararlı olabilmeleri çok farklı etkenlere bağlıdır. Ayrıca bu desteklerin bazıları hücreler tarafından kullanılamamakta, biyolojik bir yarar sağlanamamaktadır.

İdeal koşullar altında serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. Ancak bu denge özellikle günümüzde karşılaştığımız dış etkenler nedeniyle bozulmakta ve yoğun hasarlarla karşı karşıya kalınmaktadır. Yüksek kalorili beslenme, besinlerdeki katkı maddeleri, ilaç artıkları, radyasyon ve güneş ışığının kendisi, havadaki kimyasal maddeler, egzoz ve baca dumanı, karşılaştığımız birçok kanserojen madde ve stresli hayat şartları gibi bir çok etken vücudumuzun gücünü zayıflatmakta ve daha fazla antioksidan maddeye ihtiyaç duymamıza neden olmaktadır. Bilinen en eski antioksidanlar A, E, C vitamini, selenyum ve çinkodur. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalarda, resveratrol

(RSV) şu ana dek bulunan en güçlü antioksidan madde olarak literatüre geçmiştir (Berteli ve ark 1996, Fremont 2000).

1.1. Resveratrol

RSV'nin C vitaminine göre 20- 50 kat daha fazla etkili bir antioksidan olduğu saptanmıştır (Celotti ve ark 1996).

RSV ilk kez 1963 yılında, Japonlar tarafından Ko-jo-kon olarak adlandırılan *Polyganum cuspidatum* (knotweed – sivri uçlu çoban değneği) bitkisinin kurutulmuş köklerinin aktif bileşeni olarak tespit edilmiştir. Katı, toz halinde, hafif grimsi- beyaz renkte, suda kolayca çözünebilen, kaynama noktası 253 – 255°C, oktanol - su partisyon katsayısı; 3,139 LogP, pKa' sı 9,14 olan bir bileşiktir (Langcake ve Pryce 1976).

Polyganum cuspidatum bitkisinin Çin ve Japon geleneksel ilaçları arasında olup oldukça uzun yıllardan beri yangı, allerji, damar tıkanıklığı, cilt iltihabı ve hiperlipidemi gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Daha sonra Langcake ve Pryce tarafından 1976 yılında *Vitis vinifera* şaraplık üzümlerinde tespit edilen RSV'nin, daha sonra 1992 yılında Siemann ve Creasy tarafından şaraptaki varlığı da tespit edilmiştir.

RSV pek çok bitki türünden yaralanma, ultraviole ve fungal saldırılara yanıt vermek üzere sentezlenen, flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, bitkiler tarafından patojenik mikroorganizmalara karşı korunma amaçlı sentezlenen, kimyasal maddelerdir (Langcake ve Pryce 1976).

Doğada bitkilerin aynı düzeyde strese maruz kalmaları mümkün olmadığından fitoaleksin sentezi, kuşkusuz her zaman aynı miktarda olmayacaktır. Bu nedenle, RSV'nin kontrollü koşullarda elde edilmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde bu amaçla çeşitli tekniklerden yararlanılmakta olup, yılın her döneminde bir örnek ürün elde edilmesinin yolları araştırılmaktadır. Söz konusu teknikler içerisinde ise morfolojik olarak

farklılaşma eğilimindeki kallus ve hücre süspansiyonu kültürlerinden yararlanılmaktadır. Ana bitkiden kesilen doku parçasının, steril ve yapay besin ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler kallus olarak tanımlanmaktadır (Fremont 2000).

1.1.1. Resveratrol İçeren Bitkiler

Bu polifenolün fındık, üzüm, yer fıstığı, ananas ve dutun da içinde bulunduğu 72 bitki türünde varlığı belirlenmiştir. (Bitkiler ayrıca RSV'nin glukozid formunu da sentezlemektedirler. Yer fıstığı ve çam gibi birçok bitkide özellikle de üzümlerde bulunan benzer yapıdaki bileşenler, RSV'nin dimerleri (ε-viniferin) (Çizelge 1.1), trimerleri (α-viniferin, gnetin-H) (Çizelge 1.2), tetramerleri (r-viniferin) (Çizelge 1.3) olarak bilinmektedir (Fremont 2000).

RSV'yi doğal olarak üretebilen türlerin başında gelen asmalar; sofralık üzüm, şarap, kuru üzüm, sirke veya geleneksel ürünler olarak tanımlanan pekmez, pestil gibi diğer işlenmiş ürünleri ile beslenmede yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Üzümde RSV, meyve etinde çok düşük derişimlerde bulunmakta yada hiç bulunmamaktadır. Üzümün taze veya işlenmiş olarak tüketilmesinin yararları RSV' nin üzüm çeşitleri için önemli bir kalite ölçütü haline gelmesine neden olmuştur. Üzümdeki RSV' nin oda sıcaklığı, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole radyasyon, ozona maruzuyet gibi çevresel koşullardan etkilendiği ve RSV oranının değiştiği saptanmıştır (Hain ve ark 1990).

Çizelge 1.1 Bitkilerde gözlenen RSV' nin dimerleri .

Bileşik	Kimyasal Formülü	Bitki türü	Familya
ε-Viniferin	$C_{28}H_{22}O_6$	*Vitis vinifera* *Vitica affinis* *Shorea disticha* *S.stipularis* *Carex fedia* *C. kobomugi* *C. pumila*	*Vitacea* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Cyperaceae* *Cyperaceae* *Cyperaceae*
Balanocarpol	$C_{28}H_{22}O_7$	*Balanocarpus zeylanicus* *Hopea jucunda*	*Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae*
Pallidol	$C_{28}H_{22}O_6$	*Cissus pallida*	*Vitacea*
Cassigerol A	$C_{28}H_{22}O_8$	*Cassia garrettiana*	*Leguminosae*
Gnetin A	$C_{28}H_{22}O_6$	*Gnetum leyboldii*	*Gnetaceae*
Gnetin F	$C_{28}H_{22}O_6$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gnetin G	$C_{28}H_{22}O_7$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*

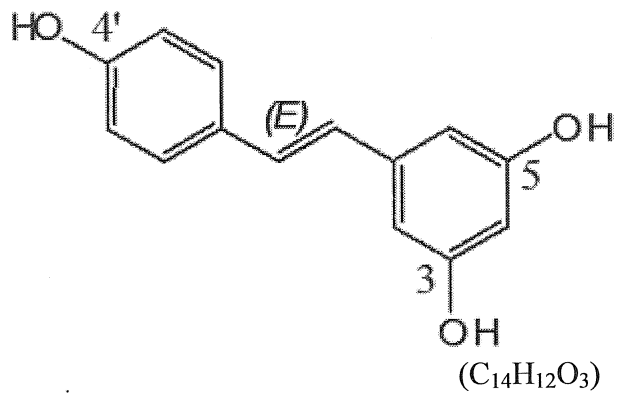
Çizelge1.2. Bitkilerde gözlenen RSV' nin trimerleri .

Bileşik	Kimyasal Formülü	Bitki türü	Familya
α-Viniferin	$C_{42}H_{30}O_9$	*Vitis vinifera*	*Vitacea*
Copalliferol A	$C_{42}H_{32}O_7$	*Vateria copallifera* *Balanocarpus zeylanicus* *Horpea cordifolia* *Shorea stipularis* *S. cordifolius* *S.elegans* *S. kanneliyensis* *S. lancifolius* *S. oblongifolius*	*Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae*
Stemonoporol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Stemonoporus affinis* *S. canaliculatas*	*Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae*
Copalliferol B	$C_{42}H_{32}O_9$	*Vateria copallifera*	*Dipterocarpaceae*
Distichol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Shorea disticha*	*Dipterocarpaceae*
Canaliculatol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Stemonoporus canaliculatus*	*Dipterocarpaceae*
Miyabenol C	$C_{42}H_{32}O_9$	*Carex fedia* *C. kobomugi* *C.pumila*	*Cyperaceae* *Cyperaceae* *Cyperaceae*
Gnetin H	$C_{42}H_{32}O_9$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gnetin I	$C_{42}H_{32}O_9$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gneti F	$C_{28}H_{22}O_6$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gnetin F	$C_{28}H_{22}O_6$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gnetin G	$C_{28}H_{22}O_7$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*

Çizelge1.3.Bitkilerde gözlenen RSV' nin tetramerleri .

Bileşik	Kimyasal Formülü	Bitki türü	Familya
α-Viniferin	$C_{42}H_{30}O_9$	*Vitis vinifera*	*Vitacea*
Copalliferol A	$C_{42}H_{32}O_7$	*Vateria copallifera* *Balanocarpus zeylanicus* *Horpea cordifolia* *Shorea stipularis* *S. cordifolius* *S.elegans* *S. kanneliyensis* *S. lancifolius* *S. oblongifolius*	*Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae*
Stemonoporol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Stemonoporus affinis* *S. canaliculatas*	*Dipterocarpaceae* *Dipterocarpaceae*
Copalliferol B	$C_{42}H_{32}O_9$	*Vateria copallifera*	*Dipterocarpaceae*
Distichol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Shorea disticha*	*Dipterocarpaceae*
Canaliculatol	$C_{42}H_{32}O_9$	*Stemonoporus canaliculatus*	*Dipterocarpaceae*
Miyabenol C	$C_{42}H_{32}O_9$	*Carex fedia* *C. kobomugi* *C.pumila*	*Cyperaceae* *Cyperaceae* *Cyperaceae*
Gnetin H	$C_{42}H_{32}O_9$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*
Gnetin I	$C_{42}H_{32}O_9$	*Welwitschia mirabilis*	*Gnetaceae*

1.1.2. Resveratrolün Kimyasal Yapısı



$(C_{14}H_{12}O_3)$

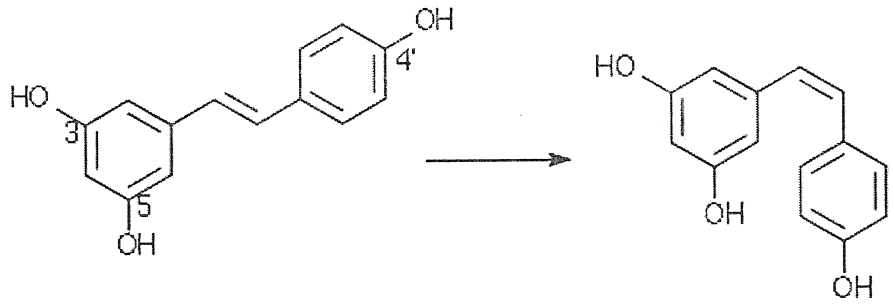
Şekil 1.1. RSV' nin kimyasal yapısı.

Bir stilben bileşiği olan RSV, iki karbon köprüsüyle bağlanmış iki fenolik halkadan oluşmuştur ve maksimum absorbans değeri yaklaşık 310 nm'dir. RSV stilben molekülünün 3, 4 ve 5 konumlarına hidroksil gruplarının bağlanmasıyla oluşmuş bir yapıdır. RSV' nin 3,

4, 5- trihidroksi- stilben ve 3,4,5- stilbenetriol olarak bilinen cis- ve trans- stereoizomerik formları bulunmaktadır. Cis- ve trans- RSV' nin glikozid formları RSV-3-O-beta-D-glikosid olarak bilinen piceid'dir. Cis- ve Trans- glikozidler cis- piceid ve trans-piceid olarak adlandırılmaktadır. Trans izomerlerinin biyolojik aktivitelerinin cis izomerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Trans RSV yapı olarak dietilstilbesterole ve 17 beta- estradiol'e benzemekte olup karma östrojenik, agonist/antagonist özelliklere sahiptir (Celotti ve ark 1996).

RSV ve türevlerinin kimyasal yapısında birden fazla aromatik halka ve hidroksil grubu bulunduğundan polifenoller grubu altında sınıflandırılmaktadırlar (Commun ve ark 2003). RSV bitkilerde fungal enfeksiyon yada ağır metal iyonları, UV- ışık ve fiziksel hasarlanmalar gibi stresli durumlara karşı, asetal- malonat ve fenilpropanoid yollarının birincil ve ikincil metabolizmaları ile p- kumaril CoA ve malonil CoA' dan sentezlenmektedir. Bu mekanizmadaki stilben sentaz (STS)'da, fenolik maddeler; malonil CoA ve p-kumaril CoA üzerinden RSV oluşumunu katalizleyen anahtar enzimdir. RSV stres altındaki bitkiler için doğal bir bitki antibiyotiğidir. Bu sebeple bitkiler aleminde hastalık engelleyici anti-fungusit fitoaleksin olarak da isimlendirilebilmektedir (Soleas ve ark 1997).

Trans-resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$; M.A= 228.25), 1,3- Benzenediol, 5- [(1E)- 2- (4-hidroksifenil) ethenil] (9Cl), 3, 5, 4 - trihidroksitilben, CA 1201, (E)- resveratrol, 3,4, 5-Stilbenetriol (7 Cl, 8 Cl), (E)- 5- [2- (4- Hidroksifenil) ethenil]- 1, 3- benzenediol (E)- 5- (p-Hidroksistiril) resorsinol resveratrol (6Cl) diye de adlandırılmaktadır. Cis- resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$; M.A= 228.25) ise, 1,3- Benzenediol, 5- [(1Z)- 2- (4-hidroksifenil) ethenil] (9Cl), 1,3- Benzenediol, 5- [2- (4- Hidroksifenil) ethenil], (Z)- (Z)- resveratrol diye de adlandırılmaktadır (Şekil 1.2.).



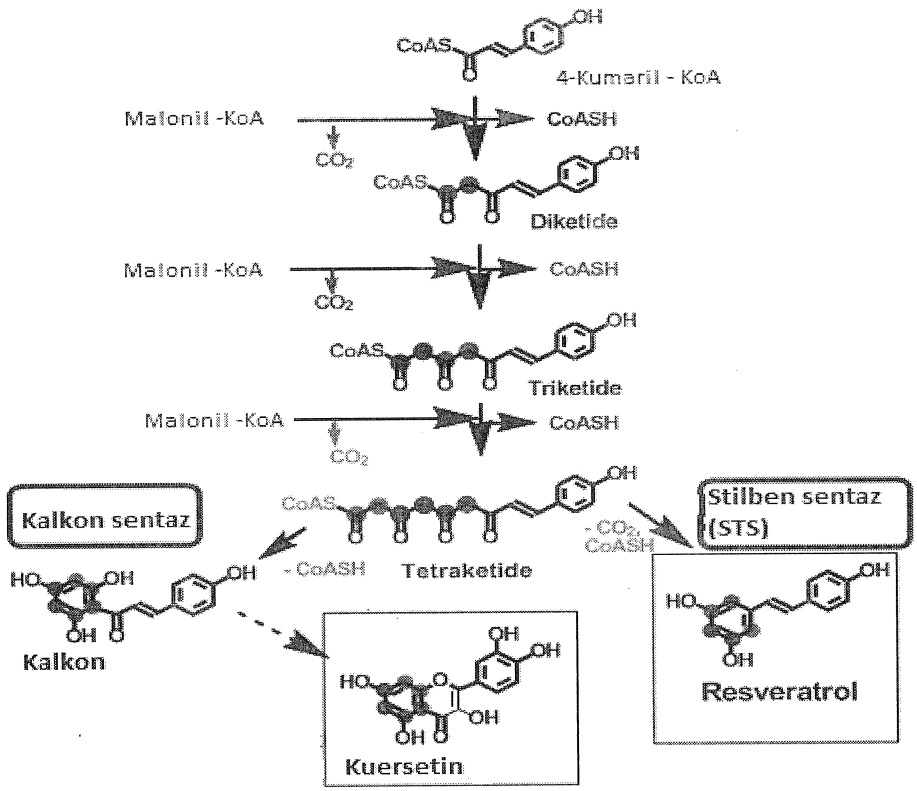
trans-resveratrol cis-resveratrol

Şekil 1.2. Trans - resveratrol ve Cis- resveratrol kimyasal formülü (Haneke 2002).

Trans- resveratrol için UV absorbans tam değeri [$UV_{\lambda max}$ (EtOH) nm (ε) 308 (30000)] iken, cis- resveratrol için [$UV_{\lambda max}$ (EtOH) nm (ε) 288 (12600)]'dir (Haneke 2002).

