

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ϵ -VİNİFERİNİN TEK BAŞINA VE KEMOTERAPÖTİK BİR AJAN
İLE BİRLİKTE HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTIOKSİDAN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA TARHAN

DANIŞMAN

Doç. Dr. EMİNE SÜTKEN DEMİRKAN

Haziran 2013

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ε-VİNİFERİNİN TEK BAŞINA VE KEMOTERAPÖTİK BİR AJAN
İLE BİRLİKTE HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA TARHAN

DANIŞMAN

Doç. Dr. EMİNE SÜTKEN DEMİRKAN

A.Ü.BAP/090306

KABUL VE ONAY SAYFASI

Seda TARHAN 'in Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak hazırladığı “**ε- viniferrinin Tek Başına ve Kemoterapötik Bir Ajan İle Birlikte HEPG2 Hücreleri Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek “**KABUL**” edilmiştir.

Tarih 24.06.2013

Üye : Prof. Dr. Özkan ALATAŞ



Üye : Prof. Dr. Ömer ÇOLAK



Üye : Prof. Dr. Sema USLU



Üye : Prof. Dr. Zerrin İNCESU



Üye : Doç. Dr. Emine Sütken DEMİRKAN (Danışman)



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.06./2013 tarih ve ...96.1./4.462 . sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof Dr. Kazım ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

ϵ -Viniferinin Tek Başına ve Kemoterapötik Bir Ajan İle Birlikte HEPG2 Hücreleri Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde lipid peroksidasyonu (LPO), süperoksit dismutaz (SOD) ve redükte glutasyon (GSH) düzeylerine doğrudan ve H₂O₂ ile dışsal kaynaklı oluşturulmuş oksidatif stres üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız birinci aşamada, maddelerin düşük ve yüksek dozlarından oluşturulmuş dVNF, yVNF, dVCR, yVCR, dETO, yETO, d(VCR+VNF), y(VCR+VNF) grupları ile Kontrol grubundan ve ikinci aşamada bu gruplara ek olarak dışsal kaynaklı oksidatif strese karşı maddelerin koruyucu etkilerini gözlemleyebilmek için kullanılan H₂O₂-Kontrol grubundan oluşturulmuştur.

Çalışmamızda sıvı azot tankından çıkarılan hücreler besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra maddelerin düşük ve yüksek dozları ile 3, 6 ve 24 saat inkübe edilmişlerdir. Antioksidan özelliklerini incelediğimiz maddelerin LPO ve SOD ölçümleri deney kitleri ile kolorometrik olarak ölçülmüş sonuçlar absorbansa karşı değerlendirilmiştir. GSH ölçümleri ise flourometrik deney kiti ile ölçülerek sonuçlar floresans ışımaya karşı değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, birinci aşamada vinkristin sülfat zamana ve doza bağımlı olarak LPO SOD ve GSH değerleri üzerinde kontrole göre anlamlı bir etki göstermemiştir. ϵ -viniferin ile kombine uyguladığımız ise LPO ve GSH düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir etki göstermemiş ancak SOD aktivasyonunu kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır (p<0,05). Elde ettiğimiz verilere göre, zamana bağımlı olarak kombine uygulamanın HepG2 hücrelerinde SOD aktivasyonunu azaltarak hücrel oksidatif stresi arttırabileceğini ve hepatoma hücrelerinde hasar yaratacağını düşünüyoruz.

İkinci aşamada ise düşük doz kombine uygulamanın tüm parametrelerde artışa yol açarken, yüksek doz kombine uygulamanın H₂O₂ ile uyarılmış LPO düzeylerini etkilemeden SOD aktivasyonunu ve GSH düzeylerini arttırması kombine uygulamanın HepG2 hücreleri üzerinde dışsal oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ε-viniferin, HepG2, LPO, SOD, GSH.

SUMMARY

The investigation of antioxidant effect of ϵ -viniferin, alone and with chemotherapeutic agent on HEPG2 cells

The aim of this study is to investigate protective effects of ϵ -viniferin and vincristine as alone and combined administration on lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD) activation and reduced glutathione (GSH) levels in HepG2 cells.

In the first stage of study, the groups dVNF, yVNF, dVCR, yVCR, dETO, yETO, d(VCR+VNF), y(VCR+VNF) and Control group were formed with low and high doses of substances. Second range of study, in addition to these groups, H₂O₂-Control group was formed to observe the protective effects of substances against oxidative stress induced exogenous agents.

In our study, cells were extracted from liquid nitrogen tank duplicated in medium. After reaching the appropriate number, the cells were incubated with low and high doses of substances for 3, 6 and 24 hours. The substances we have investigated antioxidant properties of LPO and SOD levels were measured as colorimetric with experimental kits and the results were evaluated versus absorbance. GSH levels were measured by fluorometric experimental kit and its results evaluated versus fluorescence sparkle.

As a result, in the first stage, vincristine sulfate as a time and dose-dependent did not show a significant effect on the LPO, SOD and GSH value compared to the control. When it was applied in combination with ϵ -viniferin, LPO and GSH levels did not show a significant effect compared to the control, but the activation of SOD significantly reduced compared to the control. According to the our data, we have obtained as a time-

dependent the combined therapy in HepG2 cells by reducing activation of SOD could increase cellular oxidative stress and will create damage to the hepatoma cells.

In the second stage, low dose combination group causes an increase in all parameters while, combination group administrated high dose increases SOD activation and GSH levels without the fact that it does not affect H₂O₂- induced LPO levels show that combined administration has a protective effect on HepG2 cells against the exogenous oxidative stress condition.

Key Words: ε-viniferin, HepG2, LPO, SOD, GSH.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	xiv
TABLO DİZİNİ.....	xv
GRAFİK DİZİNİ.....	xvi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Hepatoselüler Karsinoma.....	4
2.3. Hepatoselüler Karsinoma ve Kemoterapi.....	6
2.4. Vinka Alkaloidleri.....	6
2.4.1. Vinkristin.....	7
2.4.2. Vinkristinin kimyasal yapısı.....	8
2.4.3. Vinkristinin etki mekanizması.....	10
2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	11
2.5.1. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	13
2.5.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	15
2.5.3. Hidroksil radikali (OH^{\bullet}).....	16
2.5.4. Singlet oksijen.....	17
2.5.5. Nitrik Oksit (NO^{\bullet}).....	18
2.6. Lipid Peroksidasyonu.....	18
2.7. Antioksidan Sistemler.....	20

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

2.7.1. Hücre içi antioksidanlar.....	21
2.7.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD).....	21
2.7.1.2. Katalaz (CAT).....	22
2.7.1.3. Redükte glutatyon (GSH).....	22
2.7.1.4. Glutatyon peroksidaz (GPx).....	23
2.7.1.5. Glutatyon redüktaz (GR).....	24
2.7.1.6. Glutatyon-S-transferaz (GST).....	24
2.8. Resveratrol (RES).....	24
2.8.1. Resveratrolün biyosentezi.....	26
2.8.2. Resveratrolün antioksidan aktivitesi.....	28
2.9.3. Resveratrolün antikanser aktivitesi.....	28
2.9.4. Resveratrolün hepatoprotektif aktivite.....	29
2.9. ε-Viniferin.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	31
3.1. Gereçler.....	31
3.1.1. Hücre hattının temini.....	31
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve sarf malzemeler.....	31
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2. Yöntemler.....	34
3.2.1. Hücre kültürü uygulamaları.....	34
3.2.2. HepG2 sayımı.....	35
3.2.3. ε-viniferin, vinkristin sülfat, vinkristin sülfat + ε-viniferin ve etoposit maddelerinin IC ₅₀ ve %80 canlılık değerleri.....	35
3.2.4. HepG2 hücrelerinin zamana ve doza bağımlı madde uygulamaları.....	36
3.2.5. H ₂ O ₂ ile indükleme işlemi.....	37
3.2.6. Lipid peroksidasyon (LPO) Ölçümü.....	37

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam ediyor)

3.2.7. Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü	39
3.2.8. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü.....	40
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Lipid Peroksidasyon (LPO) Düzeyleri.....	44
4.1.1. ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde LPO düzeylerine doğrudan etkileri (n= 6, ortalama ± SD).....	44
4.1.1.1. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 3 saatlik etkileri.....	44
4.1.1.2. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 6 saatlik etkileri.....	45
4.1.1.3. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 24 saatlik etkileri.....	46
4.1.2. HepG2 hücrelerinde, ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H ₂ O ₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı koruyucu etkisi (n= 6, ortalama ± SD).....	47
4.1.2.1. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 3 saatlik koruyucu etkileri.....	47
4.1.2.2. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 6 saatlik koruyucu etkileri.....	48
4.1.2.3. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 24 saatlik koruyucu etkileri.....	49
4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivasyonu.....	50
4.2.1. ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde SOD düzeylerine doğrudan etkileri (n= 2, ortalama ± SD).....	50
4.2.1.1. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 3 saatlik etkileri.....	51
4.2.1.2. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 6 saatlik etkileri.....	52

4.2.1.3. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 24 saatlik etkileri.....	53
4.2.2. HepG2 hücrelerinde, ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H ₂ O ₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu etkileri (n= 2, ortalama ±SD).....	54
4.2.2.1. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna 3 karşı saatlik koruyucu etkileri.....	54
4.2.2.2. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna 6 karşı saatlik koruyucu etkileri.....	55
4.2.2.3. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna 24 karşı saatlik koruyucu etkileri.....	56
4.3. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Düzeyleri.....	57
4.3.1. Vinkristin sülfat, ε-viniferin maddelerinin ayrı ayrı ve kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde intraselüler GSH düzeylerine doğrudan etkileri (n= 3, ortalama ± SD).....	57
4.3.1.1. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 3 saatlik etkileri..	58
4.3.1.2. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 6 saatlik etkileri..	59
4.3.1.3. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 24 saatlik etkileri.	60
4.3.2. HepG2 hücrelerinde, ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H ₂ O ₂ ile indüklenen GSH düzeylerine karşı koruyucu etkileri (n= 3, ortalama ± SD).....	61
4.3.2.1. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 3 saatlik koruyucu etkileri.....	61
4.3.2.2. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 6 saatlik koruyucu etkileri.....	62
4.3.2.3. Maddelerin H ₂ O ₂ ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 24 saatlik koruyucu etkileri.....	63
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76

7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	78
8. EKLER DİZİNİ.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	91

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Karsinogenezin evreleri	4
Şekil 2: Hepatokarsinogenez sürecinde HBV, HCV, aflatoksin ve alkolün rolü	5
Şekil 3: Vinca rosea	7
Şekil 4: C. Roseus' un 3 çeşiti 'beyaz', 'kırmızı' ve 'mor'	7
Şekil 5: Vinkristinin kimyasal yapısı	8
Şekil 6: Vinkristin sülfatın kimyasal yapısı	9
Şekil 7: Hücre siklusunun şematik gösterimi ve hücre siklusu ile ilişkili ilaçların etkileri	10
Şekil 8: Vinka alkaloidlerinin etki mekanizması	11
Şekil 9: Reaktif oksijen türleri	13
Şekil 10: Moleküler oksijenin uyarılması ve indirgenmesi	13
Şekil 11: Lipid peroksidasyonu reaksiyonları	19
Şekil 12: Antioksidan gruplar ve görevleri	21
Şekil 13: Resveratrol' ün standart koşullardaki üç boyutlu görünümü	25
Şekil 14: Veratrum Grandifolium Loes. Fil bitkisi	25
Şekil 15: Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı	26
Şekil 16: Fenilalanin' den trans-resveratrolün biyosentezi	28
Şekil 17: 4-Koumaril Co-A ve 3 malonil Co-A' dan flovanoit ve resveratrolün biyosentezi	28
Şekil 18: Resveratrol ve epsilon viniferin'in moleküler yapısı	29
Şekil 19: SOD deney prensibi	40
Şekil 20: GSH deney prensibi	41

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: HepG2 hücreleri için vinkristin sülfat, ϵ -viniferin, etoposit ve kombinenin (vinkristin sülfat + ϵ -viniferin) 24 saatlik IC ₅₀ ve %80 hücre canlılığındaki dozları	39
Tablo 2: LPO standart eğrisinden elde edilen deney sonuçlarının sayısal değerleri (μ mol).	88
Tablo 3: SOD aktivasyon eşitliğindeki sonuçların sayısal verileri (%)	89
Tablo 4: GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçlarının sayısal değerleri (mM)	90

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muameleleri sonucu LPO değerleri (μmol).	44
Grafik 2: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muameleleri sonucu LPO değerleri (μmol).	45
Grafik 3: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı muameleleri sonucu LPO değerleri (μmol).	46
Grafik 4: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen LPO değerleri (μmol).	47
Grafik 5: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen LPO değerleri (μmol).	48
Grafik 6: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 24saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen LPO değerleri (μmol).	49
Grafik 7: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu (%) sonuçları	51
Grafik 8: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu (%) sonuçları	52
Grafik 9: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu (%) sonuçları	53
Grafik10: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)	54
Grafik 11: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)	55
Grafik 12: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine grubun 24 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)	56

GRAFİK DİZİNİ (devam ediyor)

- Grafik 13:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 3 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM). **58**
- Grafik 14:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 6 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM). **59**
- Grafik 15:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 24 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM). **60**
- Grafik 16:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 3 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM). **61**
- Grafik 17:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 6 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM). **62**
- Grafik 18:** HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 24 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM). **63**
- Grafik 19:** LPO standart grafiği **39**
- Grafik 20:** GSH standart grafiği **42**

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

NIH: Ulusal Kanser Enstitüsü

DNA: Deoksiribonükleik asit

HSK: Hepatosellüler karsinom

CCC: Kolanjiosellüler karsinom

HBV: Hepatit B

HCV: Hepatit C

ROT: Reaktif oksijen türleri

C.roseus: Catharanthus roseus

RNA: Ribonükleik asit

KMS-12-BM

ATP: Adenozintrifosfat

H₂O₂: Hidrojen peroksit

O₂^{•-}: Süperoksit anyon radikali

O₂: Moleküler oksijen

NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid

Fe²⁺: Demir iyonu

Cu²⁺: Bakır iyonu

OH[•]: Hidroksil radikali

H₂O*: Uyarılmış su molekülü

NO[•]: Nitrik Oksit

ONOOH: Peroksinitrit

PUFA : Çoklu doymamış yağ asitleri

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

L[•]: Lipid radikali

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

- LOO[•]: Lipid peroksit radikali
LOOH: Lipid hidroperokside
LPO: Lipid peroksidasyonu
MDA: Malondialdehit
SOD: Süperoksid dismutaz
CAT: Katalaz
GSH: İndirgenmiş glutatyon
GPx: Glutatyon peroksidaz
GST: Glutatyon-s-transferaz
GR: Glutatyon redüktaz
GSSG: Okside glutatyon seviyesi
Cu/Zn-SOD: Bakır/çinko süperoksit dismutaz
Mn-SOD: Mangan süperoksit dismutaz
EC-SOD: Ekstraselüler süperoksit dismutaz
H₂O: Su molekülü
Se: Selenyum
Res: Resveratrol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer kanseri tüm dünyada mortalite ve morbiditeye sebep olan önemli hastalıklardan biridir. İnsanların yaşam kalitesini etkileyerek toplumun maddi ve manevi zarara uğramasına neden olmaktadır (46). Karaciğer hücrelerinden gelişen hepatoselüler karsinom (HSK) primer karaciğer kanserlerinin %85-90' ını oluşturmaktadır. HSK' nın tedavisinde cerrahi tedavi, bölgesel kanser tedavi, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmakla birlikte kesin bir tedavisi hala mevcut değildir (63, 140). Kemoterapinin kanser hastaları üzerinde kanserli hücreleri öldürmek gibi istenen etkilerinin yanında kemik iliği baskılanması, eklem ve kaslarda ağrı, nörotoksisite, kardiyotoksisite, stomatit gibi istenmeyen etkileri de bulunmaktadır (52, 54). Kemoterapide ki primer amaç, kanserli hücreleri öldürürken yan etkilerinin minimum düzeyde olmasını sağlamaktır (19, 127). Günümüzde antioksidanların da kanser tedavisinde kullanılabileceğine dair pek çok çalışma yapılmıştır. Bu antioksidan maddelerin *in vitro* ortamda kanserli hücrelerin proliferasyonunu azalttığı ve apoptoza götürdüğü, *in vivo* ortamda ise kemoterapinin yan etkilerini en alt düzeye indirdiğine dair çalışmalar yer almaktadır (11, 30, 39, 93).

Akut lenfoblastik lösemi, over ve kolon kanseri tedavisinde kullanıldığı bilinmekte olan vinkristin sülfat mitotik iğcıkların oluşumunu engelleyerek hücre döngüsünü G2/M fazında durdurmakta ve apoptozu uyarmaktadır (27, 41). Ayrıca ε-viniferin' in de bir antioksidan olarak lenfosit, miyeloid hücreler, HL-60, HepG2 ve insan meme kanser hücreleri üzerinde antitümöral etkiler gösterirken, normal rat fibroblast hücrelerinde ROT' ların neden olduğu nekrozu engelledikleri belirlenmiştir (88, 98, 101, 134) ve hücre döngüsünü vinkristin sülfat gibi G2/M fazında durdurduğu bildirilmiştir (66, 12).

Yaptığımız literatür araştırmalarında ε-viniferin ve vinkristin sülfatın kombine uygulamasının HepG2 hepatoma hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda, maddelerin hepatoma hücrelerinde ki oksidatif stres üzerine etkilerinin incelenmesi için iki aşama

planlanmıştır. Birinci aşamada, HepG2 hücresinde ε-viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulanarak hücrenel lipid peroksidasyonu, SOD enzim aktivasyonu ve redükte glutasyon düzeylerine karşı etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İkinci aşamada ise HepG2 hücresinde H₂O₂ ile dışsal kaynaklı oksidatif stres oluşturularak maddelerin tek başlarına ve kombine uygulanarak lipid peroksidasyonu, SOD enzim aktivasyonu ve redükte glutasyon düzeyleri üzerinde ki koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

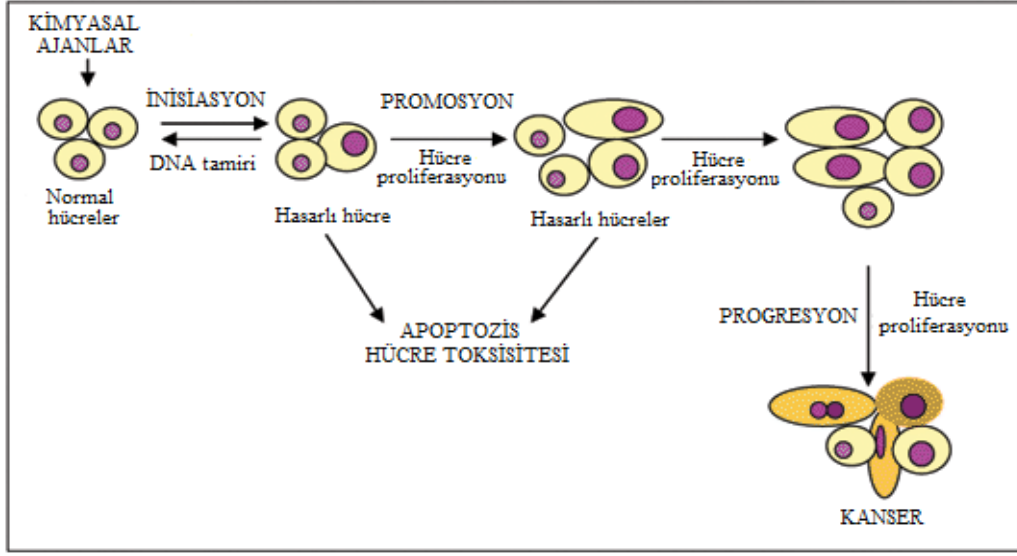
2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin farklılaşarak kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, insanları maddi ve manevi olarak etkileyen gelişimi karmaşık ve çoklu adımlar içeren ölümcül hastalıklardan biridir (46). Ulusal Kanser Enstitüsü (NIH) tarafından kanser; bir hücre grubunun kontrolsüz bir şekilde büyüüp anormal bir yapıya sahip olan, kan dolaşımı ve lenf sistemine katılıp diğer organlara yayılabilmek özelliği gösterebilen doku kitlesi olarak tanımlanmıştır (137).

Normal süreçte (organizmada) hücreler kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denilen olay ile yok olurken diğer taraftan büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde deoksiribonükleik asit (DNA)'da ki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genlerin ekspresyonunda meydana gelen mutasyonlar hücrelere fenotipik özellikler kazandırır. Bu değişimler hücrelerin anormal şekil ve hızda büyümesine sebep olarak 'tümör' adı verilen kitlenin oluşumuna yol açarlar. Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ve tahrip edebilirler (108, 85). Tümörler benign (iyi huylu) ya da malign (kötü huylu) oluşumlardır. Malign tümörlerin tümü 'kanser' olarak adlandırılır. Malign tümörler benign tümörlerin aksine özgün dokudan uzak bölgelere metastaz (yayılma) eğilimi gösterirler. Benign tümörler sınırlı bir büyüme yapısında olup, buldukları bölgede genişler ve en önemlisi metastaz yapmazlar (96, 138, 97, 49, 139).

İnsan kanserlerinde karsinogenez (kanseri gelişimi) mekanizması oldukça karmaşık ve çok faktörlüdür. Karsinogenezde üç evre bulunmaktadır; birincisi normal hücrenin neoplastik hücreye dönüştüğü inisiyasyon (başlangıç) evresi, ikincisi

neoplastik hücrenin çoğaldığı promosyon (gelişim) evresi, üçüncüsü malign özelliğin kazanıldığı progresyon (ilerleme) evresidir (Şekil 1).



Şekil 1. Karsinogenezin evreleri (151).

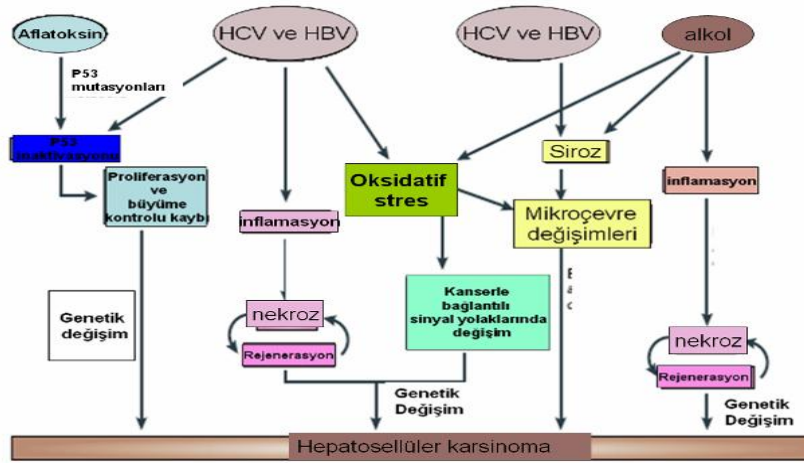
Kanserin birçok çeşidi olup, köken aldıkları dokuya göre sınıflandırma yapılırlar. Kanserin yaklaşık %85' i epitelyal hücrelerde başlar ve karsinom olarak adlandırılırlar. Kemik, kas ya da konnektif doku gibi mezenşimal dokulardan kaynaklanan sarkomalar; kemik iliği, lenfatik sistem ve periferel kan boyunca yayılanlar lösemi ve lenfoma gibi hematopoetik ve lenfoid malignensilerdir (113).

2.2. Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğerin malign tümörleri, primer tümörleri ve metastatik (sekonder) tümörlerdir. Karaciğerin malign tümörleri hepatoselüler karsinom, intrahepatik kolanjiyoselüler karsinom, hepatokolanjiyokarsinom, hepatoblastom, anjiyosarkom, epitelooid hemanjiyoeptelioma ve diğer (leiyomyosarkom, rabdomyosarkom, indiferansiye embriyonel sarkom) sarkomlardır. Karaciğer kanserlerinin tümüne yakını hepatoselüler karsinom (HSK) ve intrahepatik kolanjiyoselüler karsinom (CCC) oluşturur (44).

Karaciğer hücrelerinden gelişen HSK primer karaciğer kanserlerinin % 85-90' ını oluşturur (140). Primer karaciğer kanseri dünyadaki en yaygın 5. kanser olup yılda yaklaşık yarım milyon insanın ölümünden sorumludur. Beş yıllık hayatta kalma oranı %5' in altındadır (32). HSK' nın Asya ve Afrika'da ölümlerin majör sebebi olmakla beraber batıda rastlanma oranı gittikçe artmakta olduğundan, moleküler patogenezi, epidemiyolojisi ve tedavisi dikkat çekmeye başlamıştır (17). Türkiye' deki durum ile ilgili tam sayısal veri olmamakla beraber artan kronik hepatit hastalıkları sıklığı ile birlikte HSK insidansının ve prevalansının hızla arttığı görülmektedir (126).

HSK' nın majör risk faktörleri siroz ve hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), mikotoksin, aflatoksin, vinil klorür, alkol, reaktif oksijen türleri (ROT) iken minör risk faktörleri sigara kullanımı, aşırı demir alımı, hemokromatozistir (Şekil 2) (121, 18, 19).



Şekil 2. Hepatokarsinogenez sürecinde HBV, HCV, aflatoksin ve alkolün rolü (33).

Hepatokarsinogenez sürecinde gerçekleşen değişimler birçok önemli sinyal yollarının, bağlantılı genlerin değişmesine sebep olur. Yapılan çalışmalarda büyüme, hücre döngüsü, apoptoz, metastaz, sinyal iletimi, metabolizma gibi çeşitli süreçte yer alan genlerin ekspresyon artışları ve azalışları bulunmuştur. HSK' nın moleküler analizleri, hepatokarsinogenez sürecinin son derece kompleks ve heterojen olduğunu göstermektedir (18, 28, 33).

2.3. Hepatoselüler Karsinoma ve Kemoterapi

HSK hızlı gelişen ve ölümcül bir hastalıktır. Erken tanı ile bölgesel kanser tedavisi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavi yüksek oranda başarılı olduğu halde, zamanında teşhis yapılamadığından karaciğer yetmezliğinden ölüm gerçekleşmektedir (121, 63). HSK' nın tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını önler ve sitotoksik etkiyle bu hücreleri öldürür. Bu nedenle sitotoksik veya antineoplastik olarak da adlandırılırlar. Doğal veya sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavilerin tümü kemoterapinin kapsamı içindedir. Çoğu kemoterapötik ajan neoplastik hücrelerde olduğu gibi normal (transforme olmamış) hücrelerde de apoptozu uyarır (127, 78).

Antikanser ilaçlar, hücre siklusunda etki ettikleri fazlara göre (hücre siklusuna spesifik olanlar ve olmayanlar) sınıflandırılabilir gibi kimyasal yapılarına ve genel etki mekanizmalarına göre de 6 grupta sınıflandırılabilir; alkilleyici bileşikler, antimetabolitler, antibiyotikler, steroid hormonlar, vinka alkaloidleri ve diğer bileşiklerdir (144).

2.4. Vinka Alkaloidleri

Bu grup ilaçlar Vinca Rosea, Podophyllum ve Taksus türü bitkilerin dimerik alkaloidleri ve yarı sentetik türevlerini içerir. Mikrotübüllerin yapıtaşı olan tübülün moleküllerine bağlanarak onları çöktürürler ve mitoz içcikleri oluşumunu engellerler. Sonuçta hücre bölünmesi metafazda durur ve hücre ölür. Nöron mikrotübüllerinin oluşmasını engelledikleri için nörotoksik etkileri vardır. Vinka alkaloidleri vinblastin, vinkristin, vindesin, vinorelbin' i içerir (61).

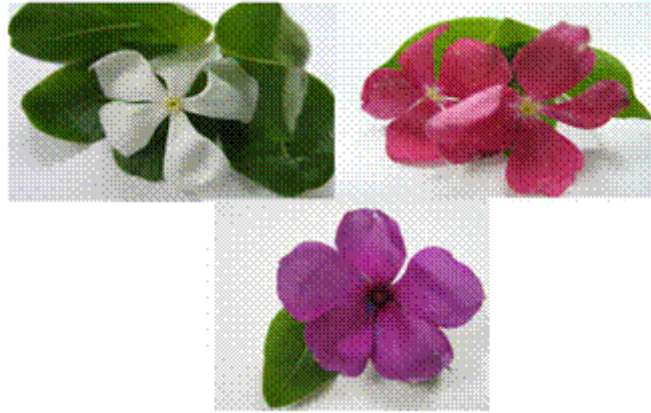
2.4.1. Vinkristin

Vinkristin, biyolojik açıdan aktif yetmiş çeşit alkaloid içeren Madagaskar orijinli Cezayir Menekşesi olarak da bilinen *Catharanthus roseus* sinonim ismi ile *Vinca rosea* adlı bitkiden izole edilen bir antineoplastik alkaloiddir (141).



Şekil 3. *Vinca rosea* (141).

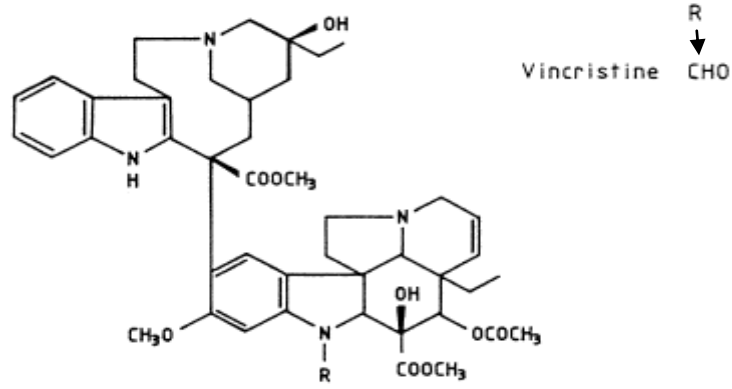
C. Roseus ile yapılan bir çalışmada beyaz, kırmızı ve mor olmak üzere üç farklı renginden alınan alkaloid ekstraktları içerisinde en toksik olanın 'vinkristin' ve 'vinblastin' içeren mor renkteki bitki olduğu saptanmıştır (142).



Şekil 4. *C. Roseus*' un 3 çeşiti 'beyaz', 'kırmızı' ve 'mor' (142).

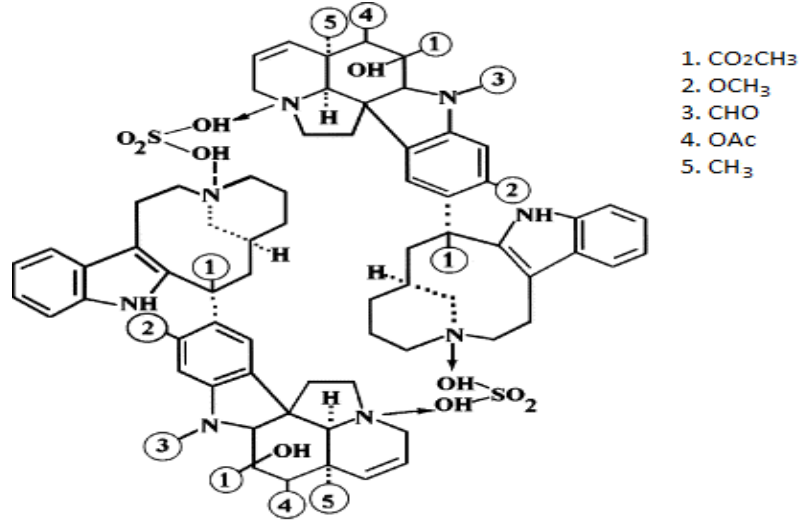
2.4.2. Vinkristinin kimyasal yapısı

Vinkristin renksiz görünümde olup kimyasal formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$ ' dur. Moleküler ağırlığı 824,96 g/mol' dür. Moleküler yapı olarak dihidroindol yapısı içeren vindolin ile indol yapısı içeren katarantin karbon-karbon bağı ile bağlanmasıyla meydana gelir. Vinkristin methanolde, suda ve az miktarda %95' lik ethanolde çözünür (41).



Şekil 5. Vinkristinin kimyasal yapısı (41).

Vinkristin sülfat *C. Roseus*' dan ekstrakte edilen alkaloidin bir sülfat tuzudur, beyaz pudra görümlü olup kimyasal formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \times H_2SO_4$ ' tür. Moleküler ağırlığı 923,06 g/mol' dür (28).



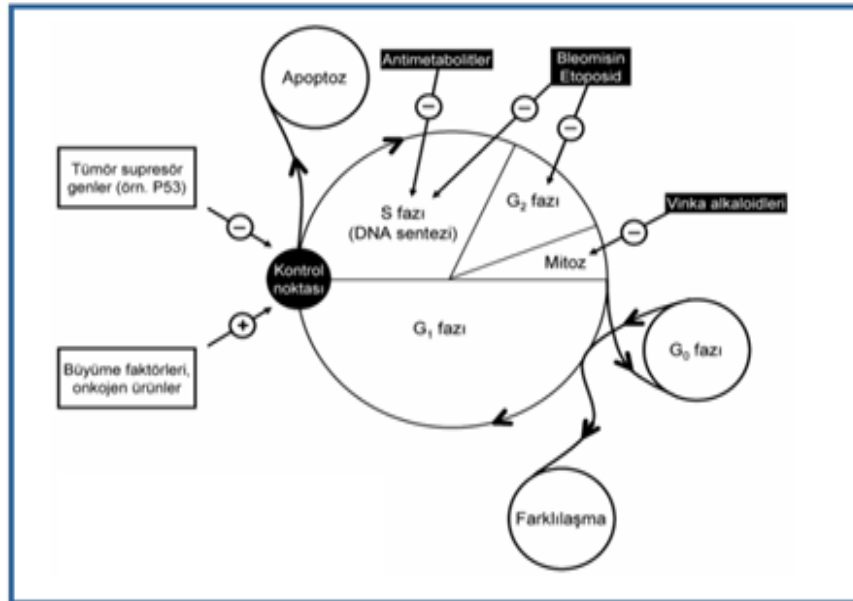
Şekil 6. Vinkristin sülfatın kimyasal yapısı (28).

Vinkristinin yapısında kolayca protonlanan iki nitrojen bulunmaktadır. Bunlardan birincisi alilik nitrojen vindolin tarafında, ikincisi tertiary nitrojen katarantin tarafında konumlanmıştır. Vinkristin bitkide bulunduğu vokuollere göre serbest baz, N- oksit ya da tuz formunda bulunabilir. Vinkristinin diğer vinka alkaloidleri ile benzer kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen N metil grubuna bağlı aldehitin varlığı tüm fizikokimyasal özelliklerinin değişmesini sağlar. Bu grubun varlığının iyonizasyon dengesi ve hidrojen bağı oluşturma yeteneğini etkilemesi sebebiyle kas tipi nikotinik asetilkolin reseptörleri ile nonkompetatif antagonist etki gösterdiği saptanmış, kanser tedavisi dışında madde bağımlılığı tedavisinde de kullanılabilineceği bildirilmiştir (6).

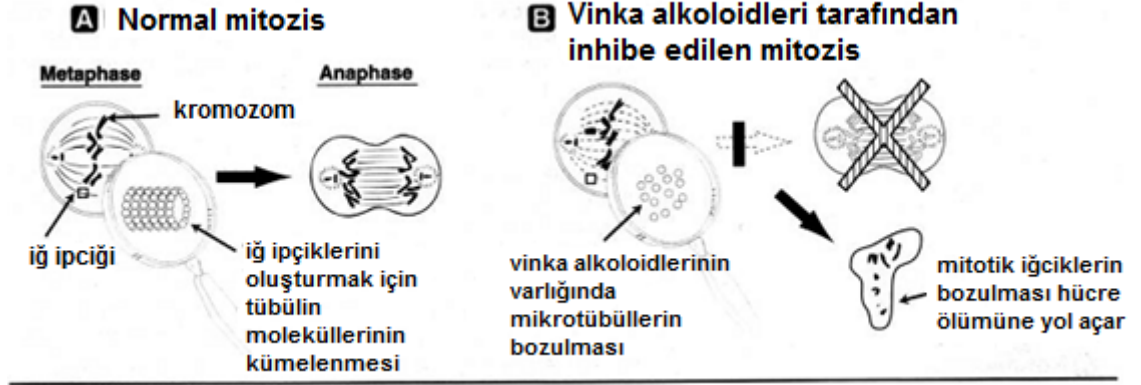
Vinkristin, akut lösemilerin tedavisinde endikedir. Diğer onkolitik ajanlarla kombine olarak Hodgkin hastalığı, non-Hodgkin habis lenfomalar (lenfositik, mikst-hücreli, histiyositik, indifferansiyel, nodüler ve diffüz tip) rabdomiyosarkoma, nöroblastoma, Wilm tümörü, osteojenik sarkoma, mikozis fungoires, Ewing sarkoması, meme kanseri, habis melanoma, küçük hücreli akciğer kanseri ve çocukluk çağı jinekolojik tümörlerde ve hepatoselüler karsinomada kullanılır (42, 122).

2.4.3. Vinkristinin etki mekanizması

Vinka alkaloidleri intrasellüler bir protein olan tübüline bağlanarak onun çökmesine ve hücresel mikrotübüllerin bozulmasına neden olurlar (142). Bir vinka alkaloidi olan vinkristin mikrotübüllerin β -tübul ünitesinin pozitif ucuna bağlanır ve burası vinka-bağlanma noktası olarak adlandırılır. Vinkristinin sadece bir ya da iki molekül bağlanması bile mikrotübül dinamiğini (uzaması ve kısalması) değiştirir. Bu olay mitotik içciklerin oluşumunu önler ve kromozomların kinetokorlarda ki gerginliğini azaltır. Böylelikle kutuplarda ki kromozomlar ekvatora doğru ilerleyemezler. Metafazdan anafaza ilerleyiş engellenir ve hücreler mitotik tutulma durumuna girer. Bu durumda hücreler bir takım değişiklikler geçirebilir örneğin tetraploid hücreler eşit olmayan hücre bölünmesi geçirerek anoploid yavru hücreler meydana getirebilir ya da tetraploid hücre bölünmeden hücre döngüsünden çıkabilir, buna mitotik kayma denir. Bu hücreler adaptasyona uğradığı zaman hücre döngüsünde ilerleyebilirler G1 fazında apoptoza ya da senesense uğrayabilirler. Diğer bir olasılıkta mitotik tutulma mitotik katastrofi oluşabilir ve hücre ölebilir (145, 41).



Şekil 7. Hücre siklusunun şematik gösterimi ve hücre siklusu ile ilişkili ilaçların etkileri (146).



Şekil 8. Vinka alkaloidlerinin etki mekanizması (146).

Çeşitli kemoterapi protokollerinde yer alan vinkristinin mitozda mikrotübül oluşumunu engelleyerek hücre döngüsünü G2/M geçişinde durdurduğu ve apoptoza yol açtıkları gösterilmiştir (47, 73, 103).

2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller en dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynarlar (62, 71).

Serbest radikaller 3 yolla ortaya çıkabilir (53);

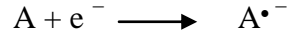
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller reaktif yapılarından dolayı diğer moleküllerin yapılarını değişikliğe uğratarak yeni serbest radikaller oluştururlar. Böylelikle zincir reaksiyonları başlamış olur (51, 52, 16).

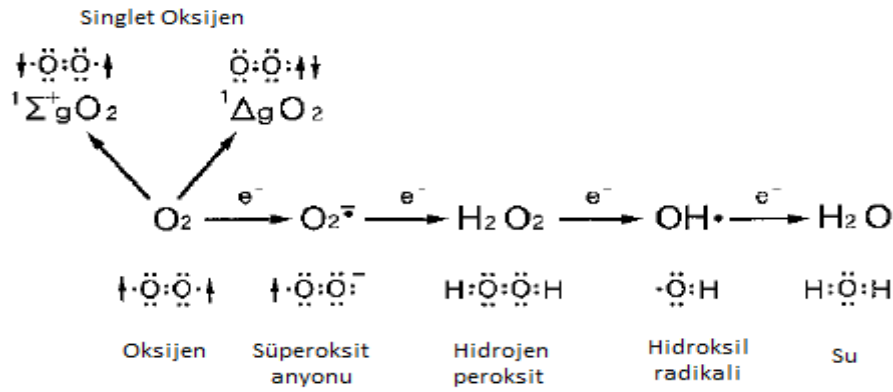
Serbest radikaller yaşam için gereklidir (örn: bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması). Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşanlardır. Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal, reaktif oksijen ürünü olarak isimlendirilebilir Oksijen merkezli serbest radikaller dış tabakada iki eşleşmemiş elektron taşırlar (2).

Araşidonik asit metabolizması sırasında, mikrozomal ve mitokondrial elektron transport zincirinden elektronların diffüze olması sırasında, nükleotid metabolizmasında ve ksantin oksidaz basamaklarında, fagositik hücrelerde solunum patlaması sırasında ve argininden nitrik oksitin (NO) sentezi sırasında ROT üretilmektedir (2). Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene mutlak gereksinimi vardır. Solunan oksijenin % 95' inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık % 5' i toksik serbest radikallere dönüşmektedir. Oksijenin tam olarak suya indirgenememesi organizmayı toksik oksijen ürünlerinin zararlı etkileri ile karşı karşıya bırakır (50).

<u>Radikaller</u>	<u>Radikal olmayanlar</u>
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (HO^{\bullet})	Singlet oksijen ($*O_2$)
Peroksil (ROO^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik oksit (NO^{\bullet})	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon radikali (HQ^{\bullet})	Peroksinitrit ($ONOO$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller (R^{\bullet})	N-halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksid radikali ($RCOO^{\bullet}$)	Hipohalöz asit (HOX)

Şekil 9. Reaktif oksijen türleri (118).

Oksijenin bir elektron ile indirgenmesiyle süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır. Yani oksijen hücrede mitokondri fraksiyonunda dört elektron alarak suya indirgenir (89).

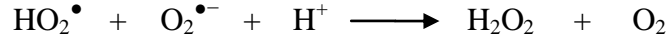


Şekil 10. Moleküler oksijenin uyarılması ve indirgenmesi (89).

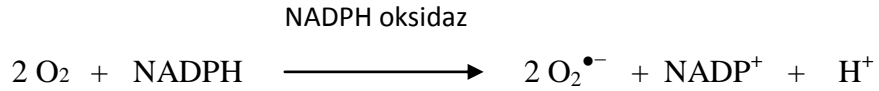
2.5.1. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Süperoksit anyonu hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında oluşan ilk radikaldir (26).

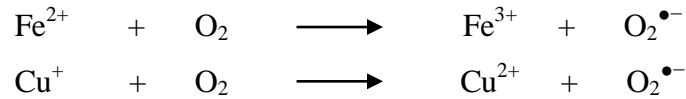
Süperoksit anyonu en çok hücrel organellerde elektron transport zincirinde bazı komponentlerden O₂' e elektron sızması ile meydana gelir. Mitokondriyal e⁻ transport zincirinde e⁻ iki yerden sızar. Birincisi, NADH-dehidrojenaz basamağı, ikincisi ise koenzim Q ya da ubikinon basamağıdır. e⁻' ların O₂' e taşınmasından sorumlu olan sitokrom oksidaz enzimi O₂' nin % 98' ini harcayarak suya indirger. O₂' nin % 2' si ise transport zincirinden sızan e⁻ larla O₂^{•-} oluşturur. O₂^{•-} ile perhidroksil radikali (HO₂[•]) reaksiyona girince, biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu reaksiyonda O₂ ve H₂O₂ meydana gelir (126, 84).



Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi biyolojik moleküller aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olur. Çeşitli dehidrojenazların ve oksidazların katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir. Fagositik hücrelerin NADPH bağımlı oksidaz enzim kompleksi de NADPH' den iki elektron iki molekül oksijene aktarır ve böylece iki molekül O₂^{•-} meydana gelir (143).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu O₂^{•-} meydana gelebilir.



Süperoksit radikali negatif yüklü olmasından dolayı anyon kanallarını kullanarak ya da lipid tabakalardan difüzyon yolu ile plazma membranlarını geçebilir. Böylece uzak mesafelere difüze edilebilir (84).

Ortamda biriken $O_2^{\bullet-}$ 'nin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir (2, 84).

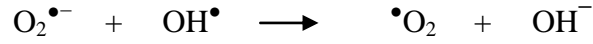
1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksil radikali oluşturabilir.



2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve singlet oksijen ($^{\bullet}O_2$) oluşturabilir.

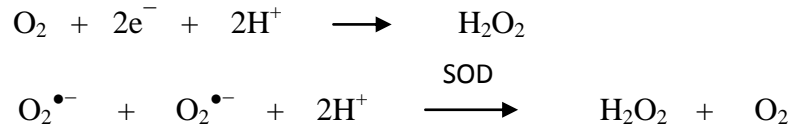


3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olabilir.



2.5.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi sonucu ya da süperoksitin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksiti ve moleküler oksijeni meydana getirir.



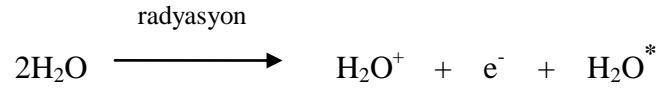
Hidrojen peroksit radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Demir (Fe^{2+}) ve bakır (Cu^{2+}) gibi geçiş metal iyonları ile Fenton reaksiyonunu, süperoksit radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonunu vererek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur. Ayrıca hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici

özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir (143, 67).

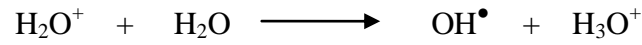
2.5.3. Hidroksil radikali (OH^\bullet)

Hidroksil radikali oksijene üçüncü elektron eklenmesiyle oluşur ve oksijen radikalleri içinde en yüksek reaktiviteye sahip türdür. Canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle etkileşime girerek hasara uğratabilir. Hidrojen radikalının oluşumu geçiş iyonları tarafından (özellikle demir) hızlandırılır 3 yolla oluşabilir (21);

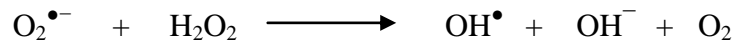
1. Radyasyon-Su: İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşir.



Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek hidroksil radikali oluştururlar. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşir ve üretilen $\bullet\text{OH}$ radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

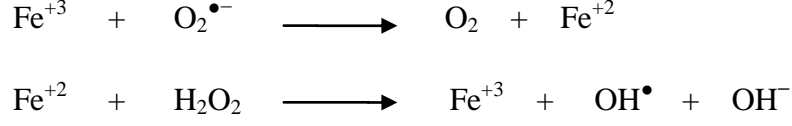


2. Haber-Weiss reaksiyonu;

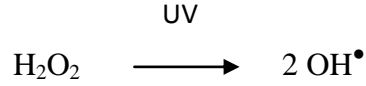


Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesidir. Haber Weiss reaksiyonunda demir ve bakır gibi bazı metal iyonlarında rol oynayabilir.

Fe-katalizli Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu):



3. Hidrojen peroksidin UV ışığına maruziyeti ile;



Biyolojik sistemlerin en reaktif türü olan OH^{\bullet} radikali su dahil ortamda rastladığı her biyomolekül ile tepkimeye girer. Hidroksil radikalının tepkimeleri başlıca; elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma tepkimeleri, katılma tepkimeleridir. Bütün bu tepkimeler OH^{\bullet} radikalının paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır. Katılma tepkimeleri, özellikle elektronca zengin moleküllerle (pürin ve primidin bazları, aromatik amino asitler gibi) gerçekleşir. Hidroksil radikalının organik moleküllerden hidrojen atomu alarak suya indirgendiği tepkime, hidrojen çıkarma tepkimesi olarak bilinir. Hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (50, 26, 143).

2.5.4. Singlet oksijen

O_2 ' in eşlenmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale kendi spininin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu oluştuğu gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar (2).

2.5.5. Nitrik oksit (NO^{\bullet})

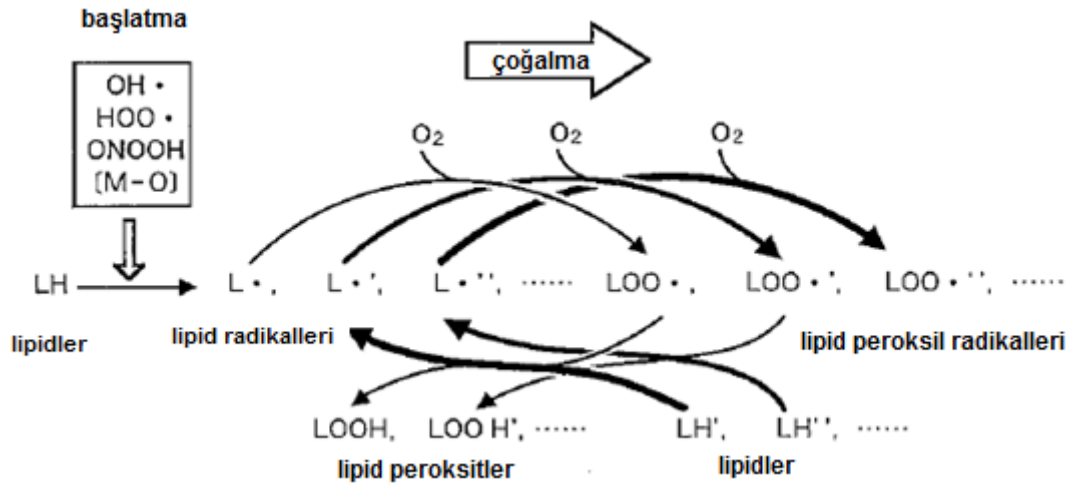
NO^{\bullet} yarı ömrü kısa olan fakat çok fazla biyolojik fonksiyonları bulunan bir moleküldür. Hücre membranlarından kolayca diffüze olabilen ve hedef hücreleri aktive edebilen yeni bir sinyal ileti molekülü olarak kabul edilmektedir. Bu lipofilik serbest radikal, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Kolayca düz kasa geçerek guanilat siklaz enziminin 'Hem' demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO^{\bullet} , oluşmuş olan ROT' lar ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit ($ONOOH$) oluşturmakta ve bunun da ileri dekompozisyonu ile HO^{\bullet} radikali oluşumuna yol açmaktadır. NO^{\bullet} nötrofiller, makrofajlar, endotel hücreleri, plateletler ve nöronlar tarafından üretilmektedir (26, 147).

2.6. Lipid Peroksidasyonu

Lipidler, serbest radikallerin oksidatif ataklarına duyarlı en hassas biyomoleküllerdir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve organizma için oldukça zararlıdır. PUFA, hücre membranı ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL)' lerin yapısında bulunarak hücre membranının akışkanlığını sağlamaktadır (29).

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikallerin PUFA moleküllerinin α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Hidrojen atomunun uzaklaşması yağ asiti zincirini radikal haline dönüştürür. Oluşan lipid radikali (L^{\bullet}) düzensiz bir bileşiktir ve moleküler düzenleme ile molekül içi çift bağ aktarılması sonucu hızla stabilize edilir (dien konjugasyonu oluşur). Lipid radikalının daha sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksit radikali (LOO^{\bullet}) meydana gelir. Güçlü bir radikal olan lipid peroksitlerde reaktif oksijen türleri gibi hücrenel komponentler üzerine toksik etkiler gösterirler (2, 60, 64). Lipid peroksit

radikali başka bir PUFA' yı etkileyerek açığa çıkan H atomunu kapar böylece lipid hidroperokside (LOOH) dönüşmüş ve yeni bir lipid radikali meydana gelmiş olur. Oluşan yeni lipid radikalleri ile bu olay kendi kendini katalizleyerek zincir reaksiyonu olarak devam eder (64, 12).



Şekil 11. Lipid peroksidasyonu reaksiyonları (89).

Lipid peroksidasyonunun son ürün olarak aldehitler (malondialdehit 'MDA', 4 hidroksinonenal), hidrokarbon gazlar (etan, pentan) (45, 31) ve karbonil bileşikleri oluşur (75, 64, 58). Plazma MDA derişimi, enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksit ayrışımının bir sonucu ve göstergesidir. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA' nın asıl kaynağını oluştururlar (2).

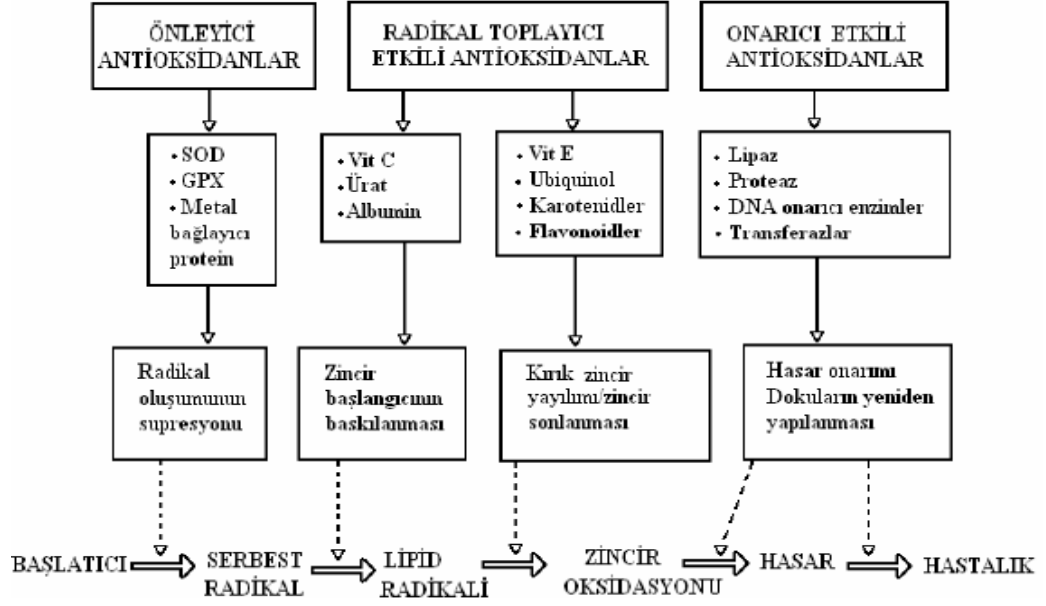
Oluşan bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler. MDA gibi aldehitler, düşük dansiteli proteinleri modifiye ederek metabolik yolu değiştirerek hasar meydana getirebilir. Lipid peroksidasyonu ile membran akışkanlığı azalır, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak proteazlar aktive olur. Tüm bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar (124, 52, 13). Ayrıca MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir, amino grupları arasında çapraz bağlanmalara yol açabilir. Bu özellikleri ile MDA mutojenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (87).

Oksidatif reaksiyonlar, protein molekülleri ile de önemli modifikasyonlar gösterirler. Peptit ve proteinlerin yapıtaşı olan amino asitler serbest radikallerin hedefleridir. –SH grubu ve doymamış bağlar içeren sistin, sistein, histidin, metiyonin, triptofan, tirozin, fenilalanin gibi amino asitler oksidasyona en duyarlı olanlardır. Amino asitlerin radikallerle oksidasyonu sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında kalıcı değişiklikler meydana gelir (2). Başta hidroksil radikali olmak üzere serbest radikaller DNA üzerinde de önemli hasara neden olurlar. DNA üzerinde ki bu hasarlar karsinojenik mutasyonlara neden olabilmektedir (70).

2.7. Antioksidan Sistemler

Organizmada ROT' un düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunlar 'antioksidan savunma sistemleri' veya kısaca 'antioksidanlar' olarak adlandırılırlar (2). Antioksidanlar oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma sistemleri ile etkisiz hale getirirler yani antioksidan maddelerin bir kısmı diyetle (özellikle bitkilerden) alınırken, bir kısmını da vücut kendisi üretir.

Hücre içi antioksidanlar süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-s-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR)' dir. Bu antioksidan enzimler mevcut radikalle reaksiyona girerek onları daha zayıf yeni moleküllere çevirirler. Hücre dışı antioksidanlar ise oksijen yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran vitamin E, vitamin C, hemoglobin, seruloplazmin, albumin, billurubin gibi moleküllerdir. Ayrıca lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışmada onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler olarak antioksidan savunma sisteminde yer alırlar (Şekil 12) (5, 25, 130).



Şekil 12. Antioksidan gruplar ve görevleri (130).

2.7.1. Hücre içi antioksidanlar

2.7.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

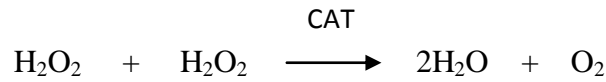
Aerobik bütün hücrelerde bulunan bu enzim süperoksit anyonlarını (O_2^-) hidrojen perokside (H_2O_2) ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin radikallerin hücrelerdeki toksik etkilerini azaltır.

SOD enzimi hem sitozol de hem de mitokondride bulunur. Enzim fagosite edilmiş bakterileri intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynar. İçeriğindeki metal iyonlarına göre sitozolik dimerik bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) ve mitokondriyal tetramerik (mangan süperoksit dismutaz) Mn-SOD olarak adlandırılır. Ayrıca interstisyel alanda ve plazma, lenf, sinovial sıvılarda bulunan tetromerik yapıda bakır ve çinko içeren enzim extraselüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) olarak adlandırılır. Cu/Zn-SOD enziminin aktivitesi Cu' ya, konformasyonu Zn' ye bağlıdır (89, 25, 69).

Bakır ve çinko içeren dismutazlar (Cu, Zn SOD) genel olarak ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve kloroplastlarda bulunur. Tek disülfid bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerirler. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken çinko; Co^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başlar. Mangan içeren dismutazlar (MnSOD) birbirinin aynı iki alt biriminden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır. Bunlardan ayrı demir içeren dismutazlar (FeSOD) prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Mn süperoksit dismutaza benzer yapıdadır (115).

2.7.1.2. Katalaz (CAT)

SOD enziminin aktivitesi sonucu oluşan toksik H_2O_2 , katalaz enzimi ile su (H_2O) ve oksijene (O_2) dönüştürülmektedir .



CAT enzimi 4 tane hemoglobin grubu içeren bir hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. CAT enzimi H_2O_2 ' yi O_2 ' ye yükseltirken başka bir H_2O_2 ' yi H_2O ' ya indirgeyen bir peroksidaz olarak tanımlanmıştır (2).

2.7.1.3. Redükte glutatyon (GSH)

Glutatyon sistein, glutamik asit ve glisinden sentezlenmektedir. Yapısındaki sisteinden dolayı tiyol grubu bulunan bir tripeptittir (58). Tiyol grupları enzimatik reaksiyonlar aracılığı ile serbest radikalleri yakalayarak görev yapan hücresel antioksidanlardır. Protein tiyol gruplarının redükte durumda tutulmasında, hidrojen peroksidin katabolizmasında ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda, amino asit transportunda, radyasyonun iyonize etkilerinin azaltılmasında görev alır (58, 85).

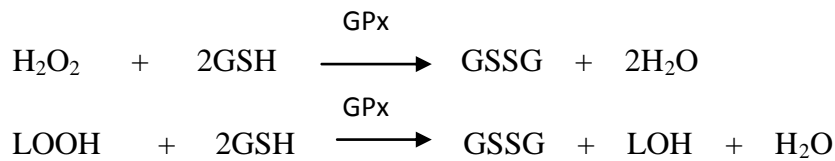
Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutatyon hücrenin oksidoredüksiyon dengesini koruyarak hücreleri endojen ve eksojen oksidanların zararlı etkilerinden korur (58). Karaciğer başta olmak üzere organizmanın bütün hücrelerinde bulunur (59).

GSH, radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat görevi yaparak bir radikal tutucu gibi davranır. Örneğin OH^\bullet radikaline dönüşen H_2O_2 ve lipid peroksidasyon ürünlerinden organik peroksitlerin tutulmasında rol oynayan, antioksidan enzim olan GPx' in aktivitesi için gereklidir (10).

Serbest radikal moleküllerinin karsinogenezde ki zararlı etkileri ve GSH' ın rolüne ilişkin araştırmalar son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. GSH metabolizmasındaki bozukluğun kanser patogenezinde sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (10, 36, 40, 59). GSH, antioksidan savunma sisteminde önemli bir yere sahip olan GPx, GR ve GST enzimlerinin fonksiyonu için gereklidir (10, 59).

2.7.1.4. Glutatyon peroksidaz (GPx)

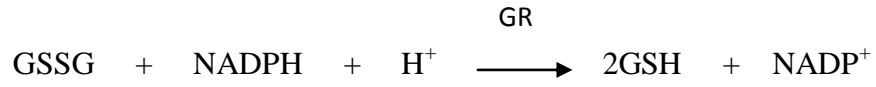
GPx' de katalaz gibi H_2O_2 ' nin suya dönüştürülmesinden sorumlu enzimdir.



Bu enzimin selenyum (Se) bağımlı ve Se-bağımsız iki izomeri mevcuttur. Se-bağımlı formu selenosistein formunda bulunmakta olup hem H_2O_2 ' yi hem de organik peroksitleri (LOOH) metabolize eder. Se-bağımsız enzim ise yalnızca organik peroksitleri metabolize eder (10, 90). GPx, H_2O_2 'yi suya indirgeyerek lipid peroksidasyonunun başlamasını önler ve lipid peroksitlerindeki metabolize ederek reaksiyonun devam etmesini önler (58).

2.7.1.5. Glutasyon redüktaz (GR)

H₂O₂ GPx ile suya indirgenirken ve oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken okside glutasyon seviyesi (GSSG) artar. Glutasyon redüktaz, GSSG'nin tekrardan GSH' a indirgenmesini katalize eder. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH gereklidir (2, 123). GR sitozol ve mitokondride bulunmaktadır.



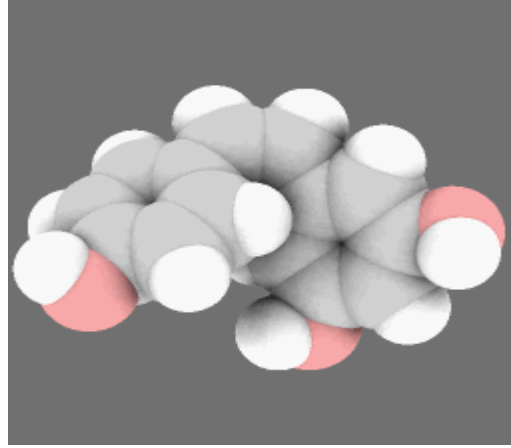
2.7.1.6. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Glutasyon S-Transferaz insanda, birçok dokuda geniş dağılıma sahip çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgüllüğü olan bir enzimdir. Bu özelliği ile GST, potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmalarda savunma görevini üstlenmiştir. GST glutasyonun tiyol (-SH) grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu kataliz ederek onların elektrofilik alanlarını yok eder. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipid hidroksiperoksitlere karşı GST, Se- bağımsız glutasyon aktivitesi gösterirler (126). Ayrıca zehirsizleştirme reaksiyonları organizmayı karsinogenik ve toksik etkilerden korumak gibi görevleri vardır. GST hepatik hücrelerde, eritrositlerde oldukça fazla bulunmaktadır (10).

2.8. Resveratrol (RES)

Diyet ile alınan ya da endojen olarak sentezlenen antioksidanlar hücrelerde oluşan hasarı ya önler ya da oluşan hasarı en az seviyeye indirirler. Antioksidanların tümör hücrelerinin boyutlarını küçültmede, normal hücrelerin boyutlarını devam ettirmede oluşan hasarı tamir etme ve serbest radikallerin etkisini ortadan kaldırdığına dair çalışmalar mevcuttur (95). Üzümde bulunan bir resveratrol diyet ile alınan antioksidanlara örnektir.

Resveratrol (3, 4', 5-trihidroksi-stilben), asmanın yaprak ve tane kabuğunda yüksek miktarda sentezlenen ve fitoaleksin özelliği gösteren stilben grubu bir bileşiktir. Kapalı formülü $C_{14}H_{12}O_3$ tür ve molekül ağırlığı 228,25 g/mol' dür (4).



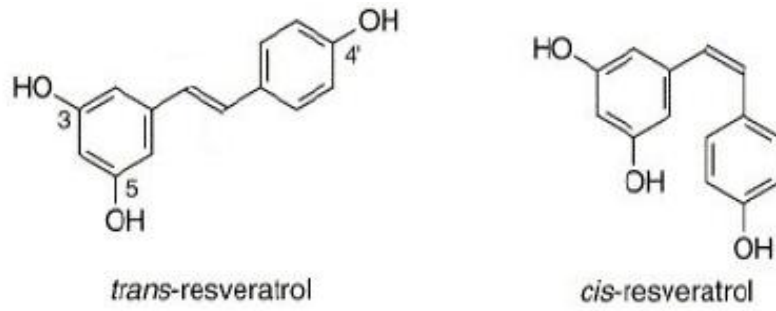
Şekil 13. Resveratrol' ün standart koşullardaki (25 °C, 100 kPa) üç boyutlu görünümü (80).