1.1.3. Resveratrolün Biyosentezi

RSV' nin sentezi fenil alaninden çok basamaklı bir şekilde gerçekleşmektedir. Fenil alaninden ammonia liyaz enzimiyle deaminasyon sonucu birinci basamakta sinnamik asit oluşur. Sinnamik asit, 4- hidroksilazla, p-hidroksilasyonla 4- kumarik aside dönüşür. 4- koumaril Ko-A ile ester yapısına dönüşür. 4- koumaril Ko-A, üç malonil Ko-A ünitesi ile stilben sentaz enzimiyle RSV oluşur (Fremont 2000). Ester yapısından sonraki koenzim yardımıyla RSV oluşumu aşağıdaki gibidir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. RSV' nin biyosentezi (Fremont 2000).

1.1. 4. Resveratrolün Etkileri

RSV' nin etkilerine ilişkin son yıllarda birçok araştırma yayınlanmaktadır. Bu yayınlar incelendiğinde RSV' nin sağlıkla ilgili çok yönlü etkileri olduğu görülmektedir.

1.1.4.1. Resveratrolün antioksidan etkisi

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar Güney Fransa'da yağlı diyet ve sigara kullanımının fazla olmasına rağmen bol tüketilen şarap nedeni ile koroner kalp hastalığı insidansının diğer bölgelere göre daha düşük olduğunu ortaya çıkarmış, bu duruma "Fransız Paradoksu" (French Paradox) adı verilmiştir. RSV ile ilgili çalışmaların hızlanmasında Fransız Paradoksu olgusunun etkisi büyüktür. Bu konuda yapılan yayınlar paradoksa sebep olarak kırmızı şarap içinde bol miktarda bulunan RSV' yi işaret etmiştir. RSV sayesinde düşük yoğunluktaki

lipoproteinler (LDL) damarlarda birikmeden taşınabilmektedir. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda RSV' nin trombosit agregasyonunu engellediği, dokuları iskeminin zararlı etkilerinden koruduğu ortaya konmuştur (Lorengil ve Salen 2002).

RSV' nin, LDL'de bulunan doymamış yağ asitlerinin güçlü bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuyla LDL'deki değişikliklerin arteriyoskleroz üzerinde baskın bir rol oynadığına inanılmaktadır.İlk olarak insan LDL'sine eklenmiş trans-RSV' nin bakırın katalizlediği oksidasyonu azalttığını gösterilmiştir. LDL oksidasyonunda trans-RSV asıl olarak bakır şelasyonuyla etki eder. Cis izomerinin şelasyon kapasitesi trans izomerinin yarısı kadar bulunmuştur (Fremont 2000). LDL'nin bakır bağlama kapasitesinin yüksek olduğu bilindiğinden dolayı, RSV' nin yüksek bakır şelasyon kapasitesi önemlidir. Trans izomerinin şelasyon kapasitesi cis izomerinden yaklaşık iki kat daha fazladır. RSV' nin antioksidan özelliği ve bakır şelasyon kapasitesinin yüksek olması, serbest radikal süpürücü özelliğinden kaynaklanmaktadır (Nigdikar ve ark 1998).

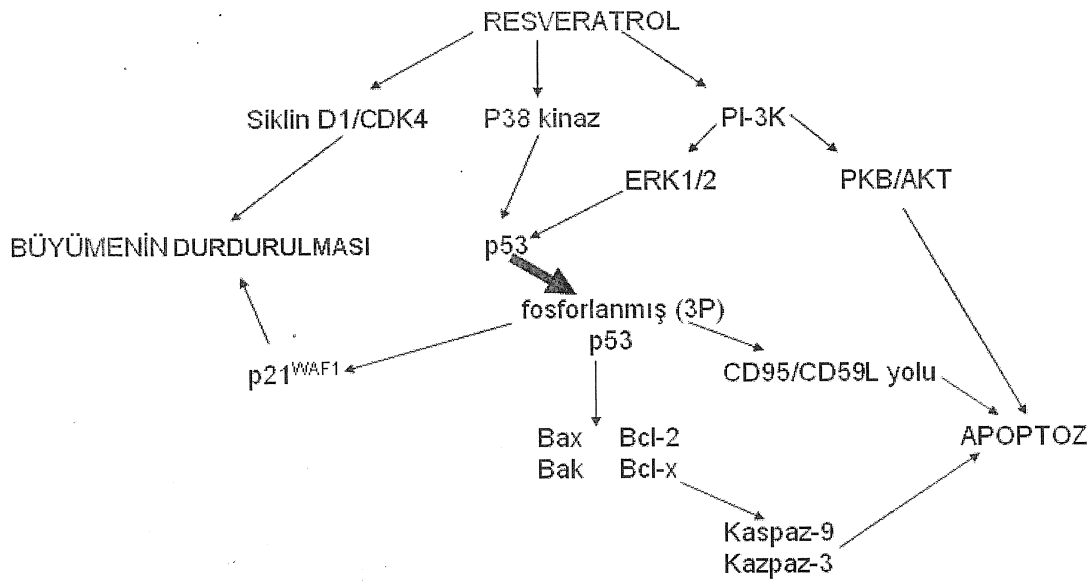
Oksidasyon LDL partiküllerinin protein kısmını (apoB) regüle B/E reseptör sistemi ile katabolizmasını bozarak etkiler. Bu nedenle polifenolik bileşikler yönünden zengin besinlerin koruyucu etkilerinin antioksidan özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Fremont 2000). Yapılan bir çalışmada RSV' nin potent hidroksil radikal süpürücü özelliği ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (Mark ve Duncan 2000). Düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonları atherogeneziste önemli rol oynarlar. Bakır ve demir gibi metaller pro- oksidan olarak etki gösteren metallerdir. (Belguendouz ve ark 1997). Düşük dansiteli lipoprotein peroksidasyonlarının demir ve bakır iyonları ile artırıldığı bilinmektedir. Serbest radikal süpürücü etkinin araştırıldığı bir çalışmada RSV' nin demir ve bakır iyonları düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (Fauconneau ve ark 1997).

1.1.4.2. Resveratrolün kanserden koruyucu etkisi

RSV' nin kimyasal yapısının tanımlanması ve bilimsel yaklaşımların kurulması ile gerçekleştirilen çalışmalarda, kanserden korunmaya yönelik etkisi açığa çıkarılmıştır. RSV'

nin kansere karşı etkinliği 1985'li yıllarda Japonya'da başlayan çalışmalarla ortaya konmuştur. Güvenilir pek çok kanıtın desteğiyle kanserin pek çok safhasında durdurucu ve engelleyici özelliği ile birinci dereceden doğal tedavi sağlamaktadır. RSV sadece kanser önleyici değil, ek tedavi olarak da önerilmektedir. RSV üzerine yapılan çalışmalarda; RSV' nin eşsiz bir hücre yok etme sistemine sahip olduğu, tümor baskılayıcı gen p53 olsa da olmasa da tümor hücrelerini yok ettiği ifade edilmiştir (Bertelli ve ark 1996).

RSV' nin kansere karşı kimyasal koruyucu özelliği olduğu ilk kez 1997 yılında belirlenmiştir (Latruffe ve ark 2002). Bu aktivite için bileşiklerde hidroksil grubu gerekmektedir. RSV' nin karsinojenezin üç majör basamağında kanser önleyici aktivitesi vardır (Fremont 2000). RSV antikanser ve antimutajen olarak rol oynar ve karsinojenlerin detoksifikasyonunu indükler. Antienflamatuar süreci siklooksijenaz-1 (COX-1) ve hidroperoksidaz fonksiyonlarını inhibe ederek gerçekleştirir. Bunun yanında hücre farklılaşmamasını indükleyerek kanser gelişimini engeller (Bertelli ve ark 1996). Birçok kemoterapötik maddenin apopitotik hücre ölümünü uyararak tümör hücrelerini ortadan kaldırdıkları bilinmektedir (She ve Bade 2001). Apoptozis süreci, organizma gelişiminde, dokuların homeostasisinin korunmasında ve çok hücreli organizmalarda istenmeyen veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında gerekli bir mekanizmadır. Tümör hücrelerinde CYP1B1 adlı bir enzim bulunduğu bildirilmiştir . Bu enzim resveratrolü Piceatannol'a dönüştürür. Bu madde antikanserojen olarak bilinmektedir. Piceattannol kanser hücrelerini apoptozise zorlar. CYP1B1 enzimi yalnızca tümör hücrelerinde bulunduğu için sağlıklı hücreleri etkilemeksizin tümör hücrelerini etkiler (Aziz ve ark 2003). RSV' nin apoptozisi uyardığı, JB6 epidermal hücreleri, promiyelosit lösemi hücreleri, çeşitli kolon kanseri hücre serileri, meme kanseri hücre serileri ve prostat kanser hücrelerinin de dahil olduğu çeşitli hücre gruplarında bildirilmiştir (Kim ve Chang 1990). Aşağıda RSV' nin uyardığı apoptoza neden olan farklı yollar gösterilmektedir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. RSV' nin uyardığı apoptoza neden olan farklı yollar.

RSV' nin insan meme kanseri hücrelerinde dioksin ve benzopirinlerin arilhidrokarbon aracılı kanserojen etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Sitokrom P450, arilhidrokarbon hidroksilaz olarakta bilinmekte olup polisiklik aromatik hidrokarbonların prokarsinojenik aktivasyonunda rol almaktadır. P450 1A1'in inhibitörleri akciğer kanserinde oldukça etkili bulunmuşlardır. RSV insan akciğer mikrozomlarında sitokrom p450 1A1'i selektif bir şekilde inhibe etmiştir. İnsan hepatoma HepG2 hücrelerinde RSV' nin derişim bağımlı bir şekilde P450 1A1'i inhibe ettiği ortaya konmuştur. Ayrıca benzopirin ile uyarılmış sitokrom 1A1 mRNA proteinindeki artışı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. İnsan meme karsinoma dizilerinde dimetilbenzantrasen ile uyarılan sitokrom 1A1 aktivitesini doğrudan inhibe etmiştir (Hsieh ve ark 1999). Sitokrom P450 3A4 ince barsakta en çok bulunan enzimlerden bir tanesi olup birçok ilacın barsaktan dolaşıma geçişini engellemektedir. RSV zaman ve derişim bağımlı olarak bu enzimin aktivitesini de azaltmıştır (Chan ve Delucchi 2000).

Antikanserojen tedavinin ana hedeflerinden bir tanesi de tirozin kinaz ailesi enzimlerin inhibisyonudur. RSV' nin bu enzim ailesinde anlamlı inhibisyon yaptığı insan plasental ve prostatik adenoma hücrelerinde gösterilmiştir (Palmieri ve ark 1999). Bu tedavinin bir diğer hedefi de protein kinaz C' nin (PKC) inhibisyonudur. Çünkü PKC tümör gelişiminde anahtar rol oynamaktadır. RSV kalsiyum fosfatidilgliserin ile uyarılan beyin PKC aktivitesini anlamlı olarak inhibe etmektedir (Stewart ve ark 1999).

Ayrıca prostaglandin sentezinin inhibisyonu ile de tümör gelişiminin yavaşladığı rapor edilmiştir. RSV' nin antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz- 2 aktivitelerinin inhibisyonu, karsinojenezin inhibisyonu, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (Jang ve ark 1997).

RSV' nin kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişim dönemlerine nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Tümör başlangıcına etkisi hayvan modellerinde antimutajen ve serbest radikalleri inhibe etmesi ile antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır. Cox-1 inhibisyonu ile tümör ilerleme aktivitesini azalttığı gözlenmektedir. Bu enzim proinflamatuvar madde olan araşidonik asitten değişerek oluşan bir maddedir ve tümör gelişimini uyarır. RSV 100 µg/ml Cox-1 enzimini %98 oranında inhibe etmektedir. Gelişimle ilgili çalışmalar göstermektedir ki insan promyelotik lösemi hücrelerinin farklılaşmasını teşvik etmektedir ve ribonükleotid redüktazı inhibe etmektedir. Çoğalan hücrelerde DNA sentezi için bir enzime ihtiyaç vardır. RSV' nin kan-forming hücrelerine karşı minimum toksik etkisi anti-kanser potansiyelini cazip kılmasıyla karakterizedir. Nitekim deneklerle (fare, tavşan) yapılan çalışmalarla bu durum büyük ölçüde ortaya konmuştur (Wang ve Ng 1999).

Kemik iliği nakline uğrayan hastalarda RSV' nin tümör hücrelerini temizleyerek nüks etme oranını azalttığı gözlenmiştir. Hemapoetik sistemde RSV' nin inhibitör etkisi kısmen dönüşümlü, oysa lösemi hücrelerinde dönüşümsüzdür. Kemoterapi ve radyoterapi kanser tedavisinde kullanılan vücuda ciddi zarar veren ancak kanser tedavisinde henüz alternatifleri geliştirilemeyen tedavi şekilleridir. Kemoterapi ilaçları kanser hücrelerini hedef alırken normal hücrelere de zarar vermektedir. Kemoterapi tedavisi sırasında zarar gören hücrelerin başında, kemik iliği (bu nedenle kan değerleri düşer), saç hücreleri (saçlar dökülür), sindirim sistemi hücreleri gelmektedir (She ve Bade 2001).

Kemoterapi ve radyoterapi sırasında özellikle bazı bitkisel ürünler kullanılmaktan kaçınılmaktadır. Çünkü kullanılan bitkisel ürün (ısırgan otu, aloe vera vb.) kanseri önleyici özelliği yanında karaciğer enzimlerini bozması, normal hücreleri koruyan bir bitkisel tedavi iken kanserli hücreleri de koruması, özellikle kemik iliğinin baskılanarak çalışmasının engellemesi vb. gibi yan etkiler nedeniyle zaten zor olan kemoterapinin daha da içinden çıkılmaz bir hal almasına neden olmaktadır. Oysa siyah üzüm bu açıdan mükemmel bir meyvedir. Siyah üzümde bulunan RSV; kemik iliğini koruyan ve çalıştıran ender

maddelerden biridir. Bu nedenle siyah üzüm şurubu kullanan kemoterapi hastalarında kan değerleri düşmemektedir, bu hastalar özellikle trombosit almaya ihtiyaç duymazlar.

1.1.4.3. Resveratrolün vazodilatör etkisi

Polifenoller içerisinde RSV' nin etkili bir vasküler düz kas gevşetici olduğu düşünülmektedir. Noradrenalin ile kastırılan endotelli aortalarda RSV $3x10^{-5}$ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda kasılmaları anlamlı şekilde azaltmış ancak 1μM L-NNA ile inkübasyon yapıldığında RSV' nin bu kasılmayı azaltıcı etkisi ortadan kalkmıştır. 10^{-5} M fenilefrin ile prekontrakte edilen dokularda ise RSV 10^{-5} M ve üzerindeki konsantrasyonlarda gevşeme oluşturmuş ve bu gevşeme 1μM NG- nitro- L- arjinin (L-NNA) ile ortadan kalkmıştır. $6x10^{-5}$ M'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ise RSV' nin endotelsiz dokularda da gevşeme oluşturduğu ve bu gevşemenin L-NNA inkübasyonundan etkilenmediği gösterilmiştir (Chen ve Pace-Asciak 1996).

İzole domuz koroner arterlerinde RSV' nin vazodilatör etki mekanizmasını incelemeye yönelik yapılan bir çalışmada 30 mM potasyum klorür (KCI) ile prekontrakte edilen dişi ve erkek endotelli ve endotelsiz domuz koroner arterlerinde 1-100 mM RSV' nin etkisi 100 μM L-NNA, 10 μM tamoksifen (estrojen reseptör antagonisti), 10 μM sodyum ortovanadat (tirozin fosfataz inhibitörü), 10 μM indometazin (siklooksijenaz inhibitörü), 10 μM propranolol (-adrenoseptör antagonisti), veya 10 μM sikloheksimidin (protein sentez inhibitörü) 20 dakika pre-inkübasyonundan sonra incelenmiştir. RSV' nin endotelli dokuda oluşturduğu gevşetici etki endotelsiz dokuya göre daha yüksek bulunmuştur. L- NNA inkübasyonu ile de RSV' nin oluşturduğu gevşemeler azalmıştır. 10 μM indometazin ve 10 μM propranolol inkübasyonu RSV' nin oluşturduğu gevşemeleri etkilememiştir. Vazodilatör prostanoidlerin ve -adrenoseptörlerin domuz izole koroner arterlerinde RSV' nin gevşetici etkisinde rol almadığı gösterilmiştir. Tirozin fosfataz inhibitörü olan 10 μM sodyum orto-vanadatın pre-inkübasyonu sonucu RSVle oluşan gevşemenin kısmen azaldığı gösterilmiş ve bu azalma sodyum orto-vanadatın tirozin fosforilasyon bağımlı mekanizmalar yoluyla eNOS aktivitesini azaltabilme yeteneğine bağlanmıştır. 10 μM tamoksifen veya 10 μM sikloheksimid preinkübasyonu da RSV' nin vazodilatör etkisini etkilememiştir. Bu da, RSV'

nin akut vazodilatör etkisinde estrojen reseptörlerinin rol almadığını ve bu gevşetici etkinin genomik mekanizmalardan bağımsız olarak gerçekleşmesine bağlanmıştır (Li ve ark 2006). Yine bu çalışmada RSV doz bağımlı olarak (15μM) KCI kontraksiyonlarını inhibe etmiştir. 30 μM RSV inkübasyonu ise kalsiyum doz cevap eğrisini sağa kaydırmış ve maksimum kasılma cevabını azaltmıştır. Bu verilerden RSV' nin kalsiyum antagonisti özelliğe sahip olduğu ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından ekstraselüler kalsiyum geçişini inhibe edebilecegi sonucu çıkarılabilir (Li ve ark 2006). RSV' nin endotel bağımlı gevşetici etkisinin, endotel hücrelerinde [Ca^{+2}] düzeylerindeki artışa bağlı olduğu, fakat vasküler düz kas kontraksiyonundaki direkt inhibisyon yapıcı etkisinin Ca^{+2} duyarlılığındaki azalmaya bağlı olarak gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Buluç ve Demirel 2006).