'Fitoaleksin' Yunanca bir terim olup, 'fiton'; bitki, 'aleksin'; koruyucu anlamındadır. İlk olarak 1930'lu yılların başlarında tıbbi bir bitki olan 'Veratrum Grandifolium Loes. fil.' de tanımlanmıştır. Polygonum cuspidatum bitkisinin köklerinden de özütlenen resveratrol, Japonya ve Çin' de halk tarafından "kojo-kon" adıyla bilinen geleneksel bir ilaç olarak hipertansiyon, damar tıkanıklığı, cilt iltihabı ve alerji gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (65).



Şekil 14. Veratrum Grandifolium Loes. fil bitkisi (135).

RES, bitkilerde güneş ışığı, ozon, ağır metal maruziyeti, iklim değişikliği gibi farklı stres koşullarında ve *Batrytis cinerea* gibi patojen mantar enfeksiyonlarına cevap olarak yaprak dokularında sentezlenir. Bu sentezi gerçekleştiren enzim stilben sentazdır. RES' in iki tane stereoizomeri bulunur, trans-resveratrol ve cis-resveratrol, transizomeri daha kararlı formdadır. cis-izomerine üzüm ekstraktlarında hiç rastlanılmamıştır (8, 37). Trans-resveratrol ilk olarak 1976' da Longcake ve Pryce tarafından üzüm aşamasında keşfedilmiştir.



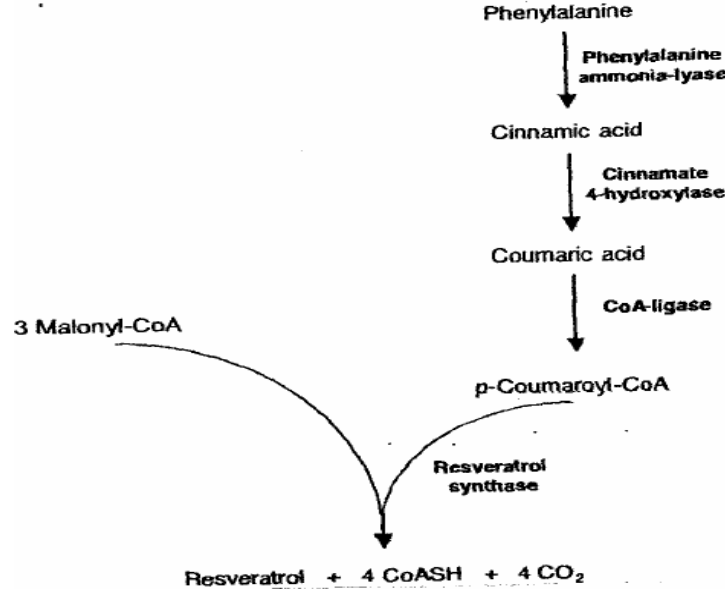
Şekil 15. Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı (116).

Bitkilerde polifenoller, resveratrolde dahil olmak üzere genelde glikozit yapısındadır. Bu nedenle RES, 3-O-β-D glikozit 'piceid' olarak bilinir ve trans, cis izomerlerinin adları sırasıyla trans-piceid ve cis-piceid'dir. Bunun yanı sıra doğal analogları ve konjüгатları da vardır (92, 116).

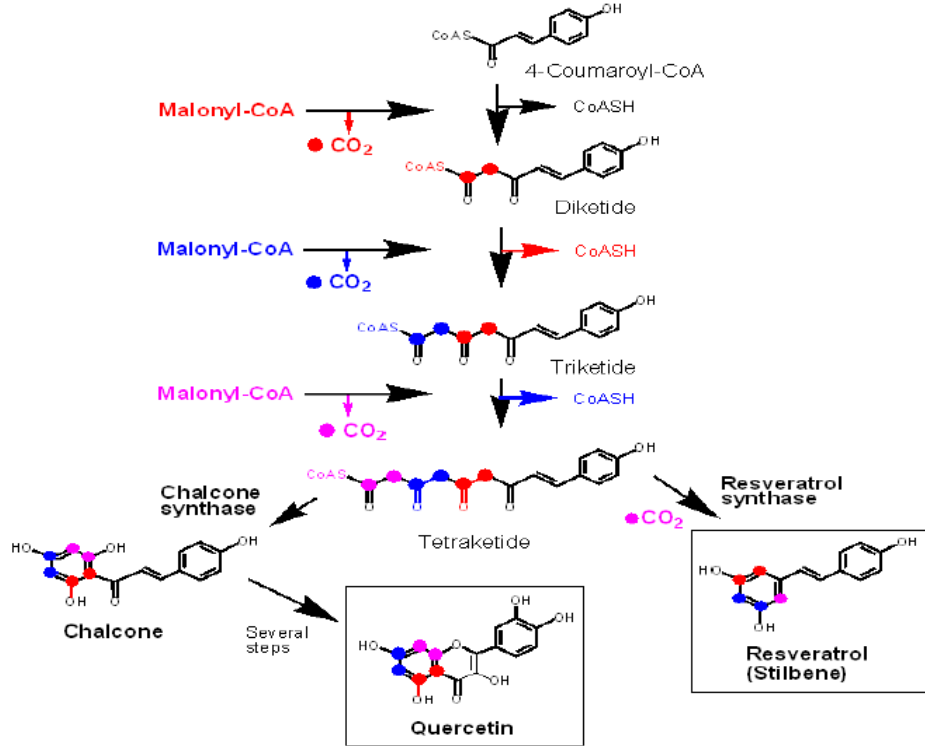
2.8.1. Resveratrolün biyosentezi

Resveratrol, fenilalaninden başlayarak çok basamaklı bir reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. İlk basamakta fenil alanin ammonia liyaz enziminin deaminasyon işlemi ile sinnamik asite dönüşür. Sinnamik asit 4-hidroksilaz, p-hidroksilasyon reaksiyonları ile 4-koumarik aside dönüşür ve 4-koumaratla Co-A ester yapısına dönüşür. 4-Koumaril Co-A ve 3 malonil Co-A tetraketid yapısını oluşturur (14). 4-Koumaril Co-A ve 3 malonil Co-A bütün bitkilerde bulunan enzimlerdir. Bu aşamaya kadar sentez basamakları aynı iken bundan sonra ki basamakta oluşan ürünün RES mi

yoksa flavonoit mi olduğu uzun yıllar sır olarak kalmış. Daha sonra ise ortamda RES sentaz (stilben sentaz) varsa ürünün RES ve kalkon sentaz varsa ürünün flavonoit olduğu anlaşılmıştır (117, 136).



şekil 16. Fenilalanin' den trans-resveratrolün biyosentezi (14).



şekil 17. 4-Koumaril Co-A ve 3 malonil Co-A'dan flavonoit ve resveratrolün biyosentezi (136).

Resveratrolün değişik doz ve uygulama süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; RES oral yolla alındıktan sonra hızla bağırsaklardan emilir ve bir saat gibi kısa sürede kana geçer ve karaciğer, böbrek, kalp ve beyin başta olmak üzere çeşitli organlara dağılır. Oral yolla 25 mg verildiğinde en az %70' inin emildiği bildirilmiştir. Biyotransformasyonu asıl olarak karaciğer mikrozomlarında ve az miktarda da bağırsaklarda olur. RES, Faz-I reaksiyonları; aril hidroksilazlarla ve sitokrom P-450 enzim sisteminde kapsayan enzimlerle oksidoredüksiyon reaksiyonlarına uğrar. Oluşan reaktif gruplar Faz-II reaksiyonları ile glukuronit ve sülfat konjüгатları şeklinde idrarla atılır. Sıçanlara 20 mg/kg dozda RES verildikten 12-24 saat sonra, toplanan idrar örneğinde HPLC ve LC-MS-MS analizleri ile resveratrol metabolitlerine bakılmış ve elde edilen bulgulara göre resveratrolün ana metabolitlerinin: RES-monoglukuronit, RES-monosülfat, dihidro-RES ve dihidro-RES monosülfat olduğu tespit edilmiştir (99, 128, 129),

2.8.2. Resveratrolün antioksidan aktivitesi

Resveratrol, güçlü bir antioksidandır. En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha etkilidir. RES, OH[•] ve O₂^{•-} radikallerini süpürür, OH[•] radikalinin neden olduğu lipit peroksidasyonu inhibe eder, OH[•] ile H₂O₂' nin neden olduğu DNA hasarını ve protein oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini artırır (77). RES, düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanarak lipoprotein peroksidasyonunu inhibe eder. Bu nedenle RES' in lipofilik karakterde olduğu düşünülmektedir. RES' in serbest radikal süpürücüsü ve enzim düzenleyici özelliklerinden dolayı oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (106).

2.8.3. Resveratrolün antikanser aktivitesi

RES' in son zamanlarda antitümör ve olası kanser önleyici özelliklerine dikkat çekilmektedir (15, 110). RES, karsinogenezin 3 önemli aşamasında; başlangıç, gelişim ve ilerlemesinde olası bir kanser önleyici ajan özelliği göstermektedir (126). Kanser

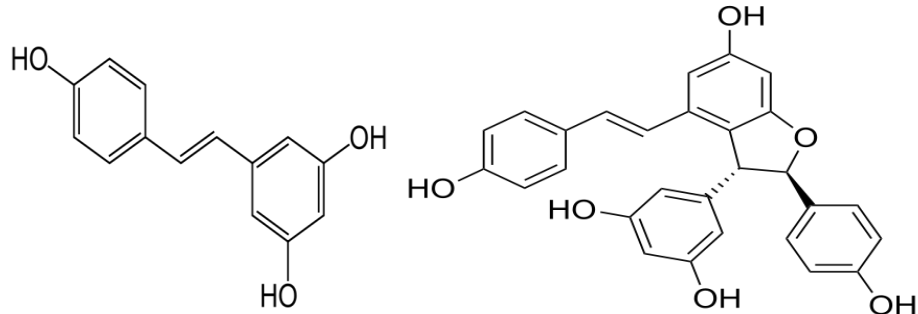
hücrelerinin yaşam süresini ve tümör gelişimini destekleyen çoklu sinyal moleküllerini hedef alması ve düşük toksisitesi ile ideal bir molekül olarak görülmektedir (110). Bu doğal bileşiğin hücre büyümesi, inflamasyon, apoptoz, anjiogenez, invazyon ve metastazı gibi birçok intraselüler kanser hedeflerine etki ettiği kanıtlanmıştır (9).

Yapılan hayvan çalışmalarında resveratrol meme, deri, prostat tümörlerini geciktirmiş ya da önlemiş, ek olarak kolonik, hepatik, pankreatik, küçük intestinal, ve gastrik gibi tümörlerin başlangıcını baskılamıştır. *In vitro* çalışmalarda da deri, meme, ovaryum, serviks, prostat, mide, kolon, pankreas, karaciğer ve trioid karsinoma gibi farklı insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkiler gösterdiği görülmüştür (15, 111).

2.8.4. Resveratrolün hepatoprotektif aktivitesi

Karaciğer stellat hücrelerinin aktivasyonunu engelleyen bir bileşiğin fibrojenezide engelleyebileceği düşüncesiyle, RES' in stellat hücre proliferasyonu üzerine olan etkisi araştırılmış ve sonuç olarak RES' in, sinyal ileti yolağını ve hücre protein döngüsü ekspresyonunu inhibe ederek, stellat hücrelerinin aktivasyonunu engellediği bildirilmiştir (37).

2.9. ϵ -Viniferin



Şekil 18. Resveratrol ve epsilon viniferin'in moleküler yapısı (98).

Resveratrolün dehidromeri olan ϵ -viniferin oksidatif prosesler ile resveratrol'den türemiştir (Şekil 18). Kapalı formülü ϵ -viniferin $C_{28}H_{22}O_6$ 'dır. ϵ -viniferin içeriği resveratrolün içeriğinden çok daha güçlü olmasına rağmen henüz tam olarak incelenmemiştir. Resveratrol ve ϵ -viniferini de içeren oligomerleri insan kolon kanser hücreleri, insan hepatoma HepG2 hücresi ve lösemi hücreleri gibi kanser hücrelerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etki gösterdiği ileri sürülmüştür. ϵ -viniferin' in ayrıca *in vitro* olarak resveratrol'den daha güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (98, 134).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Hücre Kültürü Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre hattının temini

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) hücre kültürü bankasının çoğaltarak -192 °C' de azot tankında stokladığı kanser hücre hatlarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

DMEM	: Sigma
Fetal Bovine Serum	: Biochrom AG
PBS (Phosphate Buffered Saline)	: Sigma
Tripsin-EDTA	: Fluka
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu	: Gibco
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	: Sigma
Tris HCl	: Sigma
H ₂ O ₂	: Merck
Kloroform	: Merck
Metanol	: Merck
Vinkristin sülfat	: Sigma

ε-Viniferin	: Actichem
Etoposit	: Sigma
Redükte Glutasyon Kiti	: The Chemicon
Süperoksit Dismutaz Kiti	: Cell Biolabb
Lipid hidroperoksid Kiti	: Cayman
Chemical Company Filtre (0.22 µM milipor)	: Sartorius
Kültür Plakası (96 kuyucuklu)	: Greiner bio-one
Mikropipet ucu (10, 200, 1000 µl)	: Gilson
Santrifüj Tüpleri (15, 50 mL)	: Isolab
Hücre Kültür Flaskı (25 cm ² lik)	: Greiner bio-one
Hücre Kültür Flaskı (75 cm ² lik)	: Greiner bio-one
Otomatik Pipetör (20, 100, 1000, 5000 µl)	: Gilson
Steril otomatik mikropipet ucu (100, 200, 1000, 5000 µl)	: Gilson
Pipetman Ultra Multichannel (8X300)	: Gilson
96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril plaka	: Greiner
Thoma Lam	: Isolab

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Laminar flow steril güvenlik kabini	: Holten
Sıvı azot tankı	: Taylor-Wharton
CO ₂ ' li İnkübatör	: Sanyo MCO-18AIC
Hava sterilizasyon cihazı	: Airsopure
Sterilizatör	: Nüve EN 500
İnverted mikroskop	: Olympus

İnverter ışık mikroskop	: Leica
Santrifüj	: Heraus Megafuge
Eppendorf santrifüj	: Eppendorf
Yüksek hızlı, soğutmalı santrifüj	: Heraeus
ELİSA mikroplate okuyucu	: Biotek
Flourometre	: Leica DMI 400
Sonicator	: Sonics
Hassas terazi	: Ohaus
Buzdolabı	: Bosch
Derin dondurucu (-20°C)	: Liebherr Medline
Etüv	: Nüve FN 500
Otoklav	: ALP
Saf su cihazı	: Nüve
Isıtmalı su banyosu	: Nüve 302

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü uygulamaları

- **Hücre hatlarının stoktan çıkarılması**

-192 °C sıvı azot tankında bulunan HepG2 hücreleri tanktan çıkarılır. Steril kabin içerisinde, oda sıcaklığında, içeriği tamamen eriyince %10 FBS içeren DMEM besiyeri içine aktararak, 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılır ve dipte kalan pellette ki hücreler yeni besiyeri içinde süspansiyon edilerek kültür flasklarına alınıp ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilir.

- **Hücre hatlarının pasajlanması**

HepG2 hücreleri flaskın yüzeyini tamamen kapladıkları zaman flask içindeki besiyerleri bir pipet yardımıyla uzaklaştırılır. Bu hücre hatlarının yüzeyleri PBS ile yıkanır ve daha sonra 1x tripsin/EDTA solüsyonu konularak yapışan hücre hatlarının flasktan kalkması sağlanır. Tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için hücreler kalktıktan sonra yeni besiyeri konularak 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir. Bu süre sonunda süpernatant kısmı atılır ve üreyen hücrelerin miktarına göre hücreler flasklara bölünür.

- **Hücre hatlarının stoklanması**

Çoğalan hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1x tripsin/EDTA solüsyonu yardımıyla kaldırılıp besiyeri eklenip, 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında pellet üzerine her bir karyotüp için 1800 µl hücre besiyeri konulup, 30 dk buz üzerinde bekletilir ve 30 dk sonra her bir karyotüpe 200 µl DMSO çözeltisi ilave edilip karyotüpler -20 °C'ye kaldırılır. 2 saat sonrasında karyotüpler sıvı azot tankına yerleştirilerek stoklama işlemi tamamlanır.

3.2.2. HepG2 hücre sayımı

Hücreleri deneye hazırlamak için, yüzeyi tamamen HepG2 hücreleri ile kaplanmış olan flask steril kabine alınır. 1x tripsin/EDTA ile yüzeyden tamamen ayrılan hücrelere besiyeri eklenerek 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüjden hemen sonra süpernatant atılır ve pelletin üzerine 1 ml besiyeri eklenir. Pipetleme tekniği ile tekrardan süspanse hale gelen hücrelerden 10 µl çekilerek thoma lama yayılır. Thoma lamında bulunan 16 büyük kareden birbirine uzak 3 kare seçilir ve bu karelerdeki hücreler sayılıp aritmetik ortalaması alınır. $A \times SF \times 10^4$ formülü ile 1 ml' de ki hücre sayısı belirlenir.

A: 16 büyük karede sayılan hücre adedi

SF: Seyreltme Faktörü

10⁴: 0,1 mm³' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

Her bir petri kabına 1 x 10⁶ tane hücre ekilir ve toplam hacim 3 ml olacak şekilde besiyeri konulur.

3.2.3. *ε-viniferin, vinkristin sülfat, vinkristin sülfat + ε-viniferin ve etoposid maddelerinin IC₅₀ ve %80 canlılık değerleri*

Bu çalışmada, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D laboratuvarında A.Ü.BAP/090306 nolu 'Hepatoselüler Karsinomada Oksidatif Stres ve Apoptoz' başlıklı proje gereğince daha önceden MTT yöntemi ile ölçülerek tespit edilmiş olan değerler kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. HepG2 hücreleri için vinkristin sülfat, ϵ -viniferin, etoposid ve kombinenin (vinkristin sülfat + ϵ -viniferin) 24 saatlik IC₅₀ ve %80 hücre canlılığındaki dozları

Maddeler (μM)	IC ₅₀	% 80
Vinkristin sülfat	52,5 μM	6 μM
ϵ -viniferin	98,3 μM	80 μM
Etoposid	55 μM	7 μM
Vinkristin sülfat + ϵ -viniferin	(11,25 μM + 15,8 μM)	(3,63 μM + 3,75 μM)

3.2.4. HepG2 hücrelerinin zamana ve doza bağımlı madde uygulamaları

Bu çalışmanın 1. aşamasında, deneye alınmak üzere stoktan çıkarılan HepG2 hücreleri gerekli sayıya ulaştıktan sonra ϵ -viniferin, vinkristin sülfat, vinkristin sülfat + ϵ -viniferin ve etoposid maddelerinin Tablo 1’ de verilmiş olan IC₅₀ (yüksek doz) ve %80 canlılık dozları (düşük doz) ile 3, 6 ve 24 saat kontrol grubuna karşı inkübe edilmişlerdir. Etoposid, yaygın kullanılan bir kemoterapötik ajan olduğu için, bütün deney aşamalarında vinkristin sülfat için kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

- 1. aşama için maddeler ile inkübe edilen çalışma grupları;
 - 1- Maddesiz kontrol grubu (K)
 - 2- Düşük doz (80 μM) ϵ -viniferin grubu (dVNF)
 - 3- Yüksek doz (98,3 μM) ϵ -viniferin grubu (yVNF)
 - 4- Düşük doz (6 μM) vinkristin sülfat grubu (dVCR)
 - 5- Yüksek doz (52,5 μM) vinkristin sülfat grubu (yVCR)
 - 6- Düşük doz (7 μM) etoposid grubu (dETO)
 - 7- Yüksek doz (55 μM) etoposid grubu (yETO)
 - 8- Düşük doz (3,63 μM VCR + 3,75 μM ϵ -vnf) kombine grubu (d(VCR+VNF))
 - 9- Yüksek doz (11,25 μM VCR + 15,8 μM ϵ -vnf) kombine grubu (y(VCR+VNF))

Çalışmanın 2. aşamasında, çalışmanın birinci aşamasında olduğu gibi stoktan çıkarılan HepG2 hücreleri gerekli sayıya ulaştıktan sonra ϵ -viniferin, vinkristin sülfat, vinkristin sülfat + ϵ -viniferin ve etoposit maddelerinin IC₅₀ ve %80 canlılık dozları ile 3, 6 ve 24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon işleminden sonra hücre gruplarına, ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile birlikte kombine uygulamasının, dışsal kaynaklı oksidatif stres ortamına karşı HepG2 hücre hattında ki olası koruyucu etkisini incelenmek için besiyerine 500 μ M H₂O₂ eklenerek 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 saat daha inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu aşamada 1. aşamada kullanılan madde gruplarına ek olarak, H₂O₂' nin hücrel lipit peroksidasyonu, SOD aktivasyonu ve indirgenmiş glutatyon düzeylerine olan doğrudan etkisini incelemek ve maddelerin koruyucu özelliklerini gözlemlmek için besiyerine sadece 500 μ M H₂O₂ eklenilen ve 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakılan bir başka kontrol grubu daha kullanılmıştır. Bu grup H₂O₂-Kontrol grubu (H₂O₂-K grubu) olarak adlandırılmıştır.

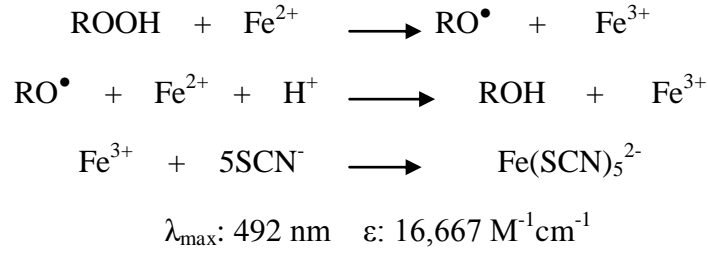
3.2.5. H₂O₂ ile indüklenme işlemi

Hücreler belirlenen zaman aralığı ve madde miktarlarıyla inkübe edildikten sonra hücre besiyeri pipetörle çekilip atılır, hücreler 1x PBS ile yıkanır ve yeni 3 ml' lik besiyeri eklenir. Daha sonra her bir pedri kabına 150 μ l 500 μ M H₂O₂ eklenerek 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde tekrardan 1 saat inkübasyona bırakılır.

3.2.6. Lipid peroksidasyon (LPO) ölçümü

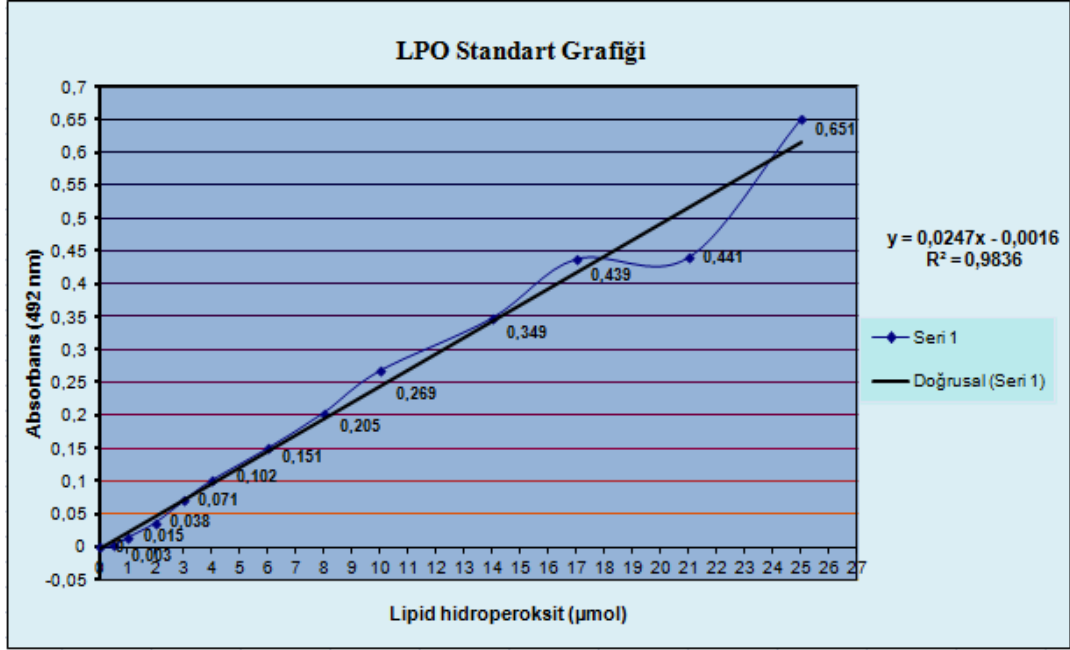
LPO ölçümleri 'Cayman's Lipid Hidroperoksit Deney Kit'i kullanılarak Bio-Tek ELx-800 mikropate okuyucuda ölçülmüştür.

'Cayman's Lipid Hidroperoksit Deney Kit' inin prensibi: hidroperoksitlerin ferröz-demir (Fe²⁺) ile reaksiyona girmesiyle reaksiyon boyunca oluşan ferri-demir (Fe³⁺)' in tiyosiyanat iyonu kullanılarak (kromojen olarak) ölçümüne dayanmaktadır.



- **LPO ölçüm yöntemi;**

9 petri kabının her birine 1×10^6 tane hücre ekilir. Zamana ve doza bağımlı olarak hücreler maddeler ile inkübe edilir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmaz. Madde inkübasyonundan sonra petrilerdeki besiyeri çekilip 2 ml soğuk HPLC grade su eklenir, hücreler ayrı ayrı kauçuk kazıyıcı ile toplanarak sonikatörde sonike edilir. Sonike edilen hücrelerden 500 μl cam test tüpüne aktarılır. 500 μl Extract R saturated methanol her tüpe eklenip vortekslenir. Üzerlerine 1 ml soğuk kloroform eklenip tekrardan vortekslenir. Karışımlar 1500 g' de 5 dk 0°C ' de santrifüj edilir. Santrifüjden sonra buza yerleştirilen tüplerin dibindeki kloroform tabakası pastör pipetle dikkatle toplanıp (yaklaşık 600 μl) başka bir cam test tüpüne aktarılır tekrardan buza yerleştirilir. Toplanan kloroformlardan 500 μl yeni bir cam tüpe alınıp üzerine 450 μl kloroform-methanol çözeltisi ilave edilir. FTS Reagent 1 ve FTS Reagent 2' den eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlanan kromojen solusyonundan 50 μl her tüpe eklenir. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 492 nm' de mikropate okuyucuda ölçüm yapılır. Ölçülen absorbans sonuçları standart grafiğinde değerlendirilerek örneklerdeki hidroperoksit konsantrasyonları (μmol) bulunur.



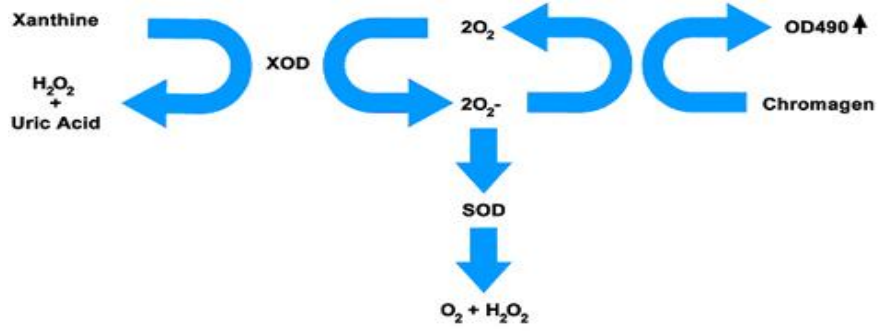
Grafik 19: LPO standart grafiği

Örnek tüplerindeki LPO değerleri hesaplaması (µmol): $\frac{\text{örnek absorbansı} - y\text{-intercept}}{\text{eğim}}$

3.2.7. Süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü

SOD ölçümleri ‘Cell Biolabb Süperoksit Dismutaz Deneş Kit’ i kullanılarak Bio-Tek ELx-800 mikropate okuyucuda ölçülmüştür.

Cell Biolabb Süperoksit Dismutaz Deneş Kit’ inin prensibi; ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit anyonlarının kromojen solüsyonu ile ölçümüne dayanır. Süper oksit anyonları dolaylı yoldan SOD aktivasyonu olarak ölçülür. SOD enziminin varlığında süperoksit anyon konsantrasyonu azalır ve daha düşük kolorimetrik sinyal ile sonuçlanır (180).



Şekil 19. SOD deney prensibi

- **SOD ölçüm yöntemi;**

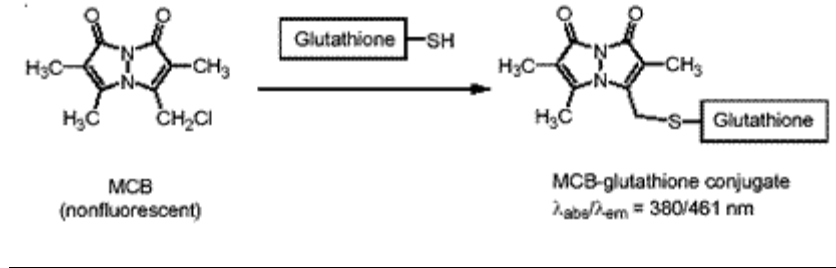
9 petri kabının her birine 1×10^6 tane hücre ekilir. Zamana ve doza bağımlı olarak hücreler maddeler ile inkübe edilir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmaz. Madde inkübasyonundan sonra her bir gruptaki hücreler 5 ml soğuk 1x PBS ile yıkanır. 500 µl 1x Hücre lizis tamponu her petri grubuna ilave edilir ve buzda 10 dk'lık inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra hücreler kauçuk bir kazıyıcı ile ependorf tüplerine toplanır. Ependorflar 4 °C' de 10 dk 12000 g' de santrifüj edilir. Toplanan hücre lizatları yeni ependorf tüplerine transfer edilir. 96 kuyucuklu tabakalar içerisine 50 µl SOD lizatı, 5 µl ksantin solüsyonu, 5 µl kromojen solüsyonu, 10 µl 10 x SOD analiz tamponu ve 20 µl deiyonize su ilave edilir. Son olarak 1 x Analiz tamponuyla ksantin oksidaz 1:10 oranında dilüe edilerek her kuyucuğa 10 µl ilave edildi ve iyice karıştırılır. 37 °C' de 1-2 saat inkübe edilir. Mikroplate okuyucuda 490 nm' de optik dansitesi okunarak ölçüm yapılır.

$$\text{SOD Aktivasyonu (\%)}: (OD_{\text{kör}} - OD_{\text{örnek}}) / (OD_{\text{kör}}) \times 100$$

3.2.8. Redükte glutatyon (GSH) ölçümü

GSH ölçümleri 'Chemicon Glutatyon (GSH) Ölçüm Kit' i kullanılarak fluorometre cihazında çalışılmıştır.

Chemicon Glutasyon (GSH) Ölçüm Kit' inin prensibi; GSH için yüksek afiniteye sahip olan monoclorobiman (MCB) hücreler ile inkübe edilir ve glutasyonun tiyol gruplarına bağlanarak mavi ışığa yapar. Fluorometre kullanılarak bu ışığa kolaylıkla ölçülür.



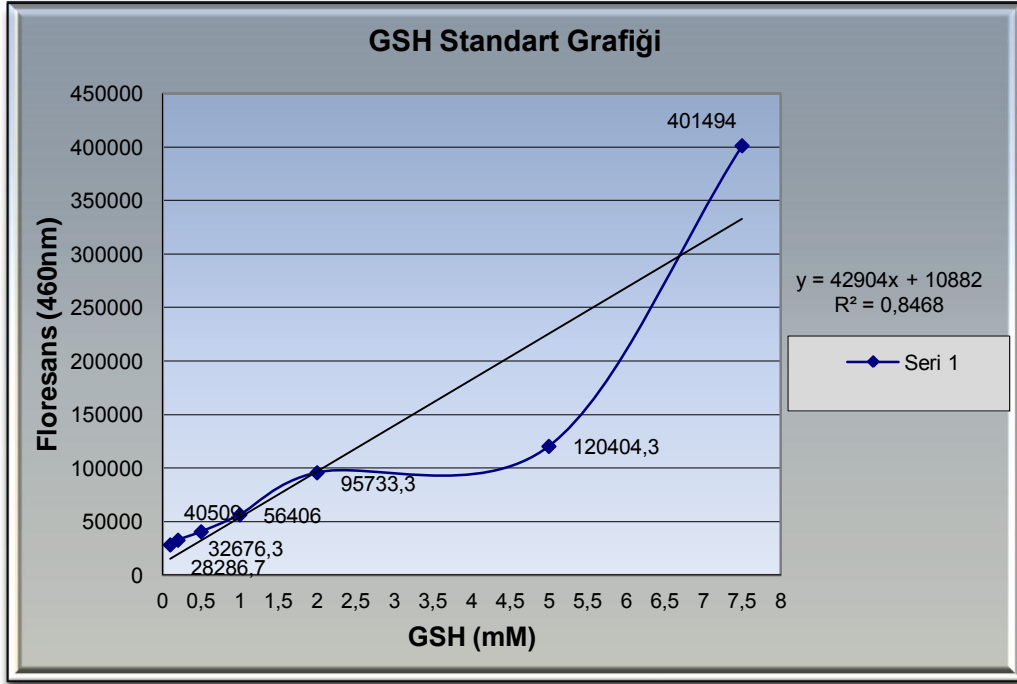
Şekil 20. GSH deney prensibi

- **GSH ölçüm yöntemi;**

9 petri kabının her birine 1×10^6 tane hücre ekilir. Hücreler zamana ve doza bağımlı olarak maddeler ile inkübe edilir. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmaz. Madde inkübasyonundan sonra her bir gruptaki hücreler 5 ml soğuk 1 x Yıkama Solüsyonu ile yıkanır. Petri kapları buza yerleştirilir. Yıkama solüsyonu çekildikten sonra kaplara 1 ml soğuk 1 x hücre lizis Tamponu eklenir. 10 dk buzda inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra hücreler kauçuk bir kazıyıcı ile kazınıp ependorf tüplerine toplanır. 4 °C' de 10 dk 12000 g' de santrifüj edilir. Toplanan hücre lizatları yeni ependorf tüplere transfer edilir. Her bir tüpten 90 µl hücre lizatı çekilerek 96 kuyucuklu tabakaya eklenir. Önceden hazırlanan MCB solüsyonundan 10 µl çekilerek kuyucuklardaki toplam hacim 100 µl olacak şekilde üzerlerine eklenir ve 96 kuyucuklu tabaka karıştırılır. 1 saat oda sıcaklığında ışıktan uzak olarak inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 460 nm filtreli flourometrede okuma yapılır. Sonuçlar GSH Standartına göre değerlendirilir.

- **GSH standart hazırlama**

15 mg Glutasyon pozitif kontrol tartılıp 1 ml 1x PBS ile çözdürülür (50mM). Bu stok madde standart eğriyi elde etmek için hemen kullanılır. 1x PBS kullanılarak 200 µM ve 8 mM konsantrasyon aralığında GSH solüsyonununun dilüsyon serileri yapılır. Her dilüsyon serisinden 10 µl 96 kuyucuklu tabakaya transfer edilir. Üzerlerine 80 µl 1x hücre lizis tamponu ve 10 µl hazırlanan MCB solüsyonundan eklenerek kuyucuklar karıştırılır. 1 saat oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edilir. 460 nm filtrelili fluorometrede okuma yapılır.



Grafik 20: GSH standart grafiği

3.2.9. İstatistiksel analiz

Tüm absorbans sonuçları, SPSS 20 (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında ve GraphPad Prism 5 programı için ortalama ± S.D olarak hesaplanmıştır. Grupların karşılaştırılmasında istatistiksel farklılıklar tek yönlü (ANOVA) varyans analizi, çoklu karşılaştırmalarda ise LSD testi kullanılmıştır. Grafiklerin

oluşturulmasında GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ istatistiksel fark yok, $p<0.05^*$ istatistiksel fark var olarak değerlendirilmiştir.

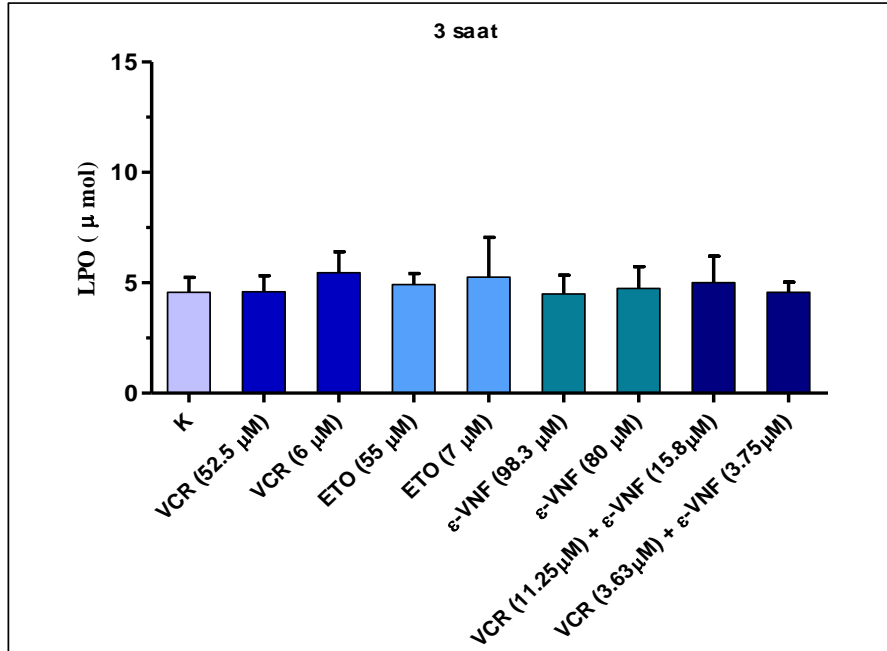
4. BULGULAR

4.1. Lipid Peroksidasyon (LPO) Düzeyleri

4.1.1. ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde LPO düzeylerine doğrudan etkileri (n= 6, ortalama \pm SD)

Farklı konsantrasyonlarda ki ϵ -viniferin, vinkristin sülfat ve kombine uygulama ile 3, 6 ve 24 saat inkübasyona tabi tutulan HepG2 hücrelerinin lipid peroksidasyon düzeyleri 'Cayman's Lipid Hidroperoksit Deney Kit'i kullanılarak ölçülmüştür.

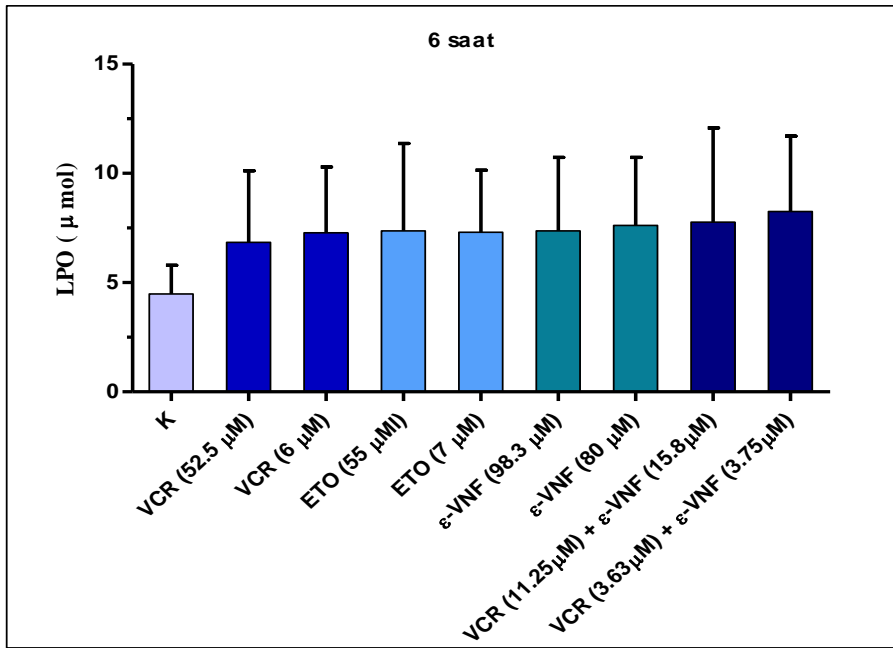
4.1.1.1. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 3 saatlik etkileri



Grafik 1: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muamelelerinin LPO değerleri (μ mol).

HepG2 hücrelerinin vinkristin sülfat, ϵ -viniferin maddelerinin ve kombine uygulamalarının düşük ve yüksek dozları ile 3 saatlik inkübasyonu sonrasında hücrelerin LPO seviyelerinde K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Grafik 1). Yaygın kullanılan bir kemoterapötik madde olan Etoposid, bütün deney aşamalarında ayrı bir kemoterapötik madde olan vinkristin sülfat için kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 3 saatlik ölçümün, LPO standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 1’ de, sayısal değerleri Ek-1’ de Tablo 2’ de gösterilmiştir.

4.1.1.2. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 6 saatlik etkileri

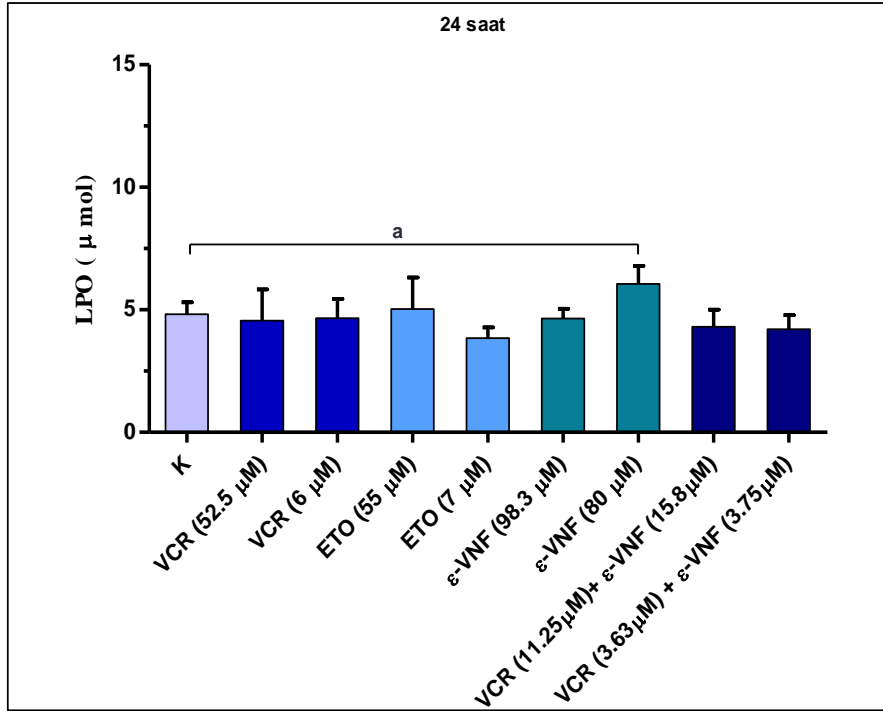


Grafik 2: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muamelelerinin LPO değerleri (μmol).

İnkübasyon süresinin iki katına çıkarılması ile HepG2 hücrelerinin LPO seviyeleri K grubuna göre artış göstermiştir. Ancak bu artış, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gibi doza-bağımsız olarak gerçekleşmiştir ($p>0.05$). 6 saatlik ölçümün LPO standart

eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 2’ de, sayısal değerleri Ek-1’ de Tablo 2’ de gösterilmiştir.