Endotelin, kardiyovasküler bozuklukların endojen mediyatörleri arasında yer almaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda endotelin düzeyinin kardiyovasküler hastalıklarda arttığı ve endotelin reseptör blokörlerinin kullanılmasının bu hastalık komplikasyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Domuz koroner arter düz kas hücrelerinde, RSV' nin mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz aktivitesini inhibe ettiği ve endotelin- 1'in stimülan etkilerini bloke ederek koroner arter düz kasına nükleer translokasyonunu önlediği gösterilmiştir (El-Mowafy ve White 1999). Oksidatif stres endotelin-1 oluşumunu ve otokrin endotelin-1 aktivitesini vasküler düz kas hücrelerinde arttırmaktadır. Bu etki 100 μM RSV ile inhibe edilmektedir. Hiperkolesterolemik tavşanlarda, 3mg/kg/gün 12 hafta boyunca uygulanan RSV tedavisinin plazma endotelin-1 düzeylerini düşürdüğü ve plazma nitrik oksid (NO) düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Zou ve ark 2003). RSV 2- 4 mg/kg miktarlarda intragastrik olarak 5 hafta boyunca verildiğinde endotel kazınması sonucu ortaya çıkan intimal hiperplaziyi belirgin olarak zayıflatmaktadır. Aynı çalışmada kültüre edilmiş tavşan damar düz kas hücrelerinde DNA sentezinin, RSV ile doza bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (Zou ve ark 2000).

1.1.4.4. Resveratrolün lipid profili üzerine etkisi

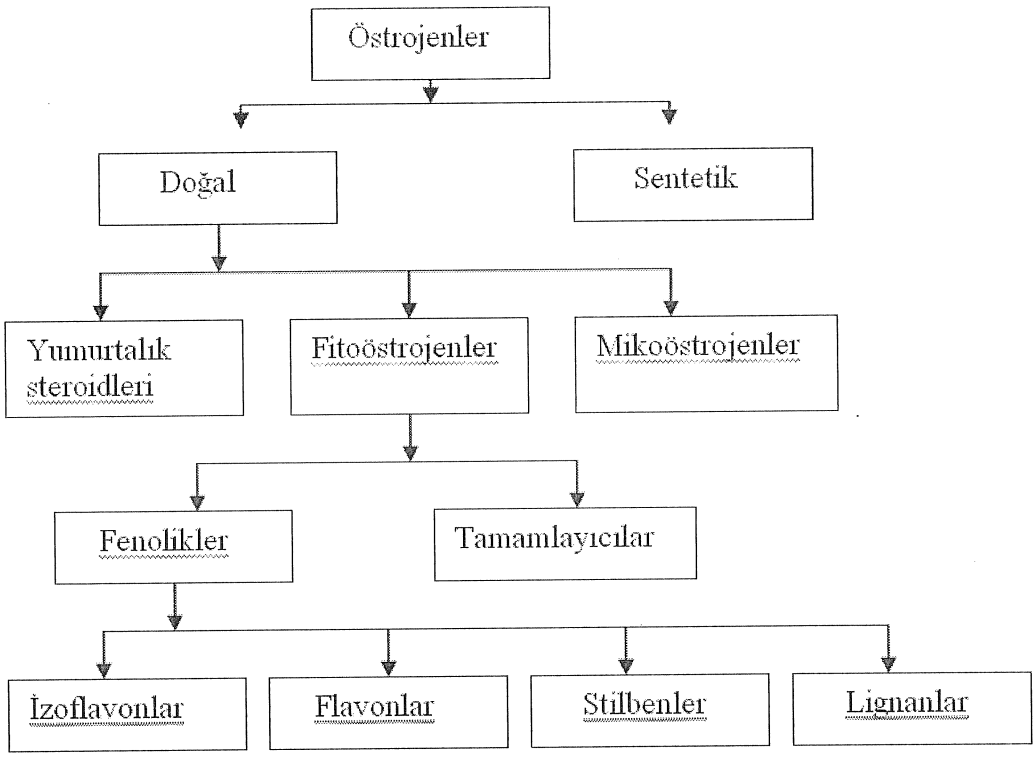
RSV besinlerin parçalanması sonucunda oluşan serbest radikallerin kılcal damarlara saldırmasında güçlü bir antioksidan görev üstlenerek düşük yoğunluktaki lipoproteinlerin

oluşumunu ve kılcal damarlarda birikmesini engeller (Çelik 2002). Diyet içinde 20 gün boyunca 50-100 mg/l RSV desteğinin düşük yoğunluklu lipoprotein ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) düzeylerini düşürdüğü ve bunun feçes içinde safra asitlerinin atılımındaki artışa paralel seyrettiği saptanmıştır (Miura ve ark 2003).

1.1.4.5. Resveratrolün östrojenik etkisi

Trans RSV ve sentetik bir östrojen olan dietilstilbesterol arasındaki yapı benzerliği maddenin östrojenik aktivitesi olabileceğini düşündürmektedir. Gehm ve arkadaşları (1997), östrojen pozitif ve negatif insan göğüs adenokarsinoma hücrelerini kullanarak, RSV' nin diğer etkileri için gerekli olan konsantrasyonlarda östrojen reseptörüne bağlanmak için östradiol ile yarıştığını göstermiştir (Gehm ve ark 1997).

RSV' nin östrojen reseptörlerinden hem östrojen reseptörü α hem de β' ya eşit olarak bağlandığı saptanmıştır (Pervaiz 2003). RSV tek başına verildiğinde östrojen reseptör bağımlı transkripsiyonel olayları zayıf bir şekilde indüklemekte fakat 17- β - östradiol ile birlikte verildiğinde tam tersine transkripsiyonel olayları inhibe etmektedir. 17- β - östradiol insanlarda dahil olmak üzere bir çok türde ana fizyolojik östrojendir (Soleas ve ark 1997). RSV, östrojen reseptörlerine bağlanıp onları aktive edebildiği için fitoöstrojen olarak tanımlanmıştır (Gehm ve ark 1997). Doğal östrojen grubundan olan fitoöstrojenler, kimyasal yapılarına göre; izoflavonlar, flavonlar, stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılır (Büyüktuncer ve Başaran 2005). Aşağıda şekil 1.5. 'de stilben, flavon, linan ve isoflavon arasındaki ilişki verilmiştir.



Şekil 1.5. Stilben, flavon, linan ve isoflavon arasındaki ilişki (Fremont 2000).

RSV hem östrojen reseptörü-α' ya hem de β' ya bağlanmaktadır ama östrojen reseptörü β'nın agonist aktivitesi α ' nın agonist aktivitesinden daha yüksektir. Östrojen reseptörü beta reseptöründen zengin dokular, RSV' nin agonist aktivitesine daha duyarlıdır fakat, genel olarak bütün fitoöstrojenik aktiviteli bileşiklerin potensi 17- β - estradiole göre 100 kez daha düşüktür (Bowers ve ark 2000). Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalısmada östrojen varlığında RSV' nin antiöstrojenik etki oluşturduğu östrojen yokluğunda ise östrojenik/antiöstrojenik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (Bhat ve ark 2001). RSV doğal olarak regüle edilmiş gen ekspresyonunu arttırmış ve östrojene bağımlı göğüs kanser hücrelerinin poliferasyonunu stimüle etmiştir. Ancak aynı tipte östrojen pozitif insan göğüs kanser hücrelerinde daha yüksek konsantrasyonlarda RSV hücre poliferasyonunu inhibe etmiştir (Fremont 2000).

1.1.4.6. Resveratrolün antienflamatuvar etkisi

Enflamasyon öncesi sentez süreçlerinde iki önemli enzim sistemi vardır. Bunlar siklooksijenaz (COX) ve lipo oksijenaz (LOX) yollarıdır (Soleas ve ark 1997).

Prostaglandin H sentaz olarak da bilinen siklooksijenaz' ın siklooksijenaz 1 (COX-1) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Gusman ve ark 2001). Bunlardan ilki olan COX-1 sürekli olarak ifade edilir; mukozal bütünlük, gastrik mikrosirkülasyon ve motor fonksiyonların korunmasında önemli rolü vardır (Krishna ve ark 2002). COX-2 ise uyarılabilir konumdadır; beynin, böbreklerin ve kanserli dokuların belli bölgelerinde ifade edilmektedir. COX-2 sitokinler ve endotoksinler tarafından uyarılmakta ve enflamasyonel reaksiyonlarda rol almaktadır (Pervaiz 2003). Siklooksijenaz yolunda araşidonik asit prostaglandinlere metabolize edilmektedir. Prostaglandinler hücre çoğalmasını arttırarak, bir yandan tümör angiogenezini uyarırken aynı zamanda immün sistemi baskılayarak, tümör hücre gelişimine neden olmaktadırlar. Bu nedenle prostaglandin biyosentezinin COX' un seçici inhibisyonu ile baskılanması kanserden korunmada yeni bir kimyasal strateji olarak önerilmektedir (Joe ve ark 2002). Diğer bir yol olan lipoksijenaz yolunda, araşidonik asit hidroksieikosatetraenoik asitlere (HETE) veya lökotrienlere metabolize edilmektedirler. Lipoksijenazın temel rolü bilinmemekle birlikte bu enzimin artmış düzeylerinne bronşit, hepatit ve astımda rastlanmaktadır (Krishna ve ark 2002).

RSV' nin 5- lipoksijenazı ve prostaglandin sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir. RSV' nin konsantrasyona bağlı olarak COX-1 etkisini inhibe ettiği bilinmekle beraber, bunun yanı sıra RSV' nin COX-2 etkisini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalarda RSV' nin COX-2' nin etkisini engellediği bildirilmişken, bazılarında ise COX-2' nin etkisine bir etkisi olmadığı veya etkisini çok az arttırdığı bildirilmiştir (Soleas ve ark 1997).

1.1.4.7. Resveratrolün kardiyovasküler sisteme etkisi

RSV potansiyel kardiyoprotektif bir maddedir. Madde, LDL oksidasyonunu inhibe etmekte, platelet agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu da inhibe etmektedir. Ayrıca

in- vivo çalışmalarda RSV, sıçan karaciğerinde yağlanmayı azaltmakta ve insan plataletleri ve nötrofillerinde de proatherojenik ürünlerin oluşmasını durdurmayı da sağlamaktadır. Bahsedildiği üzere RSV, kardiyovasküler koruyucu etkisini kuvvetli antioksidan özelliği dolayısıyla kazanmaktadır. Vücutta çeşitli sebeblerle oluşan ve birçok hastalığın oluşmasına ve doku hasarlarının meydana gelmesine yol açan süperoksit iyonların ve hidrojen peroksit ürünlerinin yakalanmasında ve yok edilmesinde kuvvetli aktivite göstermektedir. Bu aktivitesini de glutatyon ile birlikte çalışarak sağlamaktaktadır. RSV' nin kardiyovasküler sistem üzerine etkileri ve etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Burada RSV' nin rolü, hastalığın patogenezinde rol oynayan polimorfonükleer lökositlerin fonksiyonlarını düzenleme kapasitesi ile ilişkili olabilir. Çalışmalarda RSV' nin polimorfonükleer lökositlerce aktive edilen enflamatuvar medyatörlerin salımını etkilediği ve adezyon bağımlı trombojenik polimorfonükleer lökosit (PNL) fonksiyonlarında down-regülasyon yaptığı tespit edilmiştir (Fremont 2000).

Ayrıca tüm bu etkilerinin dışında; üzüm çekirdeğinin, gece görüşünde önemli olan parlak ışıkların neden olduğu göz kamaşmasını geçirmeye yardımcı olduğu da kanıtlanmıştır. Yine Fransa'da 100 denek üzerinde yapılan iki ayrı araştırma da 5 hafta boyunca günde 200 mg üzüm çekirdeği kullanarak, parlak ışıklara maruz kaldıktan sonra görme keskinliğine yeniden kavuşma durumunun artırdığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca, yine bazı testlerde üzüm çekirdeği preparatlarının, bilgisayar ekranı karşısında çalışmanın neden olduğu göz gerilimini geçirdiği ve miyop kişilerde retinanın işlevini ve duyarlılığını düzelttiği görülmüştür (Rabini ve ark 1997).

Ancak tüm bu yararlı etkilerinin yanında RSV ile ilgili dikkat edilmesi gereken hususlarda vardır. Günümüze kadar üzüm çekirdeği ekstresi hakkında önemli herhangi bir yan etki bulunduğuna dair bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Ayrıca, herhangi bir ilaç etkileşimide günümüz bilgileriyle mevcut olmamakla birlikte kolesterol düşürücü ilaç kullanan kişilerde yine de tedbirli olmak gerektiği konusunda uyarılar bulunmaktadır. Ayrıca üzüme alerjisi olan kişilerde yorgunluk, bulantı gibi belirtilerin meydana geldiği bildirilmiştir. Üzüme karşı herhangi bir allerjisi olmayan sağlıklı kişilerde ekstreleri içeren formülasyonlar ya da ekstrelerin gün içerisinde 50- 200 mg aralığında kullanılması tavsiye edilmektedir (Mizutani ve ark 2001).

Özellikle son yıllarda üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan ve insanlık açısından son derece önemli olan bu maddenin üretimi ve üretim verimini arttırma yönündeki çalışmaların biyoteknolojiye dolayısıyla insanlığa büyük bir hizmet olacağı açıktır (Lorengil ve Salen 2002).

1.2. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesi ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde deneysel diyabet modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Çok çeşitli deneysel diyabet modelleri vardır. Hayvan diyabet modelleri genel olarak insan diyabetine benzerlik gösterir ancak hiçbir model insan diyabeti ile tıpatıp aynı değildir. Diyabet modelleri çeşitli şekillerde oluşturulabilir (Öztürk ve ark 1996).

1.2.1. Cerrahi Diyabet

Bu metodda hayvanlara total veya kısmi pankreatektomi yapılır insüline bağımlı diyabetes mellitus (IDDM) ve insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (NIDDM)' dakine benzer hiperglisemi vardır. Uygulama zorluğu nedeniyle rutin deneysel diyabet modeli olarak kullanılmaz (Öztürk ve ark 1996).

1.2.2. Kimyasal Diyabet

Deneysel çalışmalarda çeşitli ilaçlar ve kimyasallar diyabet benzeri tabloya neden olur. Bunlardan streptozotosin (STZ) ve alloksan en spesifik ve kullanışlı olanlardır. Diğerleri sadece bir haftalık ve reversibl diyabetojenik etki olşturur ve etkileri pankreas beta hücrelerine spesifik değildir (Öztürk ve ark 1996). Alloksan ve STZ beta hücre yıkımı ile insanlardaki IDDM'e benzer diyabet meydana getirir (Vega ve ark 1993).

Alloksan ürik asit ve glukoza benzer yapıda bir pirimidindir. STZ'den daha eski, daha az onkojenik bir ilaçtır ancak STZ'den daha az kullanılır. Çünkü hiperglisemisi daha şiddetli ve diyabet oluşumu daha zordur. Alloksan sıçan, fare, deniz kaplumbağası, kedi, koyun, maymun, balık, kuş ve güvercinlerde diyabet oluşturabilir ancak kobayda diyabet oluşturamaz. Çünkü kobaylarda çinko eksikliği bulunur ve alloksanın diyabetojenik etkisi çinko ile ilişkilidir (Mordes ve Rossini 1981).