4.1.1.3. Maddelerin LPO düzeylerine karşı 24 saatlik etkileri



Grafik 3: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı muamelelerinin LPO değerleri (µmol).

a, $p < 0.05$ kontrole göre ε-VNF (80µM)

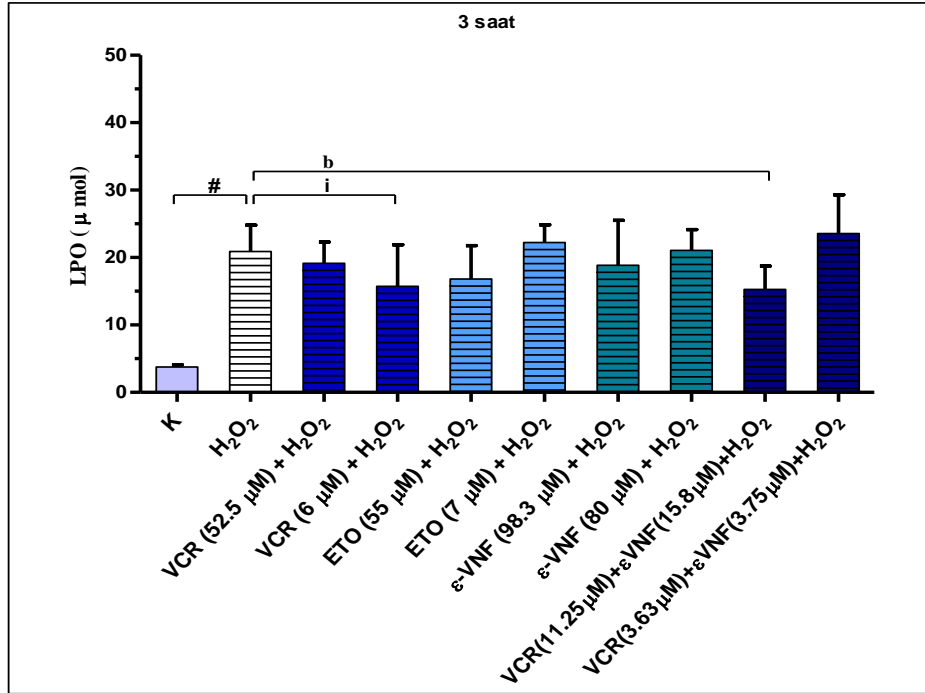
24 saatlik madde inkübasyonlarına bakıldığında, dVNF grubunda LPO seviyesi K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$). 24 saatlik ölçümün LPO standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 3’ te, sayısal değerleri Ek-1’ de Tablo 2’ de gösterilmiştir.

3, 6 ve 24 saatlik inkübasyon sürelerinde d(VCR+VNF) ve y(VCR+VNF) grupları dVCR ve yVCR gruplarıyla hemen hemen aynı LPO değerlerini göstermiştir ancak sonuçlar istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0.05$) (Ek-1’ de Tablo 2).

4.1.2. HepG2 hücrelerinde, ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H_2O_2 ile indüklenen LPO düzeylerine karşı koruyucu etkisi ($n= 6$, ortalama \pm SD)

Vinkristin sülfat, ϵ -viniferin maddelerinin ve bu iki maddenin kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde farmakolojik olarak oluşturulmuş oksidatif stres ortamındaki LPO düzeylerine olan koruyucu etkileri ‘Cayman’s Lipid Hidroperoksit Deney Kit’i kullanılarak ölçülmüştür.

4.1.2.1. Maddelerin H_2O_2 ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 3 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 4: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen LPO değerleri (μ mol).

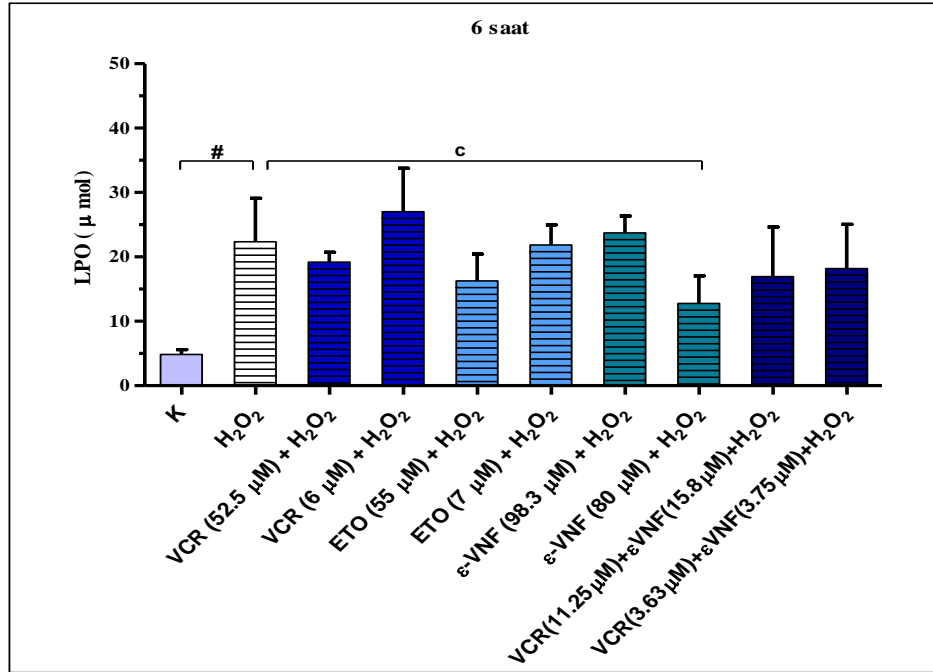
#, $p < 0.05$ kontrole göre H_2O_2

b, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR(11.25 μ M) + ϵ -VNF (15.8 μ M) + H_2O_2

i, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR (6 μ M) + H_2O_2

H₂O₂-K grubu, K grubuna göre LPO düzeyini 4,5 kat anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). Yüksek doz madde uygulanan yVCR ve yVNF gruplarında H₂O₂-indüklü lipid peroksidasyonuna karşı anlamlı bir koruyucu etki gözlenmezken, y(VCR+VNF) grubunun LPO düzeyinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p<0,05). Düşük dozlarda maddeler ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinin LPO seviyeleri H₂O₂ varlığında incelendiğinde, dVCR grubu LPO artışını anlamlı olarak engellemiştir (p<0,05). dVNF grubu H₂O₂-K grubuna göre herhangi bir koruyucu etki göstermemiştir (p>0,05). d(VCR+VNF) grubu ise dVCR grubuna göre LPO'yu arttırırken (p<0,05), H₂O₂-K grubuna göre anlamlı bir fark yaratmamıştır (p>0,05). 3 saatlik ölçümün, LPO standart eğrisinden elde edilen sonuçları Grafik 4' te, sayısal değerleri Ek-1' de Tablo 2' de gösterilmiştir.

4.1.2.2. Maddelerin H₂O₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 6 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 5: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H₂O₂ ile indüklenen LPO değerleri (µmol).

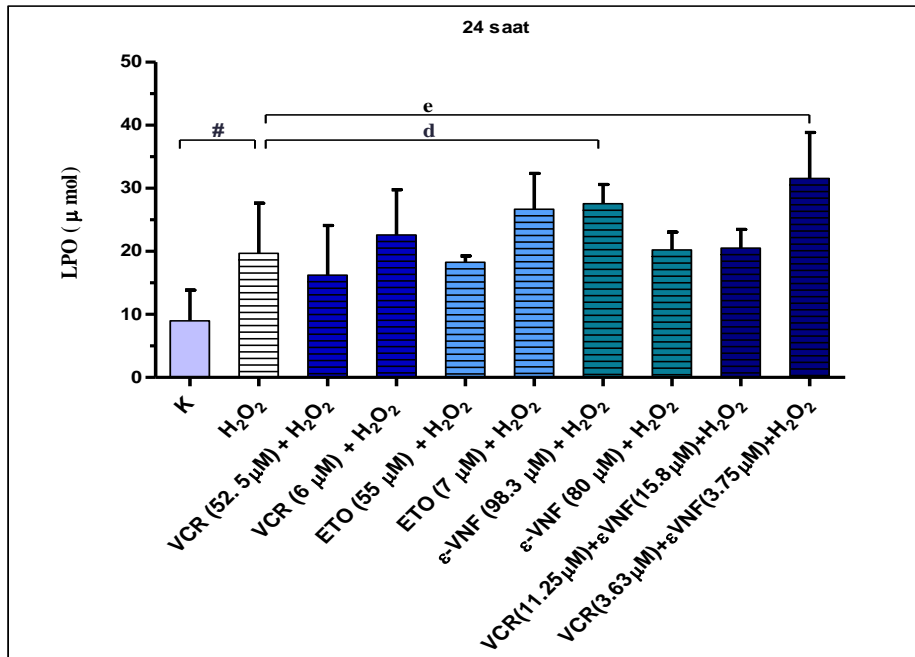
#, p < 0,05 kontrole karşı

c, p < 0,05 H₂O₂ ye göre ε-VNF (80 µM) + H₂O₂

İnkübasyon süresi iki katına çıkarıldığında; H₂O₂-K grubu K grubu ile karşılaştırıldığında, hücrelerin 1 saatlik H₂O₂ ile inkübasyonu LPO düzeyini yaklaşık 3,6 kat anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). yVNF grubu H₂O₂ ile indüklenen LPO artışına anlamlı bir koruyucu etki göstermezken (p>0,05), dVNF grubu H₂O₂ ile indüklenen LPO'yu H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak engellemiştir (p<0,05). yVCR grubu ile y(VCR+VNF) grubu H₂O₂ ile indüklenen LPO artışını H₂O₂-K grubuna göre engellenmiştir ancak değerlerde istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (p>0,05).

dVCR grubu H₂O₂ ile indüklenen H₂O₂-K grubuna göre LPO değerinde koruyucu bir etki göstermezken, ε-viniferin ile kombine uygulandığında (d(VCR+VNF)) dVCR gruba göre LPO'yu anlamlı olarak engellemiştir (p<0,05). 6 saatlik ölçümün, LPO standart eğrisinden elde edilen sonuçları Grafik 5' de, sayısal değerleri Ek-1' de Tablo 2' de gösterilmiştir.

4.1.2.3. Maddelerin H₂O₂ ile indüklenen LPO düzeylerine karşı 24 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 6: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H₂O₂ ile indüklenen LPO değerleri (µmol).

#, $p < 0,05$ kontrole karşı H_2O_2

d, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (98.3 μ M)+ H_2O_2 ;

e, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR (3.63 μ M) + ϵ -VNF (3.75 μ M) + H_2O_2

HepG2 hücrelerinde dışarıdan oluşturulmuş oksidatif stres ortamına karşı maddelerin hücrel LPO değişikliğine olan 24 saatlik koruyucu etkilerini incelemek için kurulan H_2O_2 -K grubunda LPO değeri K grubuna göre 1,2 kat anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.05$). ϵ -VNF grubu lipid peroksidasyonunu H_2O_2 -K grubuna göre anlamlı olarak daha da indüklenmiştir ($p < 0.05$). ϵ (VCR+VNF) grubu H_2O_2 -K gruba göre lipid peroksidasyonunda herhangi bir koruyucu etki göstermemiştir ($p > 0.05$).

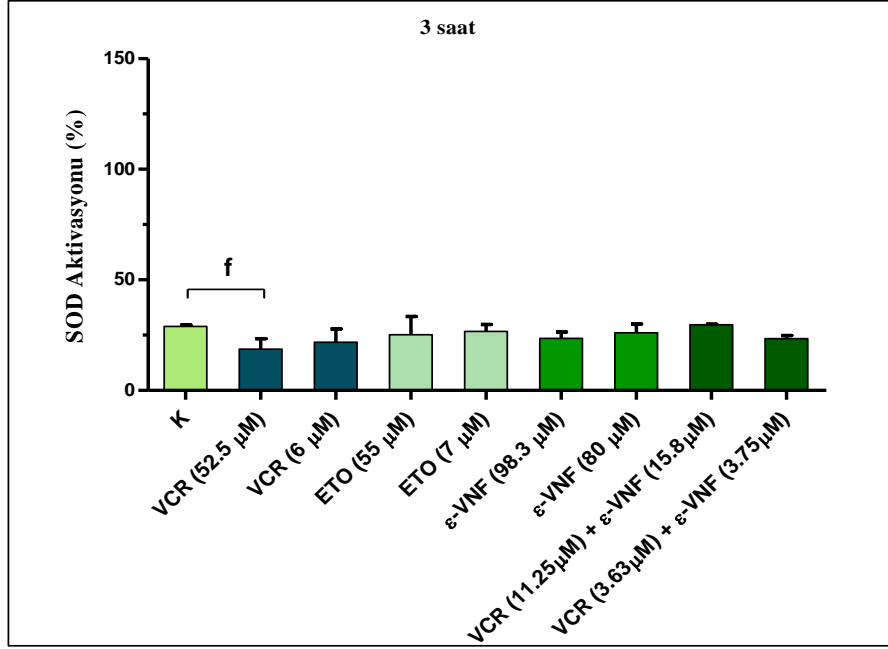
Düşük doz uygulamalarda, dVCR ve dVNF grupları 24 saatlik inkübasyonda H_2O_2 -K grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermezken, bu iki maddenin kombinesi ile oluşturulan d(VCR+VNF) grubu H_2O_2 -K gruba göre LPO'yu yaklaşık 0,6 kat artırıcı etki göstermiştir ($p < 0.05$). 24 saatlik ölçümün, LPO standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 6'da, sayısal değerleri de Ek-1' de Tablo 2'de gösterilmiştir.

4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivasyonu

4.2.1. ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde SOD düzeylerine doğrudan etkileri ($n = 2$, ortalama \pm SD)

Vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve bu iki maddenin kombinesinin HepG2 hücrelerinde SOD aktivasyonuna olan doğrudan etkileri 'Süperoksit Dismutaz Aktivite Deney Kit'i kullanılarak ölçülmüştür.

4.2.1.1. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 3 saatlik etkileri

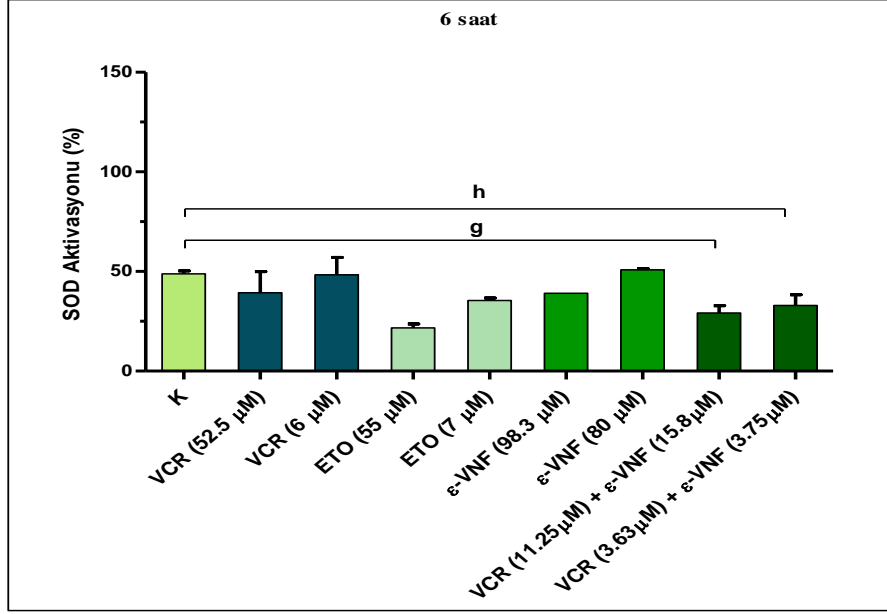


Grafik 7: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu sonuçları (%)

f, $p < 0,05$ kontrole göre VCR (52.5 µM)

3 saatlik inkübasyonda, yVCR grubu ve yVNF grubu hücrel SOD aktivasyonunu K grubuna göre azaltmıştır ancak bu iki gruptan yalnızca yVCR grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık gözlemiştir ($p < 0.05$). y(VCR+VNF) grubunun uygulandığı hücre hattında SOD aktivasyonu K gruba göre herhangi bir anlamlılık göstermemiştir ($p > 0.05$), ancak y(VCR+VNF) grubunun yüksek doz maddeler ile muamele edilen diğer gruplara göre hücrel SOD aktivasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Bu artış yalnızca yVCR grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık göstermiştir ($p < 0.05$). Düşük doz madde uygulamalarında SOD aktivasyonu kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). 3 saatlik ölçümün 490 nm’deki absorpsiyon değerlerinin SOD aktivasyonu (%) eşitliğindeki sonuçları Grafik 7’de, sayısal verileri Ek-2’de Tablo 3’te gösterilmiştir.

4.2.1.2. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 6 saatlik etkileri



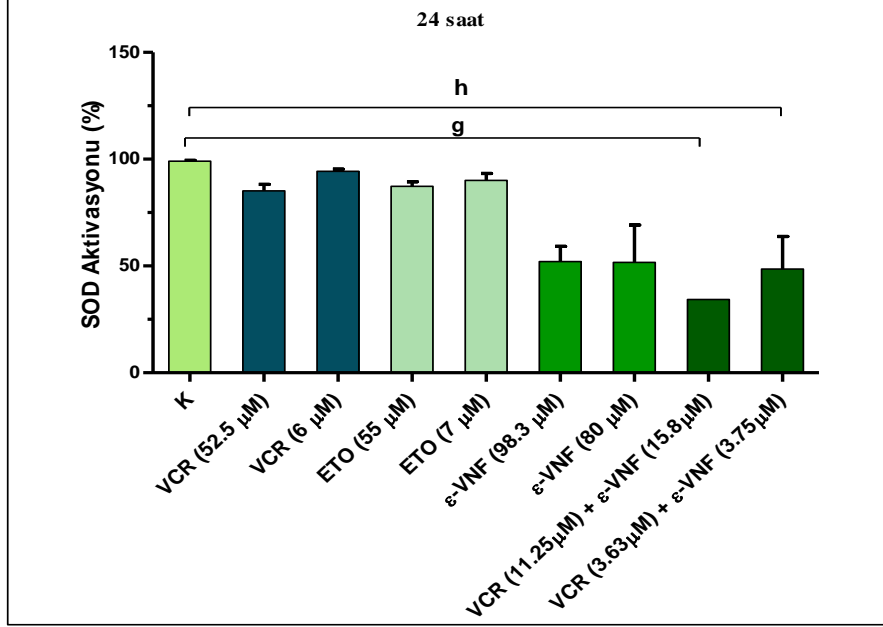
Grafik 8: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu (%) sonuçları

g, $p < 0,05$ Kontrolle göre VCR (11.25 µM) + ε-VNF (15.8 µM)

h, $p < 0,05$ Kontrolle göre VCR (3.63 µM) + ε-VNF (3.75 µM)

İnkübasyon süresi iki katına çıkarıldığında; yVCR ve yVNF grupları 3 saatlik inkübasyonlarına paralel etki göstererek SOD aktivasyonunu K grubuna göre azaltmıştır ancak değerlerde anlamlılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). y(VCR+VNF) grubu 6 saatlik inkübasyonda SOD aktivasyonu K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). dVCR ve dVNF grupları K grubuna göre SOD aktivasyonunda anlamlı bir değişiklik göstermezken, d(VCR+VNF) grubu SOD aktivasyonunu K grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0,05$). 6 saatlik ölçümün 490 nm' deki absorbans değerlerinin SOD aktivasyon (%) eşitliğindeki sonuçları Grafik 8' de, sayısal verileri Ek-2' de Tablo 3' te gösterilmiştir.

4.2.1.3. Maddelerin SOD aktivasyonuna karşı 24 saatlik etkileri



Grafik 9: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı muamelelerinin SOD Aktivasyonu (%) sonuçları

g, $p < 0,05$ Kontrole göre VCR (11.25 µM) + ε-VNF (15.8 µM)

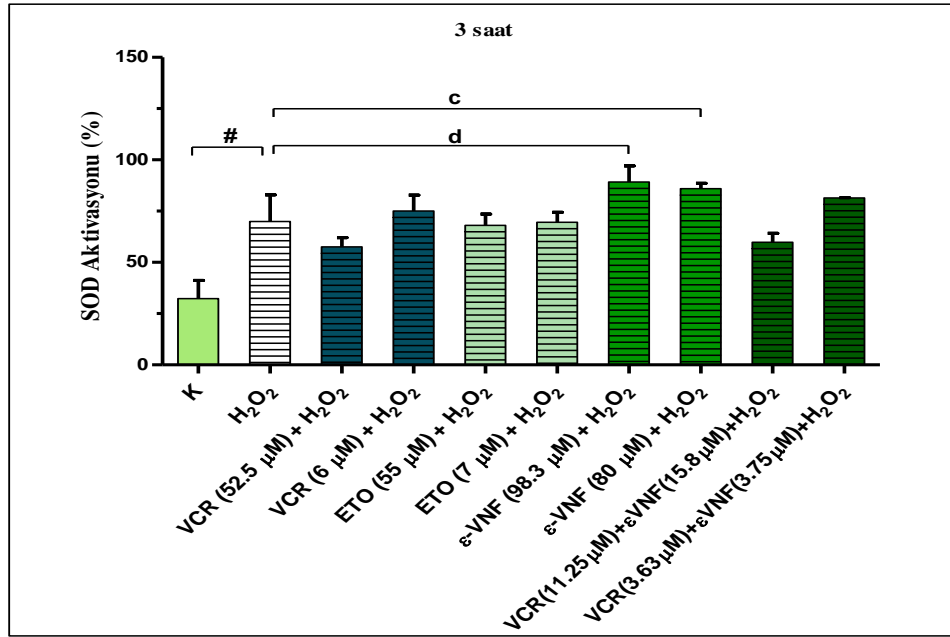
h, $p < 0,05$ Kontrole göre VCR (3.63 µM) + ε-VNF (3.75 µM)

24 saatlik inkübasyonda yVCR grubu K grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermezken, yVNF grubu K grubuna göre SOD aktivasyonunu yarı yarıya azaltarak istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermiştir ($p < 0.05$). y(VCR+VNF) grubu yVNF grubuna paralel bir etki göstererek SOD aktivasyonunu anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0.05$). Maddelerin düşük doz uygulamalarının sonuçları yüksek doz uygulama sonuçları ile paralellik göstermiştir. dVNF grubu ve d(VCR+VNF) grubu K grubu ile mukayese edildiğinde SOD aktivasyonu anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). 24 saatlik ölçümün 490 nm' deki absorbans değerlerinin SOD aktivasyon (%) eşitliğindeki sonuçları Grafik 9' da, sayısal verileri de Ek-2' de Tablo 3' te gösterilmiştir.

4.2.2. HepG2 hücrelerinde, ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu etkileri (n= 2, ortalama \pm SD)

H_2O_2 ile indüklenmiş HepG2 hücrelerinde ki SOD aktivasyonuna karşı vinkristin sülfatın, ϵ -viniferinin ve kombine uygulamanın koruyucu etkilerine bakmak için ‘Süperoksit Dismutaz Aktivite Deney Kit’ i kullanılmıştır.

4.2.2.1. Maddelerin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı 3 saatlik koruyucu etkileri



Grafik10: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 3 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)

#, $p < 0.05$ kontrole karşı H_2O_2

c, $p < 0.05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (80 μ M) + H_2O_2

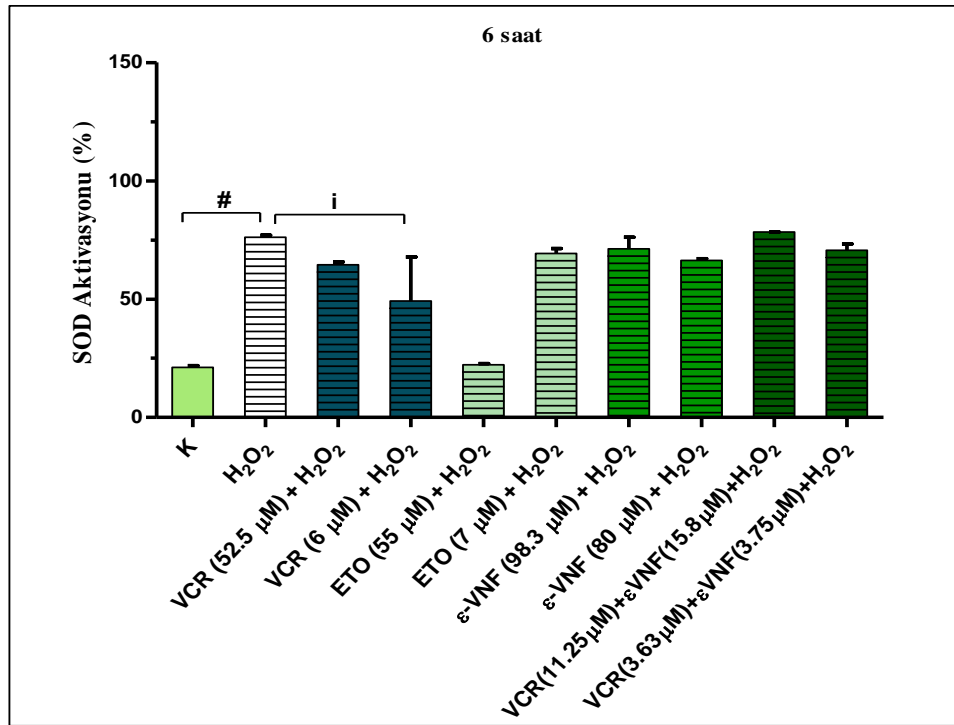
d, $p < 0.05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (98.3 μ M) + H_2O_2

H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonunda vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin düşük ve yüksek dozda ki 3 saatlik koruyucu etkilerini incelediğimizde; H_2O_2 -K grubunda SOD aktivasyonu K grubuna göre yaklaşık 1,2 kat anlamlı olarak

artmıştır ($p < 0,05$). γ VNF grubu H_2O_2 -K grubuna göre SOD aktivasyonunu anlamlı olarak daha da arttırmıştır ($p < 0,05$). γ (VCR+VNF) grubu ise H_2O_2 -K grubuna göre SOD aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaltıcı bir etki göstermiştir ($p > 0,05$).

Maddelerin ayrı ayrı ve kombine olarak düşük doz uygulamalarında SOD aktivasyonunun H_2O_2 -K grubuna göre arttığı gözlenmiştir ancak yalnızca δ VNF grubunda istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Grafik 10). 3 saatlik ölçümün 490 nm' deki absorbans değerlerinin SOD aktivasyon (%) eşitliğindeki sonuçlarının sayısal verileri Ek-2' de Tablo 3' te gösterilmiştir.

4.2.2.2. Maddelerin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı 6 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 11: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombine uygulamanın 6 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)

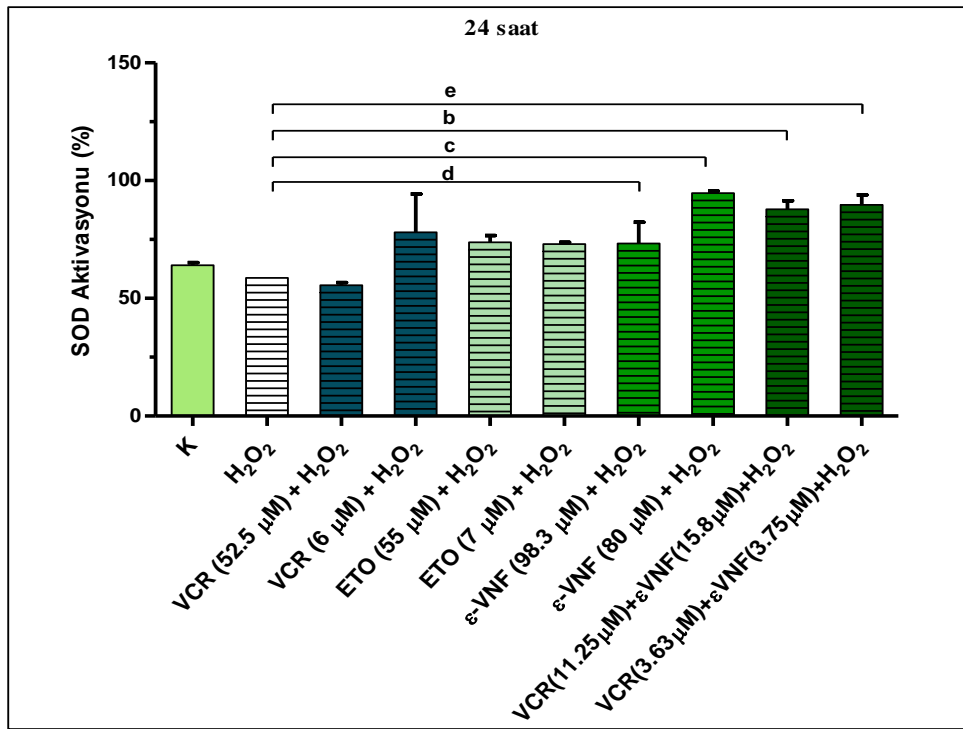
#, $p < 0,05$ kontrole karşı H_2O_2

i, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR (6 μ M) + H_2O_2

H₂O₂-K grubunda SOD aktivasyonunun K grubuna göre yaklaşık 2,6 kat anlamlı olarak arttığı gözlemiştir (p<0,05). İnkübasyon süresini iki katına çıkarttığımızda, yVCR grubu SOD aktivasyonunu baskılayıcı etki göstermiştir ancak değer istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır (p>0,05). yVNF grubu ve d(VCR+VNF) grubu SOD aktivasyonu için herhangi bir koruyucu etki göstermemiştir (p>0,05).

dVCR ve dVNF gruplarında SOD aktivasyonunu H₂O₂-K grubuna göre azalmıştır ancak yalnızca dVCR grubunda istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir (p<0,05). d(VCR+VNF) grubu H₂O₂-K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir (p>0,05). 6 saatlik ölçümün 490 nm’deki absorban değerlerinin SOD aktivasyon (%) eşitliğindeki sonuçları Grafik 11’de, sayısal verileri Ek-2’de Tablo 3’te gösterilmiştir.

4.2.2.3. Maddelerin H₂O₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı 24 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 12: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın 24 saatlik doza bağımlı muamelelerinin H₂O₂ ile indüklenen SOD aktivasyonuna karşı koruyucu değerleri (%)

- b**, $p < 0,05$ H₂O₂'ye göre VCR(11,25 µM) + ε-VNF (15,8 µM) + H₂O₂
c, $p < 0,05$ H₂O₂ 'ye göre ε-VNF (80µM)+ H₂O₂
d, $p < 0,05$ H₂O₂ 'ye göre ε-VNF (98.3 µM) + H₂O₂
e, $p < 0,05$ H₂O₂ 'ye göre VCR (3,63 µM) + ε-VNF (3,75 µM)+ H₂O₂

24 saatlik uygulamalar için kurulan deneyde, H₂O₂-K grubu olması planlanan hücre grubunun 500 µM H₂O₂ ile 1 saat 37 °C' de inkübasyonu SOD aktivasyonunu K grubuna göre arttırmıştır ancak değer istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$). 24 saatlik çalışmada, düşük ve yüksek dozlarda VCR ile ön muamele H₂O₂-K grubuna göre SOD aktivasyonunu anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0,05$).

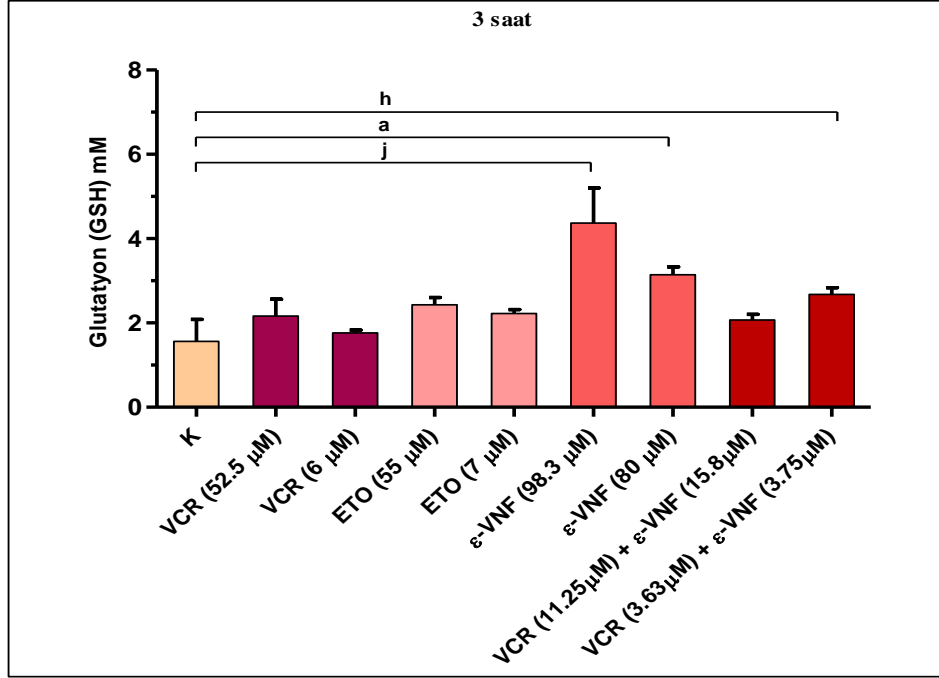
yVNF grubu yalnızca K grubuna göre SOD aktivasyonunu anlamlı olarak arttırırken ($p < 0,05$), dVNF grubu hem K grubuna göre hem de H₂O₂-K grubuna göre SOD aktivasyonunu anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). Bu iki maddenin kombine uygulaması ise hem yüksek hem de düşük dozlarda dVNF grubu ile paralellik göstererek SOD aktivasyonunu iki kontrol grubuna göre de anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). 24 saatlik ölçümün 490 nm' deki absorbans değerlerinin SOD aktivasyon (%) eşitliğindeki sonuçları Grafik 12' de, sayısal verileri Ek-2' de Tablo 3' te gösterilmiştir.

4.3. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Düzeyleri

4.3.1. Vinkristin sülfat, ε-viniferin maddelerinin ayrı ayrı ve kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde intraselüler GSH düzeylerine doğrudan etkileri (n= 3, ortalama ± SD)

Vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombine uygulamanın HepG2 hücrelerindeki intraselüler GSH düzeylerine doğrudan etkileri 'The Chemicon Glutatyon Ölçüm Kit'i kullanılarak ölçülmüştür.

4.3.1.1. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 3 saatlik etkileri



Grafik 13: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombinenin 3 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM).

a, $p < 0.05$ Kontrole göre ε-VNF (80µM)

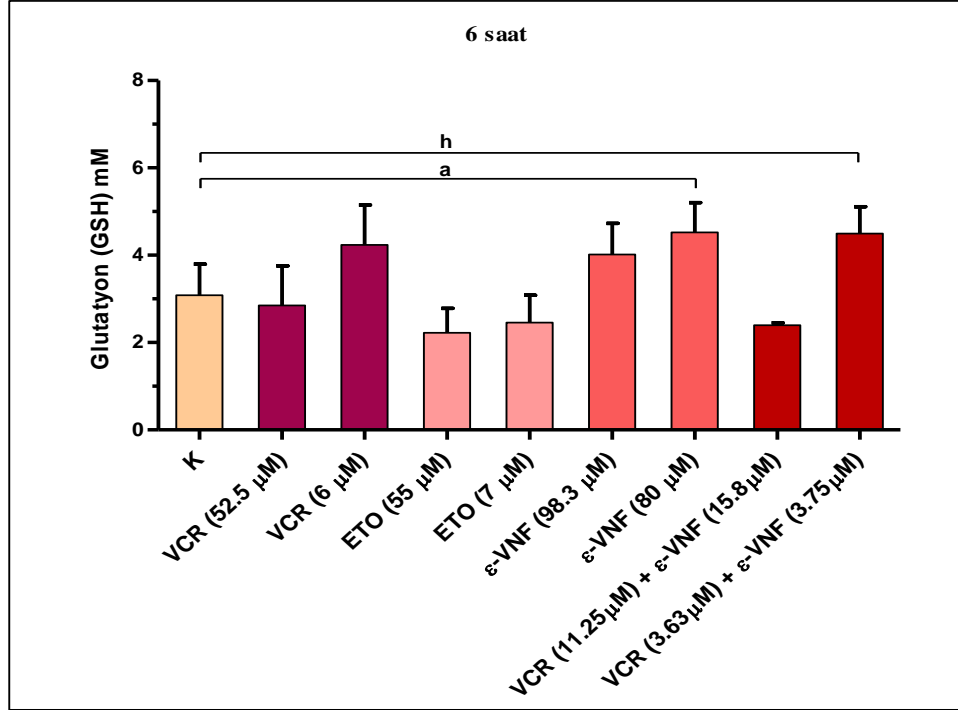
h, $p < 0,05$ Kontrole göre VCR (3.63 µM) + ε-VNF (3.75 µM)

j, $p < 0,05$ Kontrole göre ε-VNF (98.3 µM)

yVCR grubu 3 saatlik inkübasyonda K gruba göre intraselüler GSH düzeyinde anlamlı bir değişiklik göstermezken ($p > 0,05$), yVNF grubu GSH düzeyini 1,8 kat anlamlı olarak artırmıştır ($p < 0,05$). y(VCR+VNF) grubu ise bu iki maddenin tek başlarına uygulandıkları yVCR ve yVNF gruplarına göre GSH düzeyini azaltmıştır ancak bu azalış yalnızca yVNF grubuna göre anlamlılık yaratmıştır ($p < 0,05$).

dVCR grubu GSH düzeyi K grubuna göre herhangi bir değişiklik yaratmazken, dVNF grubu GSH düzeyini K grubuna göre 1,1 kat anlamlı olarak artırmıştır ($p < 0,05$). d(VCR+VNF) grubu GSH düzeyini K grubuna göre anlamlı olarak artırmıştır ($p < 0,05$). 3 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 13' te, sayısal değerleri Ek-3' te Tablo 4' te gösterilmiştir.

4.3.1.2. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 6 saatlik etkileri



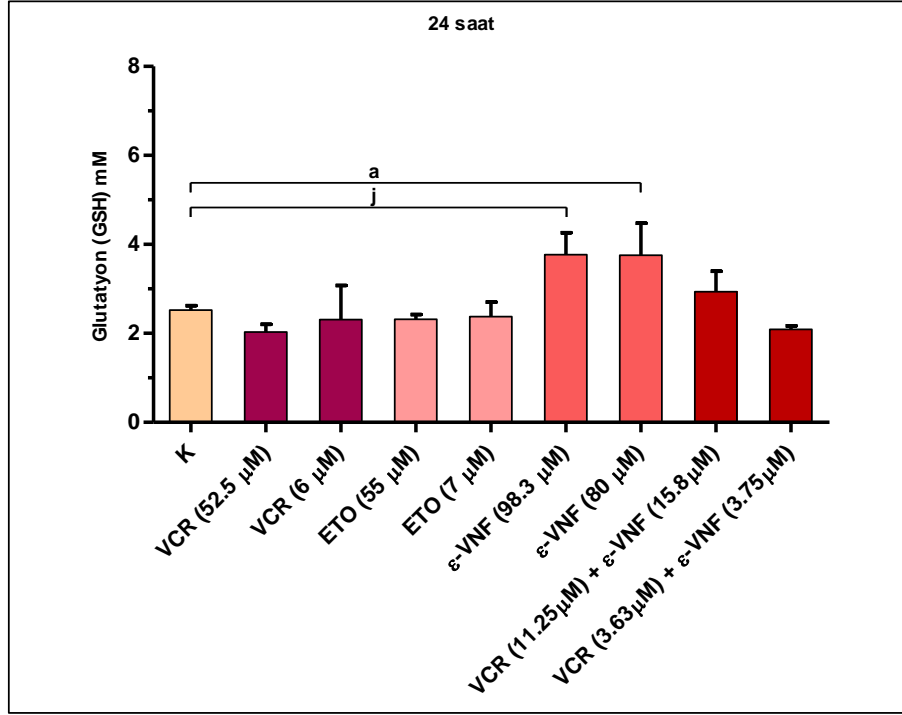
Grafik 14: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombinenin 6 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM).

a, $p < 0,05$ Kontrole göre ε-VNF (80µM)

h, $p < 0,05$ Kontrole göre VCR (3.63 µM) + ε-VNF (3.75 µM)

yVCR grubu 6 saatlik inkübasyonda intraselüler GSH düzeyinde anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0,05$). dVCR, dVNF ve yVNF grupları K grubuna göre hücrel GSH düzeyini arttırıcı etki göstermiştir ancak yalnızca dVNF grubunda ki artış K grubuna göre istatistiksel anlamlılık taşımaktadır ($p < 0,05$). y(VCR+VNF) grubu GSH düzeyini hem yVCR hem de yVNF grubuna göre azaltmıştır, bu azalış yVNF grubuna göre anlamlı olmasına rağmen ($p < 0,05$) K grubuna ve yVCR grubuna göre anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$). d(VCR+VNF) grubu dVNF grubu ile paralellik göstererek GSH düzeyini K grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). 6 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 14' te, sayısal değerleri Ek-3' te Tablo 4' te gösterilmiştir.

4.3.1.3. Maddelerin intraselüler GSH düzeylerine karşı 24 saatlik etkileri



Grafik 15: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombininin 24 saatlik doza bağımlı uygulamalarının intraselüler GSH düzeyine karşı doğrudan etkileri (mM).

a, $p < 0.05$ Kontrole göre ε-VNF (80µM)

j, $p < 0,05$ Kontrole göre ε-VNF (98.3 µM)

HepG2 hücrelerini maddeler ile 24 saat inkübe edildiğinde K grubuna göre kemoterapötik madde gruplarının GSH düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0,05$). 24 saatlik inkübasyonda K grubuna göre dVNF ve yVNF grupları birbiri ile aynı etkiyi göstererek GSH düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). y(VCR+VNF) grubu K grubuna göre GSH düzeyini arttırmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$). y(VCR+VNF) grubu yVCR grubu ile mukayese edildiğinde ise GSH düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$).

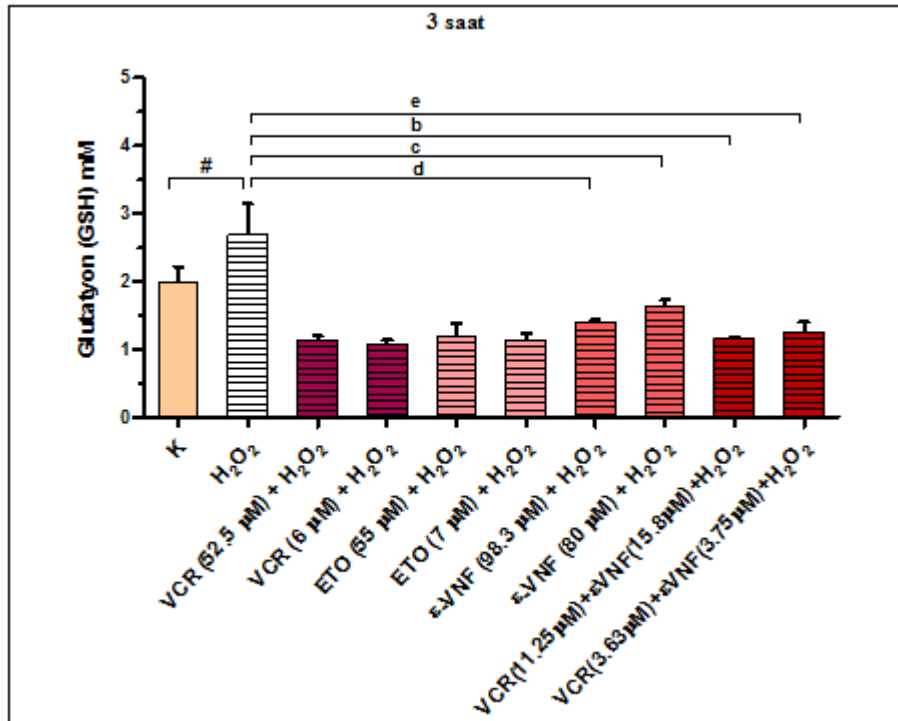
d(VCR+VNF) grubu yVCR grubu ile hemen hemen aynı etkiyi göstererek hücrel GSH düzeyini K grubuna göre azaltmıştır ancak değerler istatistiksel olarak anlamlılık taşımamaktadır ($p > 0,05$). 24 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde

edilen deney sonuçları Grafik 15’ de, sayısal değerleri Ek-3’ te Tablo 4’ te gösterilmiştir.