İlk defa 1959 yılında *Streptomyces achromogenes*'den fermentasyon yolu ile elde edilen STZ yaklaşık 2 yıl kadar antibakteriyel bir ajan olarak kullanılmıştır. Fakat hiperglisemik etkisi dolayısı ile bu kullanıma son verilmiştir. Kapalı formülü; $C_8H_{15}N_3O_7$' dir. 2- deoksi- 2- (3 metil -3- nitröz üreido) -D- glukopiranoz olan STZ'nin içindeki karbon %36.23, hidrojen %70, azot %15.84, oksijen %42.23' dür (Green ve Anderson 1981).

STZ 1970 yılına kadar *Streptomyces achromogenes*'den fermentasyon yolu ile elde edilerek kullanılmaktayken bu tarihten sonra aynı biyolojik aktiviteyi gösteren sentetik STZ kullanılmaya başlanmıştır. Bu maddenin etkisi çok yönlüdür. Antibiyotik, diyabetojenik ve antitümoral etkileri bulunmaktadır (Hillman ve ark 1982). STZ günümüzde özellikle diyabetojenik etkisi nedeniyle deneysel diyabet modelini geliştirmek için kullanılmaktadır. Diyabetojenik etkisi ilk defa Rakieten tarafından gösterilmiştir (Yenson 1981). Pankreasın beta hücrelerine sitotoksik etki yapmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar STZ' nin beta hücrelerindeki nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyesinde bir düşüşe yol açtığını bunu takiben beta hücresi nekrozu ortaya çıktığını göstermektedir (Lazarus ve Shapıro 1973). STZ' nin diğer dokularda da yaptığı değişimler çeşitli çalışmalarla değerlendirilmektedir. Fakat deneysel veriler beta hücrelerine seçimli bir birikim yaptığını gösterir. Bu durum beta hücrelerinin özelliğine bağlı olabilir. Örneğin beta hücrelerin hücre içi pH'ı değişik olması, hücre içi ve hücre dışı glukoz konsantrasyonlarının farklı olması, glutatyon düzeylerinin önemi bugün etki mekanizmasını belirlemek için yapılan çalışmalar arasındadır (Onay 1997).

STZ kan şekeri düzeyinde 3 fazlı etki oluşturur. Bunlar;

Birinci faz: Geçici hiperglisemik evredir. Kan şekeri maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir.

İkinci faz: Ölümle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada, hasara uğrayan ß-hücrelerinden salınımı oldukça artan insülinin plazma düzeyi hızla yükselir.

Üçüncü faz: Kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu noktadan başlayarak insülin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir (Alkan 1998).

STZ yapısal olarak yüksek reaktif yan zinciri olan bir glukoz olduğu için insulin üreten hücreler tarafından selektif olarak alınır. STZ' nin toksisitesi taşınabilir şekerlerin yerine geçmesinden kaynaklanır. STZ enjeksiyonundan sonra pankreas beta hücresinde ADP- riboz sentetaz aktivasyonu ile hızla NAD harcanır. Böylece STZ DNA'da kırık oluşturan karbonyum iyonlarının artışına neden olur ve bunlar aracılığı ile DNA hasarına yol açar (Mandrup 1993). STZ hasarı enjeksiyondan sonraki 30 dk ile 2 saat arasında görülür. NAD harcanmasıyla oluşan açık, oksidadif metabolizmayı etkiler ve beta hücre ölümü meydana gelir (Eizirikve Sandler 1989). STZ'den sonra kan keton cisimleri, kan plazma serbest yağ asitleri ve glikolitik ara ürünler, glikojen, sitrat düzeyleri normaldir, hiperglisemi görülür. Hemoglobin A_{1C} düzeyi artmıştır ve kalıcı diyabet meydana gelir (Öztürk ve ark 1996). STZ sıçan, kobay, fare, köpek ve maymunlarda başarılı bir şekilde diyabet oluşturur ancak tavşanlar STZ' nin diyabetojenik etkisine reistandır (Öztürk ve ark 1996).

1.2.3. Spontan Diyabet

Bazı hayvanlar genetik olarak diyabet oluşumuna yatkındırlar. Bu hayvanlarda kendiliğinden diyabet oluşumu söz konusudur (Gottlieb ve ark 1988). Diğer modellere göre insandaki diyabete daha çok benzerlik gösterir ancak bu hayvanların temini her zaman kolay değildir (Öztürk ve ark 1996).

1.2.4. Viral Diyabet

Viral enfeksiyonlar hem insanlarda hem hayvanlarda diyabet nedeni olabilmektedir. Deneysel diyabet oluşturan virüsler şunlardır; Ensephalomyokardit virüsünün M varyantı, coxachi virüs, rubella, reovirüs, Venezuella equine ensefalit virüsü (Craighead ve Mc Lane 1986).

1.2.5. Transgenik Diyabet

Bu modelde sıçan veya insan insülin promotor elementlerinden oluşan transgenler ki bunlar pankreas beta hücrelerini hedef alan heterolog proteinlerdir, eksprese edilerek hiperglisemik hale getirilir. Yüksek afinite ile insülini bağlar (Schaefer ve ark 1994).

1.3. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, non enzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivesi, hipoksi ve iskemi- perfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (Saxena ve ark 1992, Altan ve ark 1997).

Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direk sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların (Giugliano ve ark 1996) yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (Rösen ve ark 1995, Du ve ark 1999). Hiperglisemi ve oksidadif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalarla desteklenmiştir (Ceriello 1997). Deneysel hayvan çalışmalarında insandakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan STZ, oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte ve

uygun olmayan NO cevapları vererek diyabeti başlattığı düşünülmektedir (Altan ve ark 1997, Das ve Chainy 2001).

Hiperglisemini yanı sıra hipertrigliserideminin de diyabetin komplikasyonları için bağımsız risk faktörü olduğu görüşü önem kazanmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid peroksidlerindeki artışın, diyabetten çok vasküler hastalığın kendisi ve hipertriglisemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Bhat ve ark 2001, Januszewski ve ark 2003).

Hiperglisemi aracılı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi başlıca 3 mekanizma ile açıklanmaktadır (Bonnefont 2002):

1. Glukozun oto- oksidasyonu ve süperoksit üretimi: Mitekondri solunum zinciri başlıca ROS üretim kaynağıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin bir çoğunun artmış mitekondriyal ROS üretimi ile ilintili olduğunu göstermektedir. Artan glukoz konsantrasyonu sonucunda hücre içinde glukoz oksidasyonu meydana gelir. Glukozun oto- oksidasyonu NADH oluşumuna neden olur ve NADH oksidadif fosforilasyonla ATP üretiminde kullanılır. Bu reaksiyon sırasında süperoksit radikalleri oluşur (Altan ve 1997).

2. Proteinlerin glikasyonu: Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (Gillery ve ark 1998).

3. Poliol yol: Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yolda görev alan Aldoz- redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanılır. Bu durum hücre içi NADPH depolarının tükenmesine neden olur. Bu durumda okside glutatyon, redükte forma çevrilemez ve bu antioksidan kapasitenin sınırlanmasına neden olur. Redükte glutatyon ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkmasında rol oynar (Das ve Chainy 2001). Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi

veya iskemiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücre, Schwann hücrelerde hasar meydana gelmektedir. Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (Cameron ve Cotter 1995).

1.4. Comet Assay Yöntemi

Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet tekniği, memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir (Tice ve ark 2000). İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen teknikle nötral pH'daki lizing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmak kırıkları tayin edilmekteydi (Farbain ve ark 1995). Singh ve arkadaşları tarafından 1988 yılında protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının comet yöntemi protokolü bugün küçük değişiklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür. Comet yönteminde mikroskop lamı üzerindeki ince bir tabaka agar jeline süspanse edilen az sayıdaki hücreler lize edildikten sonra elektroforeze tabi tutulmakta, ethidium bromür gibi DNA bağlayıcı floresan bir boya ile boyandıktan sonra mikroskopla değerlendirilmektedir (Mc.Kelvey ve ark 1993). Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir. Comet tekniği DNA hasarını izlemede uygun ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bireyin DNA onarım kapasitesini belirlemek içinde comet tekniğinden yararlanılmaktadır. Hasarlı DNA'nın onarılmaması kanser oluşumunun temel mekanizması olarak kabul edilir. Bu olay DNA onarım yetersizliğini ve kansere yatkınlığı dolayısıyla bireysel duyarlılığı belgeler. Bunun yanısıra, okside olmuş pürin ve pirimidin bazlarının net göstergesi olarak bazı bakteriyel enzimlerin kombinasyonu ile comet tekniğinden sağlık alanında yararlanmak mümkündür.

Genotoksikolojik, ekotoksikolojik ve biyoizleme araştırmalarında öncelikli kullanım alanına sahiptir (Tice ve ark 2000).

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda meydana gelen genetik hasar, total oksidan ve antioksidanlar üzerine resveratrolün değişik dozlardaki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Cihazlar

Çalışma kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Ana Bilim Dalı ve ADÜ- BİLTEM' de bulunan; 20x40 yatay elektroforez tankı (Biogen), güç kaynağı (Power Station 200. Labnet), kamera ataçmanlı flöresan mikroskop (Olympus BX- 51), buz dolabı/derin dondurucu (Profilo), soğutmalı santrifüj (Nüve. NF 8OO R.), vorteks (Nüve. NM 110), hassas terazi (Shimadzu AX 120), su banyosu (Nüve. BM 402), dijital pH metre (Denver model 225), glukometre (Accu-check Go. Bayer), değişik hacimlerde pipet (Ependorf, Scorex), farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (Isolab), ependorf tüpü (0,5-1,5 ve 2 ml'lik, Roth), lam (Özel yapım rodajlı lam), lamel (24 x 60 mm Isolab), lam / lamel pensi, cerrahi makas, pens, doku tutucular, cerrahi eldiven (Beybi), polietilen enjektör (2,5, 5, 10 ml, Ayset), insülin enjektörü (Kar-med medikal), heparinli tüp, etüv (Nüve FN 500), Rel- Assay diagnostic total oksidan status, Rel- Assay diagnostic total antioksidan status kitleri ve sıçan besleme sondasından yararlanıldı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında dimetilsülfoksid (SAFC D8418), düşük erime noktalı agar (Sigma A9045, Tip VII), ethidium bromide (Sigma- Aldrich E8751), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) disodyum tuzu (Sigma E5134), histopaque- 1077 (Sigma), normal erime noktalı agar (Sigma A7174, Tip VI-A), sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich S5881), sodyum chloride (Sigma S9625), trisma base (Sigma T1503), trion x- 100 (Fluka 93443), PBS tablet (Mg+2 – Ca+2 free) (Sigma P4417), RSV (Sigma R5050), streptozotocin (Sigma S0130) kullanıldı.

2.1.3. Havyan Materyali

Bu çalışmada 180- 190 gr ağırlığında 2- 3 aylık toplam 33 adet erkek *Wistar-albino* sıçan kullanılmıştır. Hayvanların seçiminde sağlık durumlarının iyi olmasına ve daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış ve sağlıklı olmasına özen gösterilmiştir. Çalışmadan 1 hafta önce deneklerin ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Denekler doğal gün ışığı alacak şekilde ve her bir kafeste 5 sıçan olarak ayrılmışlardır. Deneklere çalışma süresince standart sıçan yemi ve çeşme suyu ad libitum olarak verilmiştir. 1 Haftalık uyum süresinin sonunda rast gele seçilen 24 deneğe %0.9' luk serum fizyolojik içerisinde taze hazırlanmış STZ çözeltisinden 0,5 ml içinde 50 mg/kg olacak şekilde tek doz intraperitonal enjeksiyonla verilerek, deneysel diyabet oluşturulmuştur (Tuch ve ark 2000). Kontrol gurubundaki 9 deneğe ise 0,5 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve bu denekler sağlıklı kontrol gurubunu oluşturmuştur. STZ' nin etki tarzı göz önünde tutularak, STZ enjeksiyonu yapılmış hayvanların içme sularına enjeksiyondan 2 saat sonra başlamak üzere, 24 saat süre ile %5 oranında glukoz ilave edilmiştir (Mc Anuff ve ark 2002). Enjeksiyondan 48 saat sonra glukometre ile kuyruk veninden alınan kan örneklerinde ölçülen glikoz düzeyi 200 mg/dl ve üzerinde olan denekler diyabetik olarak kabul edilmiş ve deney grupları oluşturulmuştur (Noyan ve ark 2004).

Birinci grup kontrol grubu olarak tutulmuş, 2. gruba yalnızca STZ verilmiş, 3. gruba STZ + RSV (5 mg/kg), 4. gruba STZ + RSV (25 mg/kg), 5. gruba STZ + RSV (50 mg/kg)

verilmiştir. RSV, STZ uygulamasından sonra mide sondası aracılığı ile 45 gün süresince hergün aynı saatte verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan gruplar.

Gruplar	Uygulanan Sağaltım
Kontrol negatif	%0.9'luk serum fizyolojik 0,5 ml
Kontrol pozitif	%0.9'luk serum fizyolojik içinde 50 mg/kg olacak şekilde STZ çözeltisinden 0,5 ml
Sağaltım 5 mg/kg	STZ + RSV (5 mg/kg)
Sağaltım 25 mg/kg	STZ + RSV (25 mg/kg)
Sağaltım 50 mg/kg	STZ + RSV (50 mg/kg)

Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan standart sıçan yeminin bileşimi.

Nem (%)	12	Vitamin K (mg/kg)	1
Protein (%)	20	Vitamin B_1 (mg/kg)	3
Ham lif (%)	7	Vitamin B_2 (mg/kg)	4
Ham kül (%)	8	Vitamin B_6 (mg/kg)	1
Yağ (%)	6	Vitamin B_{12} (mg/kg)	0.09
Enerji (Kcal/kg)	2650	Pantotenik asid (mg/kg)	1.5
Lizin (%)	1	Niasin (mg/kg)	10
Metiyonin (%)	0.6	Biyotin (mg/kg)	0.08
Metiyonin+sistin (%)	1	Kolin klorid (mg/kg)	1000
NaCl (%)	0.2	Magnezyum (ppm)	200
Kalsiyum (%)	1	Demir (mg/kg)	300
Fosfor (%)	0.9	Bakır (mg/kg)	20
Sodyum (%)	0.5	Manganez (mg/kg)	10
Vitamin A (IU)	300	Çinko (mg/kg)	4
Vitamin D (IU)	1000	İyodin (mg/kg)	1.3
Vitamin E (mg/kg)	60	Selenyum (mg/kg)	0.3

2.2. Kullanılan Analiz Kitleri

Çalışmada total oksidan değerleri; Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status kitleri kullanılarak, Thermo Labsystems Multiskan Spectrumda 530 nm dalga boyunda, total antioksidan değerleri; Rel Assay Diagnostics Total Antioxidant Status kitleri kullanılarak Thermo Labsystems Multiskan Spectrumda 660 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.3. Comet Assay Yöntemi

PBS'ten 1 ml alınıp, üzerine 1 ml kan ilave edildi ve 1ml Histopaque pastör pipeti ile en dibe eklendi. Toplam 3 ml'lik hacim 2100 devirde +4 ^{0}C de 20 dk santrifüj edildi. İçerisinde lenfositleri barındıran aradaki bulutsu yapı alındı. Bulutsu yapı kendi içerisinde 2 defa 2100 rpm , +4 ^{0}C de 5 dk santrifüj edildi. Üstteki kısım atıldı, alttaki hücre peleti 500 µl PBS solüsyonu ile yıkanıp, vortekslendi ve tekrar 2100 rpm, +4^{0}C de 5 dk santrifüj edildi, üstteki faz atıldı. Alttaki hücre peleti tekrar 500 µl PBS ile sulandırıldı, ardından vortekslenip +4 ^{0}C deki buzdolabında saklandı. PBS- lenfosit karışımından 50µl alınıp ependorf tüpe kondu. +37 ^{0}C ye getirilmiş 325µl LMPA üzerine ilave edildi, vortekslendi. NMA ile kaplanmış lamların üzerine mikropipetle LMPA + lenfosit karışımından 75 µl alınıp, lam üzerine yayılıp üzeri lamelle kapatıldı. Buz üzerinde donduruldu. Donduktan sonra lamel ayrılıp, lam üzerine tekrar 75 µl LMPA damlatıldı ve üzeri lamelle kapatıldı. Buz üzerinde dondurulduktan sonra lamel ayrılıp, lam lizing çözeltisi içine kondu, bir gece buzdolabında bekletildi. Süre sonunda şaleden çıkarılan lamlar, elektroforez tankında bulunan tampon içerisine konup, alkali ortamda 20 dk bekletildi. 20 dk sonunda elektroforez cihazında 25 dk. 25 volt da 300mA' de yürütüldü. Bu işlemin sonunda lamlar içerisinde soğuk nötralizasyon tamponu bulunan şale içerisine alındı. Burada 5dk bekletilip, aynı işlem 2 kere tekrarlandı. İşlem sonunda ethidium bromidden her bir lama 65 µl damlatılıp, üzeri lamelle kapatıldı. Elde edilen preperatlar kamera eklentili floresan mikroskobunda incelendi (Östling ve Johanson 1984).

2.3.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bu amaçla kullanılan çözeltiler;

1. Düşük erime noktalı agar çözeltisi

125 mg düşük kaynama noktalı agar (LMPA) 25 ml PBS de çözülür, 5'er ml lik küçük hacimlere bölündü ve kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı (Östling ve Johanson 1984).

2. Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

2 adet PBS tablet 200 ml distile suda çözüldü ve otoklavda sterilize edildikten sonra $+4^0$C de saklandı (Östling ve Johanson 1984).

3. Elektroforez Tampon Çözeltisi

300mM NaOH 200 mM EDTA maddeler tek tek stok hazırlanıp sonra karıştırıldı. 45 ml NaOH, 7,5 ml EDTA 1500 ml ye distile su ile tamamlandı. Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutularak kullanıldı (pH>13) (Östling ve Johanson 1984).

4. Ethidium Bromür Stok Çözeltisi (200 mg/ml)

10 mg ethidium bromür tartılıp, 50 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında tutuldu. Deneyde kullanılırken 100 µl stok alınarak 9,9 ml distile suda seyreltildi (Östling ve Johanson 1984).

5. 200 mM EDTA Çözeltisi

14,89 g EDTA disodyum tuzu 200 ml distile suda çözülerek pH 10'a ayarlandı ve oda ısısında saklandı (Östling ve Johanson 1984).

6. Lizing Stok Çözeltisi

146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA disodyum tuzu, 1,2 g Tris, 500 ml distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenerek Ph 10'a ayarlandı. 890 ml ye distile su ile tamamlanarak 2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris içeren stok çözelti hazırlandı ve oda ısısında saklandı. Kullanılacağı zaman lam taşıyıcı kutuda 178 ml stok lizing çözeltisi 2 ml Trion x-100 ve 20 ml Dimetil sülfoksit ile karıştırılıp buzdolabında tutuldu (Östling ve Johanson 1984).

7. Normal Kaynama Noktalı Agar Çözeltisi

500 mg normal kaynama noktalı agar (NMPA) 50 ml PBS içerisinde çözülerek, % 1' lik NMPA çözeltisi hazırlandı (Östling ve Johanson 1984).

8. Nötralizasyon Tampon Çözeltisi

48,5 g tris tartılıp, 750 ml distile suda çözülerek pH 7,5' ayarlandıktan sonra 1000 ml ye distile su ile tamamlandı ve oda ısısında saklandı (Östling ve Johanson 1984).

9. Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi (10N)

200g NaOH 500ml distile suda çözüldü. Dayanıklılığı iki haftadır (Östling ve Johanson 1984).

2.3.2. Lamların hazırlanması

Bir gece önceden buzdolabında bekletilmiş rodajlı lamlar, içerisinde %1'lik NMPA bulunan beher içerisine daldırılarak kaplandı ve kullanılıncaya kadar saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı. Hazırlanan lamlar nemli ortamda 2. ve 3. agaroz katları dökülene kadar saklanabilir (Östling ve Johanson 1984).

2.3.3. Lizis Aşaması

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır (Horoz ve ark 2006). Bu amaçla, hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yaklaşık 1 saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletildi (Östling ve Johanson 1984).

2.3.4. Elektroforez Tamponu

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektoforez tamponunda 20 dk inkübasyona bırakıldı (Östling ve Johanson 1984).

2.3.5. Elektroforezde Yürütme

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA 20 volt' luk elektriksel alanda 5 ^{o}C'de 25 dk. yürütüldü (Östling ve Johanson 1984).

2.3.6. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için slaytlar 5 dk ve 2 kez nötralizasyon tamponu ile yıkandı (Östling ve Johanson 1984).

2.3.7. Boyama

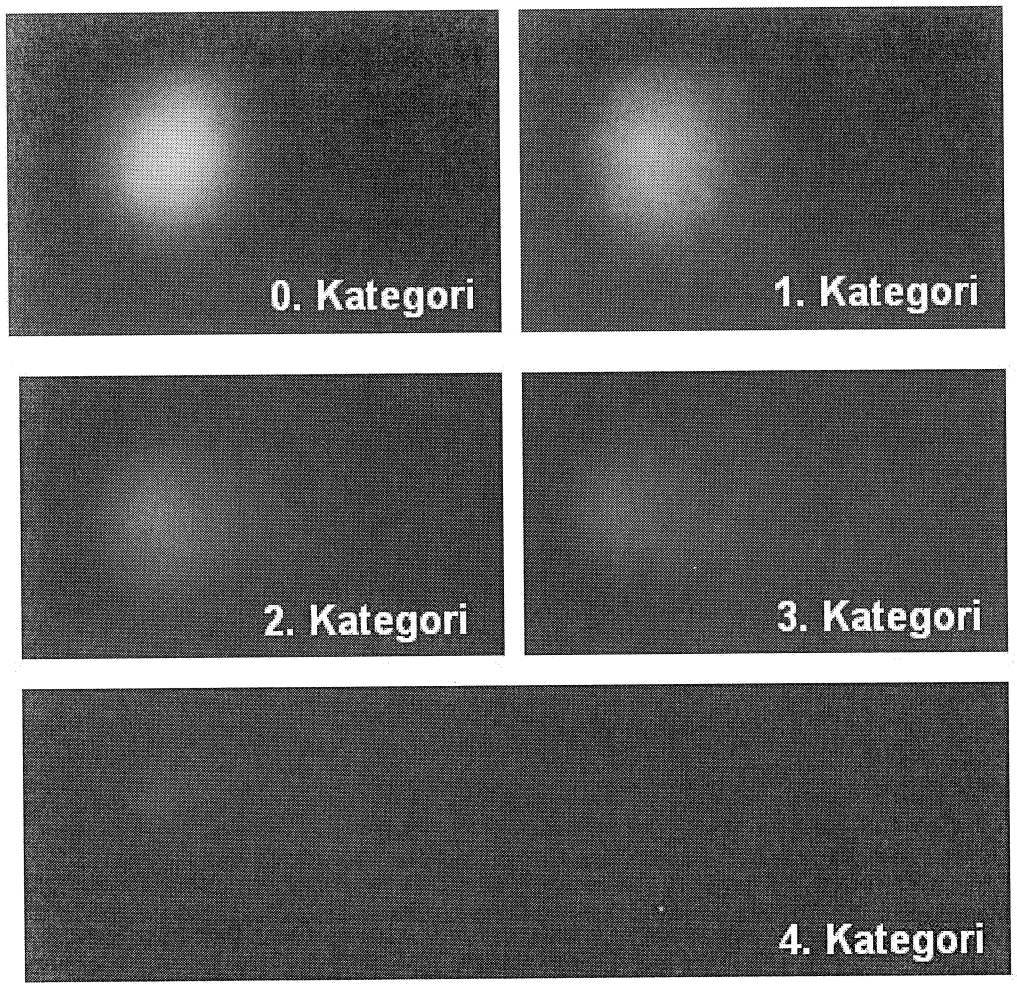
Nötralizasyon tamamlandıktan sonra flöresan boya olan Ethidium bromid boyası (5µg/ml) kullanılarak DNA'lar boyandı ve dört saat içinde değerlendirildi (Östling ve Johanson 1984).

2.3.8. Değerlendirme

Ethidium bromid ile boyanan slaytların üzerine lamel kapatılarak 20 büyütmeli flöresan mikroskop ile 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme görsel skorlama

yöntemiyle gerçekleştirildi (Kobayashi ve ark 1995). Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri 5 alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırıldı. Aşağıda görüldüğü gibi hiç hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1 den 4'e kadar puanlandırıldı ve sonuçlar genetik hasar indeksi (GHİ) olarak değerlendirildi (Pitarque ve ark 1999).

$$GHI = (Tip1 + 2.Tip2 + 3.Tip3 + 4.Tip4) / (Tip\ 0 + Tip1 + Tip\ 2 + Tip\ 3 + Tip\ 4)$$



Şekil 2.1. DNA hasar derecesine göre Comet kategorileri

2.3.9. İstatistik Analizler

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler SPSS 13,5 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Verilerin ortalamaları ± standart hatalarıyla ifade edilmiştir. Elde edilen verilerin normallik testleri yapılmış ve guruplar arasındaki istatistiksel farkları saptamak için ANOVA testi, post-test olarak Duncan testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $p<0,05$, 0,01 ve 0,001 değerleri seçilmiştir (Özdamar 2003).

3. BULGULAR

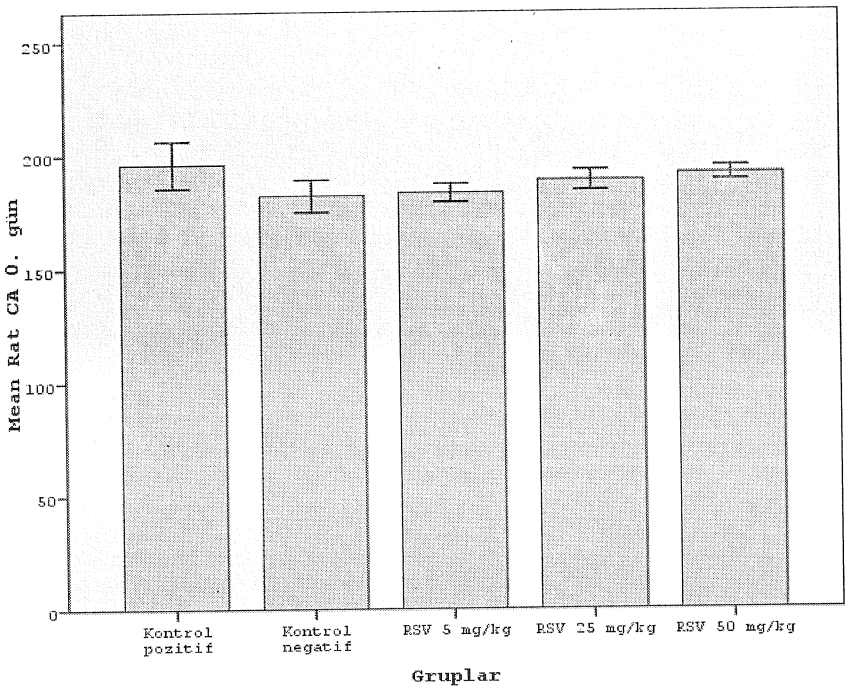
3.1. Vücut Ağırlığı Değişimleri

Sıçanların bir hafta süren uyum süreçlerinin sonunda, çalışmaya başlanılacak ilk gün ve çalışma sonlandırılmadan bir gün önce ağırlıkları ölçüldü. Elde edilen değerler kaydedilerek her bir grubun ağırlık ortalamaları aritmetik olarak hesaplandı ve standart sapmaları belirlendi. Aşağıda Çizelge 3.1.'de tüm gruplara ait tedavi süresince elde edilen başlangıç ve son gün sıçan ağırlık değerleri görülmektedir.

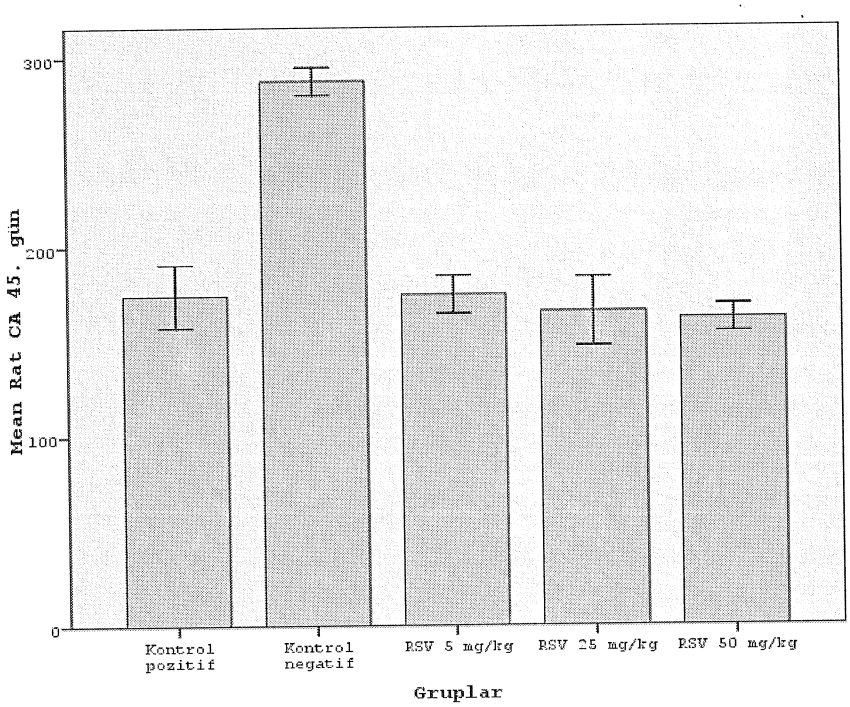
Çizelge 3.1. Grupların 0. gün ve 45. gün canlı ağırlık değerleri.

Gruplar	n	0.Gün Sıçan Ağırlıkları	45.Gün Sıçan Ağırlıkları
Kontrol pozitif	6	196,00 ± 25,60	174,17 ± 40,71
Kontrol negatif	9	182,11 ± 21,27	287,56 ± 21,92
Sağaltım 5 mg/kg	6	183,33 ± 9,68	174,67 ± 24,42
Sağaltım 25 mg/kg	6	188,80 ± 10,13	165,60 ± 40,56
Sağaltım 50 mg/kg	6	191,80 ± 6,90	162,00 ± 16,29

Elde edilen bu veriler çalışmanın 45. gününde sağaltım gruplarında bulunan sıçanlar ve diyabet oluşturulmuş kontrol pozitif grubunda bulunan sıçanlar arasında canlı ağırlık bakımından anlamlı bir fark olmadığını ancak; bu gruplarla sağlıklı grup olan kontrol negatif grubu arasında canlı ağırlık bakımından anlamlı bir farklılık olduğunu gösterdi ($p<0,001$). Sıçan canlı ağırlıklarında meydana gelen farklar karşılaştırıldığında canlı ağırlıkda en fazla kaybın sağaltım 50 mg/kg grubunda, daha sonra sırasıyla sağaltım 25 mg/kg grubu ve en az düşüşün 5 mg/kg grubunda olduğu belirlendi.



Şekil 3.1. Sıçan 0. gün canlı ağrlıkları (g)



Şekil 3.2. Sıçan 45. gün canlı ağırlıkları (g)

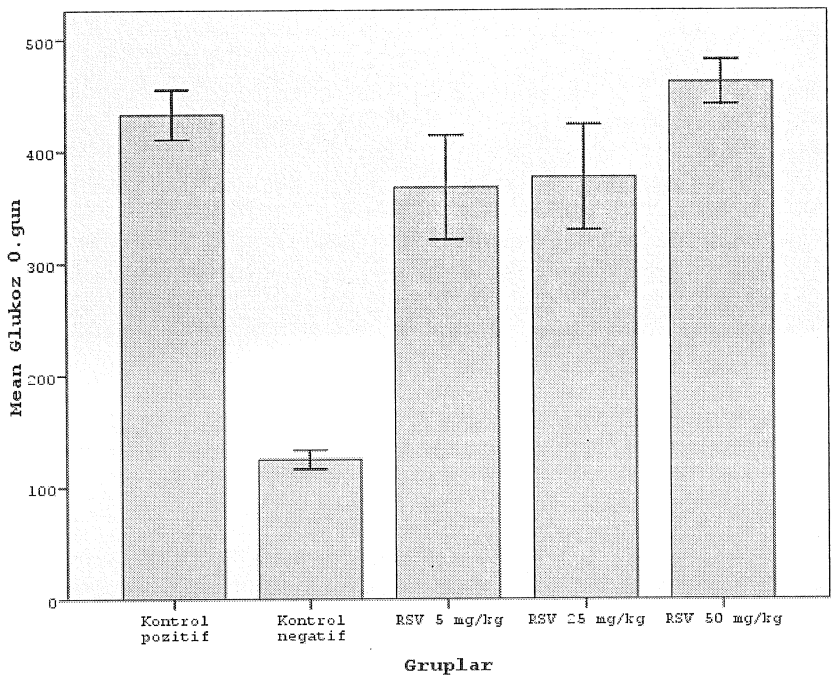
3.2. Kan Glukoz Düzeyi Değişimleri

Çalışmamızda sıçanlar uyum sürecini tamamladıktan sonra çalışmaya başladığımız ilk gün ve çalışmanın tamamlanacağı gün sıçanların kan glukoz değerleri ölçüldü. Daha sonra her bir grubun kan glukoz değerleri ortalaması alınıp ve bu değerlerin standart sapmaları hesaplandı. Çizelge 3.2.'de bu değerler gösterilmektedir.

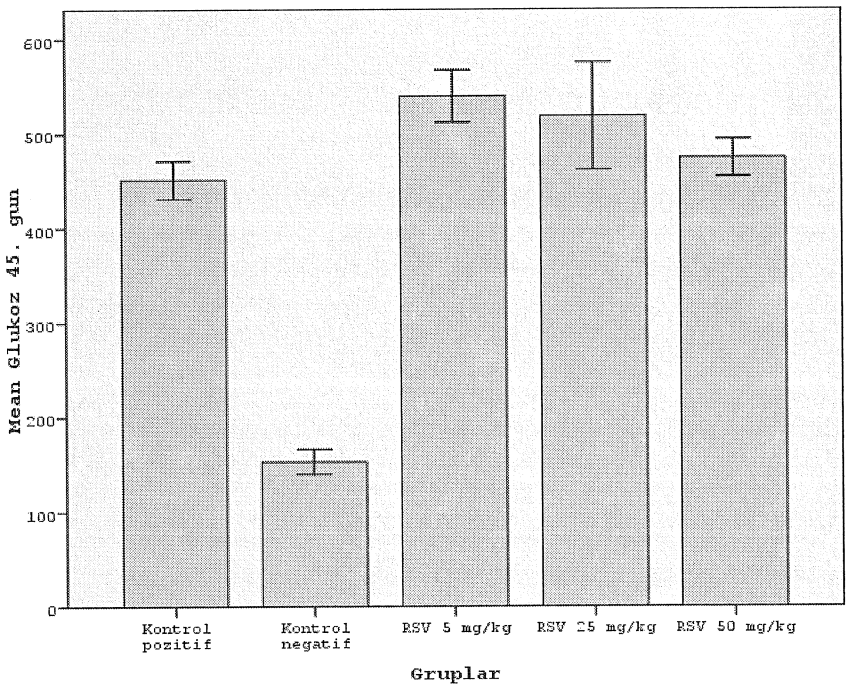
Çizelge 3.2. Grupların 0. gün ve 45. gün kan glukoz değerleri.

Gruplar	**n**	**0.Gün Glukoz Değerleri (mg/dl)**	**45.Gün Sıçan Glukoz Değerleri (mg/dl)**
Kontrol pozitif	6	433,00 ± 54,44	451,33 ± 49,23
Kontrol negatif	9	124,89 ± 24,78	153,22 ± 39,03
Sağaltım 5 mg/kg	6	367,67 ± 114,27	539,67 ± 67,20
Sağaltım 25 mg/kg	6	376,60 ± 105,24	518,60 ± 127,67
Sağaltım 50 mg/kg	6	461,80 ± 44,39	474,40 ± 44,19

Deneysel olarak STZ ile sıçanlarda diyabet oluşturulduktan sonra tokluk kan glukoz değerleri ölçüldü. Kontrol pozitif ve sağaltım gruplarının 0. gün tespit edilen başlangıç glukoz değerlerinin kontrol negatif grubunun 0. gün tespit edilen başlangıç glukoz değerlerinden istatiksel olarak $p<0.001$ düzeyinde farklı olduğu bulundu. Sağaltım 50 mg/kg grubunun 45. gün kan glukoz değeri ile sağaltım 5 ve 25 mg/kg grubunun 45. gün kan glukoz değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar RSV' nin şeker düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir ($p>0.05$).



Şekil 3.3. Sıçan 0. gün tokluk kan glukoz düzeyleri (mg/dl)



Şekil 3.4. Sıçan 45. gün tokluk kan glukoz düzeyleri (mg/dl).

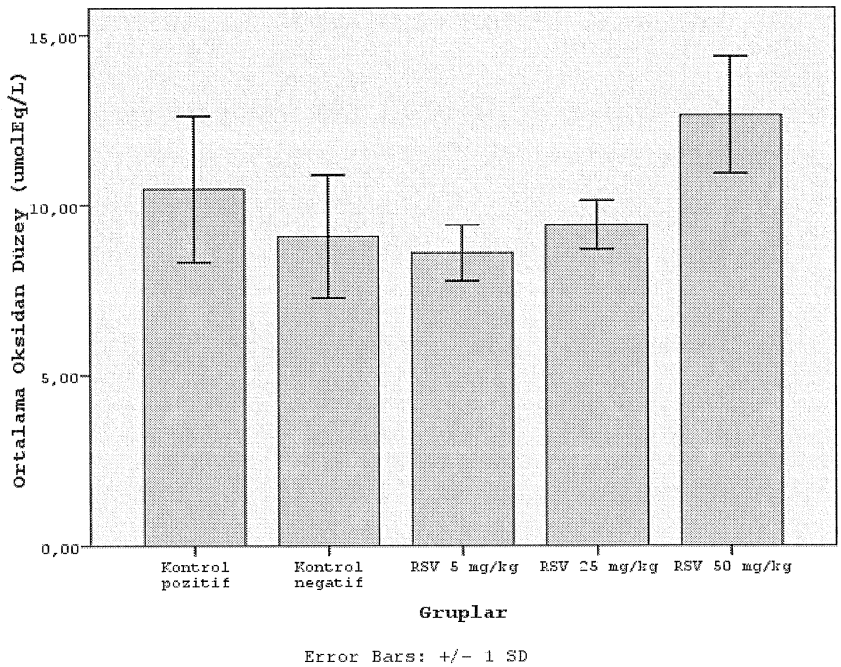
3.3. Plazma Total Oksidan Kapasite Düzeyleri

Grupların 45.gün plazma total oksidan değerleri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Gupların 45. gün plazma TOS değerleri.

Gruplar	n	TOS Değerleri
Kontrol pozitif	6	10,47 ± 2,14
Kontrol negatif	9	9,08 ± 1,80
Sağaltım 5 mg/kg	6	8,59 ± 0,81
Sağaltım 25 mg/kg	6	9,41 ± 0,71
Sağaltım 50 mg/kg	6	12,63 ± 1,72

Çizelge 3.3. toplu olarak verilen plazma total oksidan düzeyleri incelendiğinde RSV 5 mg/kg grubunda en az, RSV 50 mg/kg sağaltım dozunda ise en yüksek olduğu görüldü. RSV 50 mg/kg grubundaki bu farklılık ise, diğer tüm gruplardan farklı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 3.5. Grupların 45. gün plazma TOS indeksleri (umolEq/ L).

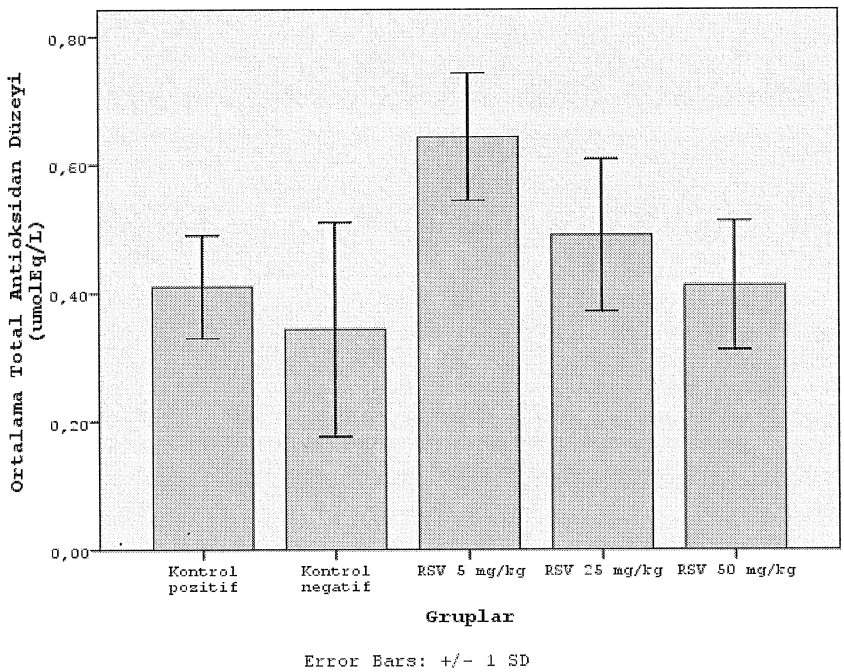
3.4. Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri

Grupların 45. gün plazma total antioksidan değerleri Çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Gupların 45. gün plazma TAS değerleri.

Gruplar	n	TAS Değerleri
Kontrol pozitif	6	0,41 ± 0,08
Kontrol negatif	9	0,34 ± 0,16
Sağaltım 5 mg/kg	6	0,64 ± 0,09
Sağaltım 25 mg/kg	6	0,49 ± 0,11
Sağaltım 50 mg/kg	6	0,41 ± 0,10

Çizelge 3.4.'de toplu olarak verilen total antioksidan düzeyleri incelendiğinde kontrol negatif grubunda en az, RSV 5 mg/kg sağaltım dozunda ise en yüksek olduğu görüldü. RSV 5mg/kg grubundaki bu farklılık ise, diğer tüm gruplardan farklı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 3.6. Grupların 45. gün plazma TAS indeksleri (umolEq/ L).

3.5. Lökosit DNA Hasar Düzeyi Değişimleri

Çalışma sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinden Comet Analiz tekniği ile lökosit DNA hasar düzeyleri incelendi, genetik hasar indeksleri (GHİ) ve standart sapmaları hesaplandı. Çizelge 3.5.'de tüm gruplara ait elde edilen DNA hasar düzeylerine ilişkin 45. gün GHİ değerleri yer almaktadır.

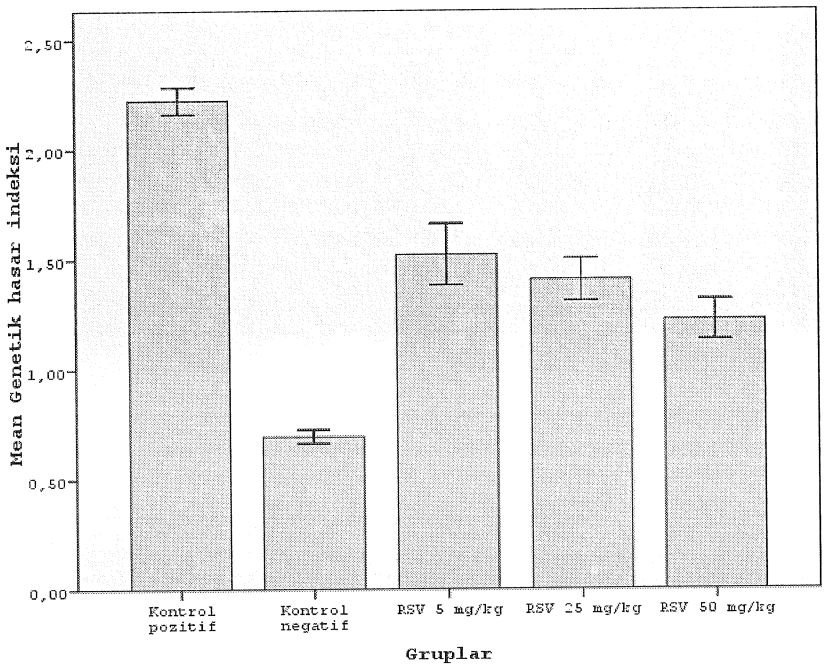
Çizelge 3.5. Grupların 45. gün genetik hasar indeksleri.

Gruplar	n	45. Gün Genetik Hasar İndeksi
Kontrol pozitif	6	2,22 ± 0,15
Kontrol negatif	9	0,69 ± 0,09
Sağaltım 5 mg/kg	6	0,52 ± 0,34
Sağaltım 25 mg/kg	6	1,40 ± 0,21
Sağaltım 50 mg/kg	6	1,22 ± 0,20

Çizelge 3.5'deki sonuçlar göstermektedir ki kontrol negatif grubu GHİ ile tüm sağaltım grupları ve kontrol pozitif grubu GHİ'leri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$).

Kontrol negatif ve pozitif grupları ile diğer sağaltım grupları arasında da anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Sağaltıma alınan gruplardaki GHİ düzeyi kontrol pozitif grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0,001$) azalmış olmasına karşın, kontrol negatif grubundaki GHİ değerlerine indirememiş ve bu farklılıkta yine ($p<0,001$) anlamlı bulunmuştur.

Sağaltım gruplarının GHİ kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, 25 mg/kg grubu ile sağaltım 50 mg/kg grubu arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamış ($p>0,05$), ancak; sağaltım 50 mg/kg grubu ile sağaltım 5 mg/kg grubu arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar RSV' nin 50mg/kg dozda genetik hasarı diğer 5 ve 25 mg/kg dozlarına göre anlamlı düzeyde ($p<0,05$) önlediğini göstermiştir.



Şekil 3.7. Grupların 45. gün genetik hasar indeksleri.

4.TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel olarak STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, oksidatif stres sonucunda DNA' da genotoksik hasarın meydana geldiği, RSV' nin doza bağımlı olarak bu hasarı kısmen engellediği çalışmadan elde edilen bulgularla ortaya konmuştur.

STZ deneysel diyabet oluşturmak için 45mg/kg- 65mg/kg aralığında intra peritoneal olarak uygulanır (Fox ve Dayel 1981). Kan Şekeri düzeyinde üç fazlı etki oluşturur. Maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde kan şekeri karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir. İkinci faz ölümle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada hasara uğrayan β hücrelerinden hızla salıverilen insülinin plazma düzeyi hızla yükselir. Üçüncü faz, kalıcı hiperglisemik fazdır. Bu noktadan başlayarak insülin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir (Okyar ve ark 2001, Satav ve Katyere 2004).

Bu çalışmada tek doz daha önce diyabete neden olduğu gösterilmiş olan 50 mg/kg STZ kullanılmıştır. STZ uygulanmasının nedeni kolay, kalıcı diyabet oluşturması ve hayvanın uzun süre diyabetik olarak yaşayabilir olmasıdır. Bu şekilde oluşturulan diyabet insanda oluşturulan insuline bağımlı diyabete benzer. Bu tip diyabette otoimmunite olası nedenlerin başında gelmekle birlikte, viral enfeksiyonlar, fiziksel veya emosyonel stres, besinsel faktörler ve çevresel toksinler de neden olabilir. Bu tip diyabette total veya totale yakın insulin sekresyon kaybı olur (Fiengold ve Funk 1997).

STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra kan şekeri yüksekliği meydana gelmektedir (Hu ve ark 1996). Çalışmamızda da tek doz daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra tüm hayvanlarda kan şekeri yüksekliği oluşmuştur (Cameron

ve Cotter 1996). STZ enjeksiyonundan sonraki 8. günde akut diyabet, 3 hafta sonra kronik diyabet oluşmaktadır (Mulder ve ark 1996).

Beta hücrelerinin antioksidatif kapasiteleri düşük olduğu için oksidatif değişikliklere karşı çok hassastırlar. STZ metabolizasyonu sırasında metil katyonları ve metil radikalleri gibi alkali ajanların yanında reaktif oksijen türevleri de üretilmektedir. Bu ürünlerin pankreas Langerhans adacıklarında deformasyona ve diyabetin patogenezinde rol oynadıklarına dair bir çok çalışma bildirilmiştir (Heineke ve ark 1993). Karabay ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada düşük doz STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 8 hafta sonra pankreas β hücreleri incelendiğinde, özellikle mitokondri ve Golgi kompleksi düzeyinde değişiklik olduğu, granül sayısında da belirgin azalma olduğu izlenmiştir. Bu çalışmada STZ kan glukoz düzeyini artırarak, pankreas β hücreleri üzerindeki tahrip edici etkisini açık bir şekilde göstermektedir. Çalışmamızda oluşan oksidadif stresin diyabete mi yoksa STZ' ye mi bağlı olduğunun karışabileceği düşünülebilir. Ancak STZ' nin yarılanma ömrü 6 saat olduğu için bu dönemden sonraki oksidatif stres STZ' ye bağlı değildir (Kakar ve ark 1996).

Karahan ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonda STZ verilen sıçan gruplarıyla plasebo verilen sıçan grubunun karşılaştırılması sonucu elde edilen kan glukozu değerleri, STZ uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği görülmektedir. STZ verilen deney gruplarının kan glukoz değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu veriler ışığında STZ uygulamasının hiperglisemi oluşturduğu ancak kan glukozu yükselmesinin doza bağımlı olmadığı görülmüştür (Karahan 2005). Bu çalışmada RSV' nin STZ verilen sıçanlarda diyabet oluşumunu önlemediği görülmüştür. Ancak, diyabetli kontrol grubu ile RSV verilen diyabetli grupların kan şeker düzeyleri karşılaştırıldığında kan şekeri düzeylerinde RSV miktarı arttıkça belirli oranlarda düşmeler gözlenmiş olsada bu istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda deney grubundaki sıçanların kontrol grubu hariç beden ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Diyabetes Mellitus'un katabolik yolları stimüle etmesi sonucu beden ağırlığının azaldığı, insülin hormonunun beden ağırlığındaki azalmayı önlediği veya düzelttiği bilinmektedir (Czech 1977).

Karahan ve ark. (2005) yaptığı bir çalışmada farklı dozda STZ alan deney grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında deney boyunca gözlenen ağırlık azalmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması ağırlık azalmasının STZ' nin dozu ile ilişkili olmadığını göstermiştir.

Zayıflamanın temel nedeni, hücrelerin glikozu yeterince kullanamamasıdır. İdrarla glikoz atılımına bağlı olarak oluşan kalori ve elektrolit kaybı, dehidrasyon ve insülin yetersizliğinden kaynaklanan yağ ve protein katabolizmasındaki artış da diyabette meydana gelen kilo kaybının diğer nedenleridir (Yılmaz 1999). Diyabette ortaya çıkan glikozüri ile atılan her gram glikoz için vücuttan 4.1 kcal yitirilir. Bu kaybı karşılamak için oral kalori alımının artırılması plazma glikozunu daha da yükseltip glikozüriyi artırır (Yılmaz 1999).

Cam ve ark. (2003) ile Aksoy ve ark. (2003) 4 ve 6 haftalık deney sonunda diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarında azalma olduğunu bildirmiştir. Andallu ve Varadacharyulu (2003) diyabetik sıçanlarda vücut ağırlığı kaybının doku proteinlerinin aşırı yıkımına bağlı olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise alloksan (200 mg/ kg deri altı) veya streptozotozin (60 mg/kg damar içi) verilerek diyabet oluşumunu takiben 4. haftada sıçanların vücut ağırlıklarının %22 azaldığı rapor edilmiştir (Sochor ve ark 1979).

Bizim çalışmamızda da tüm bu çalışmalarla uyumlu olarak, STZ uygulaması yapılmayan kontrol grubu hariç, deney gruplarındaki sıçanların beden ağırlıklarında anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. RSV' nin bu azalma üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır.

Jain ve ark. (1990) STZ ile diyabet oluşturdukları ratlarda yaptıkları çalışmada, diyabetik ratların eritrositlerinde lipid peroksidasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlardır. Poliol yolunda glukozun sorbitole dönüşümü sonucu NADPH miktarının azalması, okside glutatyonun redükte forma dönüşüm hızını yavaşlatmakta ve antioksidan kapasiteyi negatif yönde etkilemektir (Sözmen ve ark 2001). Ayrıca sorbitolün fruktoza oksidasyonundaki artış, süperoksit anyon oluşumunu artırmaktadır (Giugliano ve ark 1995). Faure ve ark. (1993) ile Vantyghem ve ark. (2000) diyabetes mellituslu yetişkinlerde düşük düzeyde metabolik dekompozisyon olsa bile MDA düzeyinin oksidatif stres sonucu arttığını rapor etmişlerdir. Kontrol negatif grubunda 9,08 ±

1,80 birimi olan TOS düzeyi kontrol pozitif grubunda 10,47 ± 2,14 birimi olarak bulunmuştur. Bu da oksidadif strese bağlı olarak oksidanların artışına ilişkin görüşü desteklemektedir. RSV uygulanan grupta kontrol pozitif grubuna göre RSV 5 mg/kg grubunda 8,59 ± 0,81, RSV 25 mg/kg grubunda 9,41 ± 0,71 olmak üzere daha düşük düzeyde TOS saptanmıştır. RSV 50 mg/kg dozda ise TOS 12,63 ± 1,72 olarak saptanmış ve tüm gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Ancak tüm bu veriler arasında istatistiki bir farklılık saptanamamıştır.

Diyabetes mellitusta serbest radikallerin üretiminin artmasına yol açan bir diğer önemli etki de, antioksidan miktarının azalmasıdır. Poliol yolunda glukozun sorbitole dönüşümü sonucu NADPH miktarının azalması, okside glutatyonun redükte forma dönüşüm hızını yavaşlatmakta ve antioksidan kapasiteyi negatif yönde etkilemektir (Sözmen ve ark 2001). Ayrıca sorbitolün fruktoza oksidasyonundaki artış, süperoksit anyon oluşumunu artırmaktadır. Gerek serbest oksijen radikallerinin oluşumunun artması gerekse antioksidan sistemin kesintiye uğraması durumlarında diyabetli hastalarda oksidatif stres artmaktadır (Giugliano ve ark 1995). Gumieniczek ve ark. (2005) alloksan ile deneysel diyabet oluşturulmuş tavşanlarda diyabetik kontrol gurubu total antioksidan kapasite düzeylerinin sağlıklı kontrol gurubuna oranla anlamlı olarak azaldığını bildirmiştir. Anderson ve ark. (1998) ile Taş ve ark. (2006) bildirdiği diyatetik kontrollerdeki benzer sonucun oluşmasında, antioksidan olarak tanımlanan katabolik ürünlerin artışından ya da bütünlüğü bozulmuş hücrelerden antioksidan sızıntıya bağlı olarak hücresel antioksidan maddelerin vücut sıvılarında birikmiş olmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Çalışmamızda ise, yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak RSV verildiğinden dolayı Kontrol negatif grubuna kıyasla RSV gruplarında daha yüksek plazma antioksidan miktarı saptanmıştır. Dikkat çeken nokta ise, Kontrol negatif grubuna kıyasla RSV 5 mg/kg grubunda (P=0,004) ve RSV 25 mg/kg grubunda (P=0,012), RSV 50 mg/kg grubundan daha yüksek düzeyde antioksidan düzeyinin saptanmış olmasıdır.

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz DNA hasar düzeyi bulguları, Çizelge 3.5. de görüldüğü gibi, pozitif kontrol grubunda ve sağaltım gruplarında negatif kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksektir. Ancak RSV verilen gruplarda DNA hasarı anlamlı düzeyde azalmıştır. Diyabetde ilerlemiş glikozillenme ürünlerinin DNA' yı etkilemesiyle, kromozomal değişiklikler, DNA zincirinde kırılmalar, DNA' nın tamirinde, replikasyonunda

ve transkripsiyonunda bozukluklar olabilir (Weitberg ve ark 1985, Dizdaroğlu 1992, Haliwell ve Dizdaroğlu 1992). Dandona ve ark. (1996) diyabet hastalarında oksidatif DNA hasarının ve oksidatif DNA hasar ürünlerinden 8-OHdG' in gerek Tip I gerekse Tip II DM hastalarında sağlıklı kontrol gurubundan yüksek olduğunu bildirmektedir. Dinçer ve ark. (2003)'nın Comet Analiz yöntemiyle Tip I diyabet hastalarında mononükleer lökosit DNA hasar düzeylerini araştırdıkları çalışmada, Tip I diyabet hastası kadın ve erkelerde mononükleer lökosit DNA hasar düzeylerininin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ki Comet Analiz sonuçlarımız da, diyabette DNA hasar düzeyinin arttığı yönündeki bildirimlerle (Anderson ve ark 1998, Sardas ve ark 2001, Dinçer ve ark 2003) paralel sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda RSV verilen gruplarda RSV dozuna bağımlı şekilde DNA hasarının diyabetli gruba göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki kontrol negatif grubu GHİ ile tüm sağaltım grupları ve kontrol pozitif grubu GHİ'leri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$). Kontrol negatif ve pozitif grupları ile diğer sağaltım grupları arasında da anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). Sağaltıma alınan gruplardaki GHİ düzeyi kontrol pozitif grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0,001$) azalmış olmasına karşın, kontrol negatif grubundaki GHİ değerlerine indirememiş ve bu farklılıkta yine ($p<0,001$) anlamlı bulunmuştur. Bu husus çalışmada oldukça dikkat çekici bulunmuştur. Yukarıda incelenen çalışmalarda ise belirtilen durum açık değildir.

Sağaltım gruplarının GHİ kendi aralarında değerlendirildiğinde ise, sağaltım 50 mg/kg grubu ile sağaltım 5 mg/kg grubu arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). Bu sonuçlar RSV' nin 50mg/kg dozda genetik hasarı diğer 5 ve 25 mg/kg dozlarına göre anlamlı düzeyde ($p<0,05$) önlediğini diğer bir ifadeyle RSV dozu arttıkça GHİ düzeyinde azalma görülmüştür.

5. SONUÇ

Kanser tedavisinde çeşitli doğal veya sentetik maddeler, hücre poliferasyonunu engellemesi ve apoptozu tetiklemesi nedeniyle kullanılmaktadırlar. Antioksidanların kanseri önlemedeki rolünü destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fitoaleksin olarak bilinen bitki antibiyotiklerini içeren ve güçlü antifungal özellikli olan polimerler (viniferinler) familyası doğal antioksidanlar arasındadır. Bu grubun bilinen üyelerinden biri RSV' dir. RSV' nin radikal süpürücü etkisi ile DNA hasarını azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca RSV'nin lipid metabolizmasını düzenleme, eikosanoid sentezini inhibe etme ve trombosit çökelmesini baskılama gibi özellikleri yanında antioksidan, antikanserojen, antienflamatuar, antimutajen, antiproliferatif, antiviral, antibakteriyal, östrojenik ve damar gevsetici gibi biyolojik özellikleri de bulunmaktadır. Sunulan çalışmada streptozotozin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda RSV'nin DNA hasarını önleyici ve antioksidatif etkisi araştırılmıştır.

STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda kan glukoz düzeyleri önemli ölçüde artmıştır. Buna bağlı olarak serbest radikal artışı oksidatif stresi arttırmış ve DNA hasarı oluşturmuştur. RSV, DNA hasarını önleyici etkisi artan doza bağımlı olarak artmıştır. Ancak, TAS ve TOS düzeylerinin hangi mekanizmalardan kaynaklanan değişimler olduğunun daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla ayrıntılı oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması, RSV'nin DNA hasarını önlemedeki mekanizmasının incelenmesi gerekmektedir.

ÖZET

RSV' nin STZ Tarafından Oluşturulan
Genotoksik Hasarı Önleyici Etkisi

Resveratrolün (RSV) sağlığa yararlı pek çok etkisi olduğu bilinmektedir. Bu tezin amacı streptozotosin STZ kullanılarak oluşturulan deneysel diyabet sonucu meydana gelen oksidadif stres kaynaklı DNA hasarına RSV'nin etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada yetişkin Wistar- Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar beş gruba ayrıldı, kontrol negatif (diyabetik olmayan sıçanlar n=9), kontrol pozitif (diyabetik sıçanlar n=6) ile RSV grupları 5mg/kg (n=6), 25mg/kg (n=6) ve 50 mg/kg (n=6) oluşturuldu. RSV sıçanlara 45 gün boyunca intragastrik sonda ile verildi. Şeker hastalığını tetiklemek için tek doz intraperitoneal yolla 50mg/kg STZ verildi. Kan şeker düzeyi 200mg/dl üzerinde olan sıçanlar diyabetli kabul edildi. Çalışmanın sonucunda şeker hastası olan sıçanlarda, sağlıklı sıçanlara göre vücut ağırlığında azalma görüldü ($P<0,001$). Total antioksidan durumunun RSV 5mg/kg grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü ($P=0,003$). Fakat 25 ve 50 mg/kg gruplarında (sırasıyla $P=0,662$ ve $P=0.969$) kontrol negatif grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Uygulanan RSV' nin kan glukoz düzeyini etkilemediği görüldü. Gruplar arasında total oksidan miktarı anlamlı farklılıklar göstermedi. Genetik hasar indeksi (GHI), kontrol pozitif ve kontrol negatif grupları arasında farklılık gösterdi ($P<0,001$). Kontrol pozitif grubuna göre, RSV gruplarında GHI daha düşük bulundu ($P<0,001$). RSV 25 ve 50 mg/kg grupları arasında GHI farklı bulunmadı. Fakat RSV 5 ve 50 mg/kg grupları arasında RSV 50mg/kg grubunun GHI daha düşük bulundu. Bu sonuçlar RSV' nin şeker hastası farelerde DNA hasarını azaltabileceğini ileri sürmektedir.

Anahtar kelimeler; Resveratrol, Streptozotosin, DNA hasarı, diabetes mellitus, Comet yöntemi

SUMMARY

The Protective Effect of RSV on Genotoxic Damage in Streptozotocin Induced Diabetic Rats

Resveratrol (RSV) is assumed to possess many health beneficial effects. Diabetic oxidative stress induce DNA damage. The aim of this thesis was to analyze the preventive effect of RSV in experimentally induced DNA damage in diabetic rats compared to non diabetic rats. Adult Wistar-Albino male rats were used. Five group established as follows, control negative group (non-diabetic rats, n=9), control positive group (diabetic rats, n=6), RSV 5mg/kg (n=6), 25mg/kg (n=6) and 50 mg/kg (n=6) groups (diabetic rats with RSV applied by oral gavage during 45 days). In order to induce diabetes mellitus single dose of 50 mg/kg streptozotocin was intraperitoneally injected. Rats having blood glucose levels higher than 200 mg/dL were considered as diabetic. Body weight was decreased in diabetic rats compared to non-diabetic rats (P<0,001). Total antioxidant status was higher in RSV 5 mg/kg group (P=0,003) but not significant in 25 and 50 mg/kg RSV groups (P=0,662 and P=0.969, respectively) according to control negative group. RSV did not affected blood glucose level. Total oxidant status was not significant among groups. Genetic damage index (GDI) was different among RSV, control positive and control negative groups (P<0,001). RSV groups were able to diminish GDI according to control positive group (P<0,001). Although, there was also significant difference with control negative group (P<0,001) but RSV was not able to diminish GDI levels to control positive group. Among RSV groups, GDI was not significant between 25 and 50 mg/kg RSV groups but it was different between 5 and 50 mg/kg RSV groups and GDI values were better for 50 mg/kg RSV group. These results suggest that RSV may diminish DNA damage in diabetic rats.

Key words; RSV, streptozotocin, DNA damage, diabetes mellitus

KAYNAKLAR

Adewuyi YG (2001) Ind. Eng. Chem. Res. 40: 4681- 4715.

Akgül E, İlhan N, İlhan N, Halifeoğlu İ (1999) Tip II Diyabetes mellitusta lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri. Türk Biyokimya Dergisi, 3: 28-33.

Akkuş D (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları Sağlık Dizisi 5:28-42.

Aksoy N, Vural H, Sabuncu T (2003) Effects of melatonin on oxidative antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diyabetic rats, Cell Biochemistry and Function, 21: 121-125.

Alkan A (1998) Doksisiklin'in experimental diyabetes mellitusta kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkisinin histomorfometrik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, A.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Altan N, Altan M, Mikolay L, Schwartz CFW (1985) Insulin-like and insulin enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. Diyabetes 34; 281- 286.

Altan N, Yiğit Ş, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılıç N (1997) Effects ofthe Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase in Streptozotocine- Induced Diyabetic Rat Muscle. General Pharmacology 28(5), 795- 96.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U.S.A. Sep 1; 90 (17): 7915- 7922.

Andallu B, Varadacharyulu NC (2003) "Antioxidant role of mulberry (morus indica L.Cu. Anantha) leaves in streptozotocin-diyabetic rats" Clinica Chimica Acta, 338: 3-10

Anderson D, Yu T- W, Wright J, Ioannides C (1998) An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diyabetic patients Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 398, Number 1, 28 pp. 151- 161.

Aziz MH, Kumar R, Ahmad N (2003) Cancer chemoprevention by resveratrol: in-vitro and in- vivo studies and the underlying mechanisms, International Journal Of Oncology 23: 17- 28.

Belguendouz L, Fremont L, Linard A (1997) Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low- density lipoproteins. Biochemical Pharmacol. 53: 1347- 1355.

Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP (1996) Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. Ðnt J Tissue React. 18:67- 71.

Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (2001) Estrogenic and antiestrogenic properties of RSV in mammary tumor models, Cancer Res 61: 7456- 7.

Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/ antagonist for estrojen receptors alpha and beta, Endocrinology, 141: 3657-3667.

Buluç M, Demirel- Yılmaz E (2006) Resvaratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium, Vascular Pharmacol 44: 231-237.

Büyüktuncer Z, Başaran AA (2005) Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25; 2, 79- 94.

Cam M, Yavuz O, Güven A (2003) Protective effects of chronic melatonin treatmant against renal injury in streptozotocin-induced diyabetic rats, J. Pineal Res., 35: 212- 220.

Cameron NE, Cotter MA (1995) Neurovascular dysfunction in diyabetic rats : potential contribution of autooxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. J Clin Invest 96(2) : 1159- 1163.

Cameron NE, Cotter MA (1996) Interaction between oxidative stres and gama linolenic acid in impaired neurovascular function of diyabetic rats, Am J Physiplogy 271; E471- E476.

Celotti L, Ferrarini R, Melcangi RC, Pace- Asciak CR (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta, Gen. Pharmacol. 27: 362- 366.

Ceriello A, Bortolotti N, Falleti E, Taboga C, Tonutti L (1997) Total Radical-Trapping Anti-oxidant Paremeter in NIDDM patients. Diyabetes Care 20 : 194- 7.

Chan W, Delucchi A (2000) Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4. Life Sciences. 67: 3103- 3112.

Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin 49:481- 493.

Chen CK, Pace-Asciak CR (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. Gen Pharmacol. 27: 363- 366.

Commun K, Mauro MC, Chupeau Y, Boulay M, Burrus M, Jeandet P (2003) Plant physiology and biochemistry (41); 317- 323.

Craighead JE, Mc Lane MF (1986) Diyabetes mellitus induction in mice by encephalomyokarditis virus, Science 162; 913- 914.

Czech MP (1977) Molecular basisof insulin action. Annu Rev Biochem; 46: 359- 384.

Çelik H (2002) Üzüm kansere savaş açtı.
http://www.tarim.gov.tr/makaleler/uzum_kanser.htm

Dandona P, Thuru K, Cook S (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet; 347: 444– 5.

Das K, Chainy GBN (2001) Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by throid hormone. Biochim Biophys Acta 2001 ; 1537(1) : 1-13.

Dinçer Y, Akçay T, İlkova H, Alademir Z, Özbay G (2003) DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with type I diabetes mellitus. Mutat. Res, 527, 49-55.

Dizdaroglu M (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. Mutat. Res. 275, 331-342.

Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P(1999) Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NFKappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase. Free Radic Biol Med 27 (7-8) : 752-763.

Eizirik D, Sandler S (1989) Function and metabolism of pancreatic beta cells maintainedin culture following induced damage, Pharmacol Toxicol 65; 163- 168.

El-Mowafy AM, White RE (1999) Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary arterial smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects, FEBS Lett, 451: 63- 67.

Farbian DW, Olive PL, Neill KL (1995) The commet assay: a comprehensive review, Mutation Res 339: 37- 59.

Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. Life Sci. 61(21):2103-2110.

Faure P, Corticelli P, Richard J, Arnaud J, Coudray C, Halimi S, Favie A, Roussel AM (1993) Lipid peroxidation and trace element status in diyabetic ketotic patients: influence of insulin therapy, Clin. Chem., 39: 789-793.

Feingold KR, Funk JL (1997) Disorders of the endocrine pancreas. Pathophysiology of disease, Second edition, Appleton and Lange, USA, 423- 448.

Fox C, Doyel D (1981) Islet cell hyperplasia in long term streptozotocin rats, In streptozotocin fundamentals and tharapy, Elsevier North Holland Biomedical Press, New York 263-274.

Freeman BA, Crapo JD (1982) Free radicals and tissue injury. Lab Invest 47: 412-425.

Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. Life sciences 66: 663- 673.

Gehm BD, Mcandrews JM, Chien PY (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrojen receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14138-14143.

Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP (1988) Glycation of proteins as a source of superoxide. Diyabet Metab 14 (1): 25 -30.

Giugliano D, Ceriello A, Paolissa G (1995) Diyabetes mellitus, hypertension and cardiovasculer diseases. The role of oxidative stress Metabolism, 44: 363- 368.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diyabetic vascular complications. Diyabetes Care 19 : 257-267.

Gottlieb AP, Rossini AA, Mordes JP (1988) Approaches to prevention and treatment of IDDM in animal models, Diyabetes Care 11 (Suppl 1), 29- 36.

Green MR, Anderson RE (1981) Myelocytic leukemia following prolonged streptozotocin therapy. Cancer 47: 1963.

Gumieniczek A, Hopkała H, Roli´nski J (2005) Antioxidative and anti-inflammatory effects of repaglinide in plasma of diabetic animals. Pharmacological Research 52; 162–166.

Gutteridge JMC, Halliwell B (1994) Antioxidants in Nutriotion, Health and Disease First edition, Oxford University Pres, New York.

Halliwell B (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions, Acta Neurology Scandinavia 126; 23-33.

Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistrry and role in human disease, The Am J of Med, 91 (Suppl 3C), 14S- 22S.

Halliwell B, Dizdaroğlu M (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. Free Radical Res Commun;16:75- 87.

Heineke EW, Johnson MB, Dilbergen JE (1993) Antioxidant MDL29, 311 prevents diabetes in nonobese diabetic and multiple low-dose STZ- injected mice, Diabetes. 42: 1721-1730.

Hillman BJ, Stanley L, Linda N (1982) Streptozotocin- induced renol tumors in rats: Microangiographic histologic correlation. Inves. Rad 17:19.

Horoz M, Bölükbaş C, Bölükbaş F, Koçyiğit A (2006) Assessmen of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 596, Issues 1-2, Pages 137-142.

Hsieh T, Juan G, Darzynkiewiez Z, Wu JM (1999) Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and $p^{21WAF/CIP1}$, and suppresses cultured bovine pulmonary arter endothelial cell poliferation by perturbing progression through S and G_2. Cancer Res. 59: 2596- 2601.

Hu Y, Wang Y, Wang L (1996) Effects of nicotinamide on prevention and treatment of stretozotocin- induced diyabetes mellitus in rats, Chin Med J 109(11): 819- 822.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KW, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Metha RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, Science, 275, 218- 220.

Januszewski AS, Alderson NL, Metz TO, Thorpe SR, Baynes JW (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. Biochemical Society Transactions. 31(6), 1413-1416.

Jain SK, Levine SN, Duett J, Hallier B (1990) Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin treated diabetic rats. Metabolism. 39 , 971-975.

Joe A, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein JB, (2002) Resveratrol induced growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and change in biomarker: 893- 903.

Kakar R, Mantha SV, Karla J (1996) Time course study of oxidative stres in aorta and heart of diabetic fat 91: 441- 448.

Karabay G, Erdoğan D, Take G, Karasu Ç (2005) Deneysel diyabette probukol uygulanmasının endokrin pankreas dokusuna etkisinin ultrastrüktürel olarak incelenmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 31(1): 5- 8.

Karahan EG, Özemsi Ç, Süer C, Gölgeli, A, Dolu N (2005) Hiperglıseminin uyarılma potansiyelleri üzerine etkisinin streptozotozin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda incelenmesi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 14(3): 171-176.

Kenneth B, Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures, Physiol Rev 78 (2); 547- 581.

Kim HJ, Chang EJ (1990) Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of Paenoia Iactiflora, Biosc Biotechnol Biochem 66: 1990-1993.

Krishna PL, Pezzuto B, Pezzuto JM (2002) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, Annals New York Academy Of Sciences 957: 210- 229.

Langcake P, Pyrce RJ (1976) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in respance to ultraviolet irradiation, Phytochemistry 16: 1193- 1196.

Latruffe N, Delmas D, Jannin B, Malki MC, Passilly- Degrace P, Berlot JP (2002) Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponet, International Journal Of Molecular Medicine. 10: 755- 760.

Lazarus SS, Shapiro SM (1973) Influence of nicotinamid and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan induced pancreatic 3 cell cytotoxicity. Diyabetes 22: 499.

Li HF, Tıan ZF, Qui XQ, Wu JX, Zhang P, Jıa ZJ (2006) A study of mechanisms involved in vasodilation induced by resveratrol in isolated porcine coroary artery, Physiol. Res; 55: 365- 372.

Lorengil M, Salen P (2002) Mediterranean diet and the French Paradox, Cardiovasc Res 54:503- 505. 512

Mandrup T (1993) Nicotinamide treatment in the prevention of IDDM, *Diyabetes Metab Reviews,* 9 (4): 295- 309

Mark J, Duncan J (2000) Effects of trans- resveratrol on copper- dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxy- radical scavenging and a novel, glutation- sparing mechanism of action. Archives of Biochem. And Biophys. 381: 253- 263.

McAnuff Felix O, Omoruyi Errol Y, Helen N (2002) Plasma and liver lipid distributions in streptozotocin induced diabetic rats fed sapogenin extract of the Jamaican bitter yam (Dioscorea polygonoides). Nutrition Research 22 1427–1434.

McKelvey MVJ, Gren MHL, Schmezer P, Pool- Zobel BL, De Meo MP, Collins A (1993) The single cell gel electrophoresis assay: A european review, Mutation Res 288: 47-66.

Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2003) Hypolipidemic action of dietary resveratrol a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma- bearing rats, Life Sci., 73,1393- 1400.

Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y (2001) Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke- prone spontaneously hypertensive rats, Clin.Exp. Pharmacol .Physiol. 28: 55- 59.

Mordes JP, Rossini AA (1981) Animal models of diabetes, Am J Med 70: 353- 360

Mulder H, Ahren B, Sundler F (1996) Islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin are differentially expressed in chronic diyabetes induced by streptozotocin in rats, Diyabetologia 39; 649- 657.

Murrant CL, Reid MB (2001) Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. Microscopy Research and Technique. 55:236- 248.

Noyan T, Yalçınkaya AS, Şekeroğlu MR, Dülger H, Balaharoğlu R (2004) Antioxidant Effects Of Pentoxifylline And Melatonin In The Alloxane-Induced Diabetic Mice Turkish Journal of Biochemistry 2; 29 (4); 268-272.

Nigdikar SV, Williams N, Griffin BA, Howard AN (1998) Consumption of red wine polypenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo. Am J Clin Ntr. Aug 68(2): 258- 265.

Onay A (1997) Hipergliseminin endotel-bağımlı ve endotel-bağımsız vasküler gevşeme yanıtları üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

Östling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 123, 291-298.

Özdamar K (2003) SPSS ile Biyoistatistik.5.Baskı. Kaan Kitap Evi.Eskişehir.

Öztürk Y, Atlan VM, Yıldızoğlu- Arı N (1996) Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions, Pharmacologiacal reviews 48,1,69- 112.

Palmieri L, Mameli M, Ronca G (1999) Effect of resveratrol and some other natural compounds on tryosine kinaz activity and on cytolysis. Drugs Exptl. Clin. Res. XXV (2/3): 79-8553.

Pervaiz S (2003) Resveratrol; from grapevines to mammalian biology, The Faseb Journal 17: 1975- 1985.

Pervaiz S (2004) Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Update* 7, (6), 333-344.

Pitarque M, Creus A, Marcos R, Hughes JA, Anderson D (1999) Examination of varios biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personel. Mutat. Res. 440: 195- 204.

Rabini RA, Petruzzi E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M (1997) Diabetes mellitus and subjects ageing : a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte. Eur J Clin Invest 27 : 327-332.

Rösen P, Balhausen T, Bloch W, Addicks K (1995). Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diyabetic rat : influence of tocopherol as antioxidant. Diyabetologia 38 : 1157-68.

Sardas S, Yılmaz M, Öztok U, Çakir N, Karakaya AE (2001) Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 490 (2)pp.123- 129

Saxena AK, Srivastava P, Baquer NZ (1992) Effects of Vanadate on Glycolytic Enzymes and Malic Enzyme in Insulin-Dependent and - Independent Tissues of Diabetic rats. Eur. J. Pharmacol. 216: 123-126.

Schaefer EM, Viard V, Morin J (1994) A new transgenic Mouse model of chronic hyperglicemia, Diabetes 43; 143- 153.

Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley BG (1993) Antioxidant theraphy. Crit Care Med 21:92-102.

Seven A, Candan G (1996). Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 27: 41- 50.

She QB, Bade A (2001) Resveratrol induced activation of p-53 : Cancer research 61: 1604- 1610.

Sochor M, Baquer N, McLean P (1979) Regulation of Pathways of Glucose Metabolism in Kidney. The Effect of Experimental Diabetes on the Activity of the Pentose Phosphate Pathway and the Glucoronate-Xylulose Pathway. Arch. Biochem. Biophys. 198: 632.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldbeg DM (1997) Resveratrol; A molecule whose time has come. Clin Chem 30: 91- 113.

Sözmen EY, Sözmen B, Delen Y, Onat T (2001) Catalase/Superoxide dismutase (SOD) and Catalase/Paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control Arch. Med. Res. 32: 283-287

Stewart J, Ward N, Ioannides C, Brian C (1999) Resveratrol preferentially inhibit protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine– rich protein substrate by a novel mechanism. Biochemistry. 38: 13244- 13251.

Tas S, Sarandol E, Ziyanok-Ayvalik S (2006) Vanadyl sulfate treatment improves oxidative stress and increases serum paraoxonase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research 26; 670– 676.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000). Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35: 206-21.

Tuch B, Dunlop M, Proietto J (2000) Diabetes Research A Guide for Postgraduates. CRC Press.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, (1), 44-84.

Vantyghem MC, Balduyck M, Zerimech F, Martin A, Douillard C, Bans S, Degand P M, Lefebvre J (2000) Oxidative markers in diabetic ketoacidosis, J. Endocrinol Invest., 23: 732-6.

Vega P, Gaule C, Mancilla J (1993) Comparison of alloxan and streptozotocin induced diyabetes in rats: Differential effects on microsomal drug metabolism, Gen Pharmacol 24, 2, 489- 495.

Wang HX, Ng TB (1999) Natural Products With Hypoglycemic, Hypotensive, Hypocholesterolemic, Antiatherosclerotic And Antithrombotic Activities. L&sciences, 65(25): 2663-2677.

Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP (1985) Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. J Clin Invest. 75(6):1835- 41.

Yanbeyi S (1999) Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s (yayınlanmamış).

Yenson M (1981) İnsan biokimyası, Çeliker Matbaası, İstanbul s. 711.

Yılmaz B (1999) Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Birinci Basım. Ankara: Feryal Matbaacılık.

Yu BP (1994) Cellular defances against damage from reactive oxygen species, Physiol Rev 74; 139- 162.

Zou JG, Huang Y, Cao K, Yang G, Yın H, Len J, Hsıeh TC, Wu JM (2000) Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denuduation in an experimental rabbit model, Life Sci., 68, 153-163.

Zou JG, Wang ZR, Huang Y, Cao K, Wu JM (2003) Effect of red wine and wine polphenol resveratrol on endothelial function in hypercholesterolemic rabbits, Int.J. Mol. Med., 11,317- 320.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Aydın'da tamamladı. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2000 yılında mezun oldu. 2008 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli olup, halen serbest eczacılık yapmaktadır.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN, ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji ABD öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ferda AKAR, Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT, Yrd. Doç. Dr. Cavit KUM ve çalışmanın özellikle deneysel aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na, sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren aileme, benden sabrını esirgemeyen eşim Ali ÇANKIR'a özellikle hayatımın her aşamasında daima yanımda yer alan babama, sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.