4.3.2. HepG2 hücrelerinde, ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının H_2O_2 ile indüklenen GSH düzeylerine karşı koruyucu etkileri (n= 3, ortalama \pm SD)

Farmakolojik olarak yaratılmış oksidatif strese maruz kalan HepG2 hücrelerinde ki GSH düzeylerine karşı vinkristin sülfat, ϵ -viniferin maddelerinin ve kombine uygulamanın intraselüler koruyucu etkileri ‘The Chemicon Glutatyon Ölçüm Kit’ i kullanılarak ölçülmüştür.

4.3.2.1. Maddelerin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 3 saatlik koruyucu etkileri



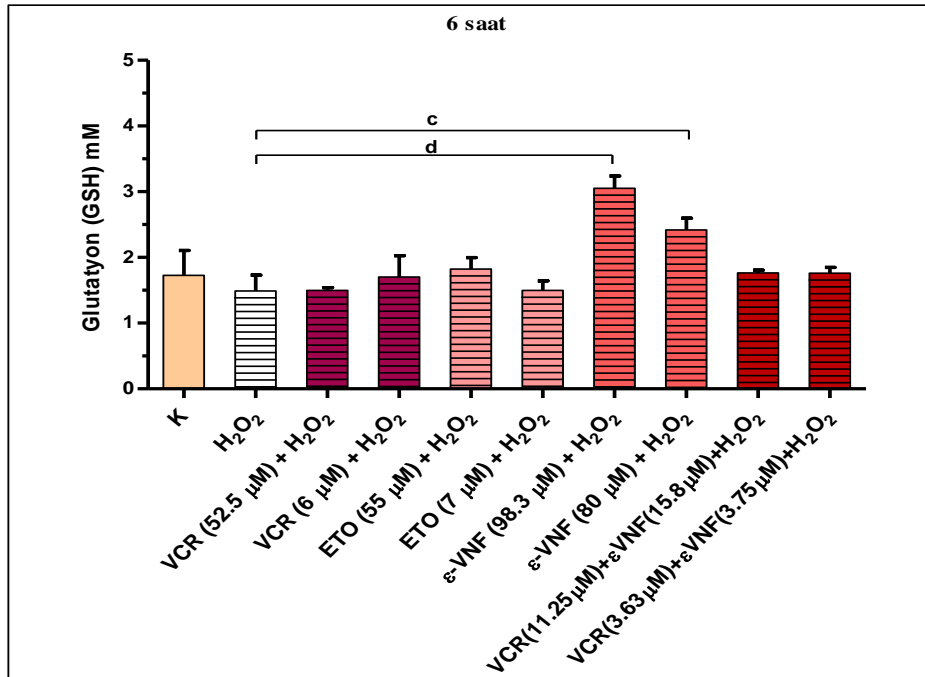
Grafik 16: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinelerinin 3 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM).

#, p < 0.05 kontrole karşı H_2O_2

- b**, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR(11,25 μ M) + ϵ -VNF (15,8 μ M) + H_2O_2
c, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (80 μ M) + H_2O_2
d, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (98,3 μ M) + H_2O_2
e, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre VCR (3.63 μ M) + ϵ -VNF (3.75 μ M) + H_2O_2

3 saatlik uygulamada, HepG2 hücrelerinin 500 μ M H_2O_2 ile tek başına 1 saatlik inkübasyonu GSH düzeyini K grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). Bütün grupların yüksek ve düşük dozları H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeyini hem K grubuna göre hem de H_2O_2 -K grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0,05$). 3 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde edilen koruyucu deney sonuçları Grafik 16' da, sayısal değerleri Ek' te Tablo 4' te gösterilmiştir.

4.3.2.2. Maddelerin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 6 saatlik koruyucu etkileri

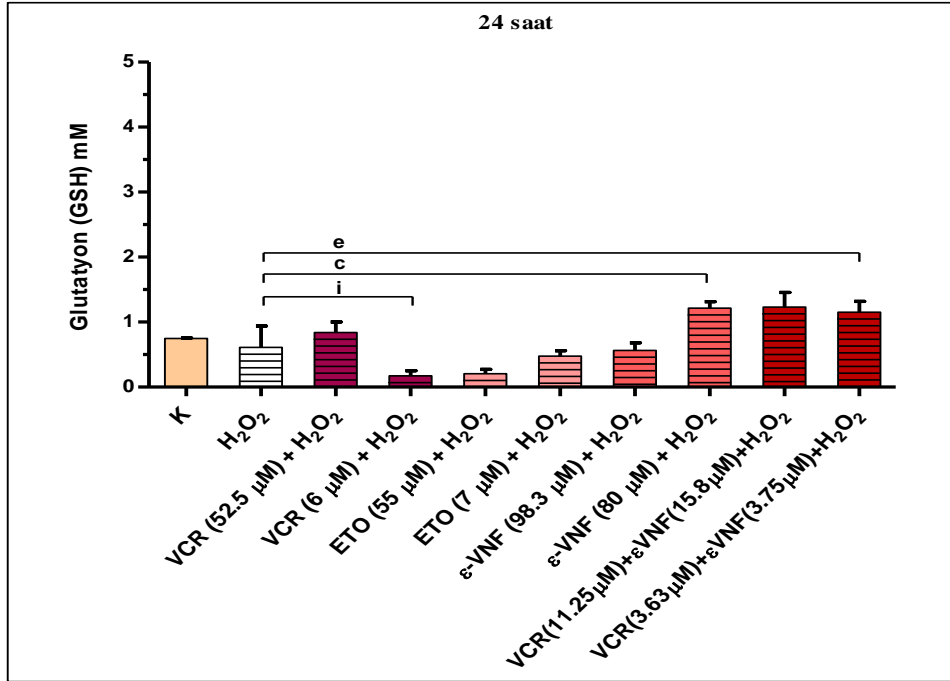


Grafik 17: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ϵ -viniferin ve kombinenin 6 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H_2O_2 ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM).

- c**, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (80 μ M) + H_2O_2
d, $p < 0,05$ H_2O_2 'ye göre ϵ -VNF (98.3 μ M) + H_2O_2

6 saatlik madde uygulamalarının sonuçlarını incelemek için kurulan kontrol gruplarına baktığımızda; H₂O₂-K grubunda GSH düzeyi K grubuna göre azalmıştır ancak istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (p>0,05). K grubuna göre dVCR ve yVCR grupları GSH düzeyinde anlamlı bir fark yaratmazken, dVNF ve yVNF grupları intraselüler GSH düzeyini her iki kontrol grubuna göre de anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). d(VCR+VNF) ve y(VCR+VNF) grupları birbiri ile aynı etkiyi göstererek ε-viniferinin GSH düzeyini artırıcı etkisini kontrol gruplarına yakın değerlerde anlamlı olarak azaltmıştır (p<0,05). 6 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 17’ de, sayısal değerleri Ek-3’ te Tablo 4’ te gösterilmiştir.

4.3.2.3. Maddelerin H₂O₂ ile indüklenmiş intraselüler GSH düzeylerine karşı 24 saatlik koruyucu etkileri



Grafik 18: HepG2 hücre hattında vinkristin sülfat, ε-viniferin ve kombinenin 24 saatlik doza bağımlı ön muamelelerinin H₂O₂ ile indüklenmiş intraselüler GSH seviyelerine koruyucu etkileri (mM).

c, p < 0,05 H₂O₂ 'ye göre ε-VNF (80μM) + H₂O₂

e, p < 0,05 H₂O₂ 'ye göre VCR (3.63 μM) + ε-VNF (3.75 μM) + H₂O₂

i, p < 0,05 H₂O₂ 'ye göre VCR (6 μM) + H₂O₂

24 saatlik inkübasyon için kurduğumuz kontrol gruplarında; H₂O₂ ile indüklenmiş kontrol grubu K grubuna göre intraselüler GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır (p>0,05). yVCR ve yVNF grupları intraselüler GSH düzeyine karşı anlamlı bir etki göstermezken, y(VCR+VNF) grubu iki kontrol grubuna göre de GSH düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). dVCR grubu hem K grubuna göre hem de H₂O₂-K grubuna göre GSH düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır (p<0,05). dVNF grubu iki kontrol grubuna göre de GSH düzeyini arttırmıştır (p<0,05). d(VCR+VNF) grubu antioksidan madde olan ε-viniferin grupları gibi intraselüler GSH düzeyini her iki kontrol grubuna göre de anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). 24 saatlik ölçümün GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçları Grafik 18' de, sayısal değerleri Ek-3' te ki Tablo 4' te gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Primer karaciğer kanseri dünyadaki en yaygın 5. kanser olup yılda yaklaşık yarım milyon insanın ölümünden sorumlu olan bir kanser türüdür (32). Karaciğer hücrelerinden gelişen hepatoselüler karsinom (HSK) primer karaciğer kanserlerinin %85-90' ını oluşturmaktadır (140). HSK' nin tedavisinde cerrahi tedavi, bölgesel kanser tedavi, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmakla birlikte kesin bir tedavisi hala mevcut değildir (63). Kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyen ve sitotoksik etkiyle bu hücreleri öldüren kimyasal ajanlarla yapılan bir tedavi şeklidir (127). Bu nedenle sitotoksik veya antineoplastik olarak da adlandırılırlar. Çoğu kemoterapötik ajan güçlü hücrel sitotoksositeye ve yan etkilere sahip olduğundan neoplastik hücrelerle birlikte normal (transforme olmamış) hücrelere de zarar vermektedir. Kemoterapötik ajanlar ROT ve serbest radikal aracılı hücrel hasara neden olabilir bu da inflamatuvar ve fibrotik süreçlerle sonuçlanabilir (78). Bu nedenle, kemoterapötik ajanların bu etkilerini yok etmek ya da minimuma indirmek açısından geliştirilmesi gerekmektedir (120). Oksidatif stres aracılı hücrel hasarını önlemek için terapötik ajanlar olarak diyetel antioksidanlar önerilmektedir (119, 128). Diyet ile alınan antioksidanların tümör hücrelerinin boyutunu küçülttüğüne, normal hücrelerin bütünlüğünü devam ettirdiğine, oluşan hücrel hasarı tamir ettiğine ve serbest radikallerin etkisini ortadan kaldırdığına dair çalışmalar mevcuttur (11, 30, 39, 93, 111). Bu çalışmada kullanılan ϵ -viniferin diyet ile alınan antioksidanlara bir örnektir (11). Resveratrol dimeri olan ϵ -viniferin polifenolik yapıda bir bileşendir. Polifenoller pek çok mekanizma ile karsinogenezin bütün işlevlerini etkileyebilirler. Özellikle, oksidatif stres oluşumunu engelleyebilirler (100, 131) ve bu şekilde kanser gelişimini önleyebilmektedirler. Polifenoller kanser hücrelerinde oksidatif stresi düzenleyerek sinyal aktarımını, redox hassas transkripsiyon faktörleri, hücre proliferasyonu ve apoptozu etkileyen genlerin ekspresyonunu etkileyebilirler (102, 109). Ayrıca ksenobiyotiklerin bioparçalanmasıyla ilgili enzimleri aktive edebilirler (148). Bu gruptan olan resveratrolün anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-karsinojenik özellikler gösterdiği bilinirken (8, 9, 37, 77, 110, 120), dimeri olan ϵ -viniferinin bu özellikleri detaylı bir şekilde incelenmemiştir. Yapılan bir çalışmada ϵ -viniferinin lösemi B hücrelerinde hepatoprotektif, antioksidan ve apoptozu indükleyici

özellikleri gösterilirken (23), başka çalışmalarda insan hepatoma HepG2 (22) ve insan kolon kanseri hücrelerinde resveratrolün ϵ -viniferinide içeren dimerlerinin anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri gösterilmiştir (24). *In vivo* bir çalışmalarda, fareler üzerinde hepatik hasara karşı koruyucu özellik gösterdiği ve cisplatin ile indüklenmiş nefrotoksiteyi azalttığı bildirilmiştir (30). Oksidatif stres ile indüklenmiş *in vitro* insan kardiyomisitlerinde ve lens epital hücrelerinde ROT' u azalttığı gösterilmiştir (20, 133). Yapılan çalışmalarda, ϵ -viniferinin resveratrolde daha fazla antioksidan kapasitesi (101, 74) olduğuna dair ve bazı kanser hücresi çeşitlerinde resveratrolde daha fazla antiproliferatif (111) etkiler gösterdiğine dair de bulgular mevcuttur.

Çalışmamızda kemoterapötik ajan olarak vinkristin sülfat kullanılmıştır. Vinkristin sülfat mitotik içciklerin oluşumunu engelleyerek hücre döngüsünü G2/M fazında durdurur ve apoptozu uyarır (56, 103), bununla birlikte antioksidan olarak kullandığımız ϵ -viniferinin de hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (11, 66). Bu iki madde hücre döngüsüne aynı fazda etki ettiği için kombine olarak uygulanmaları, birbirlerinin etkilerini arttırabileceğini ve böylelikle antioksidan maddenin kemoterapötik ajanın dozunu azaltmaya yardım edebileceğini düşündürmüştür. Bu bağlamda çalışmamızda, ϵ -viniferin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulanarak oksidatif stres üzerinde ki etkileri incelenmiştir. ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombinesinin hücresel oksidatif stres üzerine etkisini inceleyebilmek için lipid peroksidasyon düzeyleri, SOD aktivasyon değerleri ve indirgenmiş glutatyon değerlerine bakılmıştır. Lipid peroksidasyonu, membrandaki doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile etkileşerek hücreye zarar verirler. Çeşitli patolojik durumlar sırasında birçok hücre tipinde O_2' nin redüksiyonundan oluşan türlerin üretimiyle oksidatif stres meydana gelir bunun sonucunda hücre yapısında ki lipidler de bozulma olur (90). Aerobik hücreler reaktif oksijen türlerini kontrol altına almak için kendi savunma sistemlerini geliştirmişlerdir (81). Antioksidanlar makromoleküllerde ki oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren enzimatik veya non-enzimatik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidan bileşiklerden olan

SOD süperoksit anyonlarını hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin hücrelerdeki toksik etkilerini azaltır (7). Hücrede enzimatik olmayan temel antioksidan savunması olan GSH ise farklı peroksitleri, hidroperoksitleri ve radikalleri indirger. GSH'ın hücrede azalımı intraselüler oksidasyonu yansıtır bununla birlikte GSH konsantrasyonunda ki artış hücrenin olası bir oksidatif hasara karşı hazırlanıyor olabileceğinin göstergesi olabilir (3, 105, 112).

Çalışmanın birinci aşamasında; 3 saatlik inkübasyon süresinde ϵ -viniferinin, vinkristin sülfatın ve kombinenin HepG2 hücrelerinde doğrudan etkilerine bakıldığında, düşük ve yüksek doz VCR, VNF, (VCR+VNF) gruplarının hücreSEL LPO düzeyleri K grubuna göre herhangi bir değişiklik göstermemiştir ($p>0,05$), İnkübasyon süresini iki katına çıkarıldığında, antioksidan uyguladığımız yVNF ve dVNF grupları LPO miktarını arttırarak pro-oksidan etki göstermiştir ancak değerler K grubuna göre anlamlılık taşımamaktadır ($p>0,05$). yVCR, dVCR, y(VCR+VNF) ve d(VCR+VNF) grupları VNF gruplarına paralel etki göstermiştir ($p>0,05$). İnkübasyon süresini uzattığımızda (24 saat) maddeler LPO düzeylerinde pro-oksidan etkilerini kaybetmelerine rağmen dVNF grubu bu etkisini hem K grubuna göre hem de diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak devam ettirmiştir ($p<0,05$). Daha önce yapılan çalışmalarda, HepG2 hücrelerinde ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının LPO üzerine etkileri incelenmemiştir. Bu bakımdan ϵ -viniferinin etkileri başka hücre hatları ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Filomeni ve arkadaşlarının (2007) MCF-7 insan meme kanser hücre dizisinde çalıştıkları 50 μ M resveratrol uygulamasının gösterdiği pro-oksidan etkinin çalışmamızda 24 saatlik inkübasyonda ϵ -viniferinin gösterdiği pro-oksidan etkisine benzediğini düşünmekteyiz (35).

Ayrıca Santandreu ve arkadaşlarının (2011) HT-29 ve SW-620 kolorektal kanser hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada, tümör tedavisinde kullanılan 5-Florourasil (5-FU), cDDP ve ETO maddelerini tek başlarına ve 5-FU + resveratrol, cDDP + resveratrol, ETO + resveratrol olarak kombine verdiklerinde her iki hücre hattında da kombine uygulamaların kontrole ve maddelerin tek başına uygulandığı gruplara göre

hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığını gözlemişlerdir. Çalışmada, biyolojik sistemde lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan aldehitlerden biri olan MDA düzeylerine baktıklarında her iki kanser hücresinde de 5-FU + resveratrol kombine uygulamasının tek başına 5-FU uygulanan gruba göre MDA düzeyini arttırdığını gözlemişlerdir. Bunu da kombine uygulama ile ROT' un intraselüler olarak daha fazla birikmesi ve hücrel lipid peroksid düzeylerinin daha da arttırarak bu kemoterapötik ajanın etkilerini daha da güçlendirdiğini savunarak açıklamışlardır (110). Çalışmamızda yVCR ve dVCR gruplarının sırasıyla y(VCR+VNF) ve d(VCR+VNF) grupları ile doz karşılaştırmasını yapıldığında kombine içeriğinde daha düşük dozlarda bulunan kemoterapötik ve antioksidan maddelerin 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarda VCR grupları ile hemen hemen aynı LPO sonuçlarını gösterdiğini gözlenmiştir. Bu bağlamda vinkristin sülfat ve ϵ -viniferin maddelerinin kombine uygulandığı zaman LPO üzerinde daha düşük dozlarda, yüksek doz vinkristin sülfat ile aynı etkiyi yaratabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda grupların toplam SOD aktivasyonuna olan doğrudan etkilerini incelediğimizde, 3 saatlik inkübasyonda yalnızca yVCR grubu K grubuna göre SOD aktivasyonunu azaltmıştır ($p<0.05$). İnkübasyon süresini uzattığımızda ise y(VCR+VNF) ve d(VCR+VNF) grupları K grubuna göre SOD aktivasyonunu 6 saatlik inkübasyonda sırasıyla 0,4; 0,3 kat ve 24 saatlik inkübasyonda sırasıyla 0,6; 0,5 kat anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0.05$). yVNF ve dVNF grupları 3 ve 6 saatlik inkübasyonlarda hücrel SOD aktivasyonunda K grubuna karşı anlamlı bir etki göstermezken, 24 saatlik inkübasyonda SOD aktivasyonunu K grubuna göre azaltmıştır ($p<0.05$). Farines ve arkadaşları (2004) yapı-aktivite çalışmalarında *trans*-resveratrolün *in vitro* olarak SOD' u inhibe ettiğini ve *trans*-resveratrolün antikarsinojenik özelliğinin SOD' a bağımlı olduğunu yorumlamışlardır. SOD inhibisyonu hücrel süperoksit radikallerinin birikmesine neden olur ki bu da serbest radikal hasarı ile kanser hücrelerinin apoptoza gitmesine yol açar. Ayrıca Farines ve arkadaşları stilben türevlerinde 4 ve/veya 4' karbon yapısında OH gruplarının varlığının SOD aktivasyonunun inhibisyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir (34). Lee ve arkadaşları (2002) normal karaciğer hücre dizisi 'Chang' ile insan hepatoma hücre dizisi 'HepG2'

de ki SOD ve katalaz enzimlerinin aktivasyonlarını karşılaştırmışlar ve HepG2 hücrelerinde bu enzim aktivasyonlarının 'Chang' hücresine göre sırasıyla 2,8 ve 4,3 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (76). Yine bir başka çalışmada, Hanif ve arkadaşları (2005) insan hepatoma hücre dizisi HepG2 hücrelerinin SOD aktivasyonunu normal insan karaciğer hücre dizisi WRL-68 ile karşılaştırdıklarında 2,0 kat daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir (55). İki çalışma da sonuç olarak bu yüksek antioksidan enzim değerlerinin metabolik yolda üretilen ROT' lara karşı kolaylıkla savunma yaparak HepG2 hücrelerini daha dirençli hale getirebileceğini ve bunun HepG2 hücre canlılığına yardım edebileceğini savunmuşlardır (55, 76). Bu bağlamda HepG2 hücrelerinde yapmış olduğumuz çalışmada ϵ -viniferinin 24 saatlik inkübasyon gruplarında SOD aktivasyonunu azaltmasını; resveratrol dimeri olarak 4'-OH yapısına sahip olmasından ileri geldiğini ve azalan SOD aktivasyonu ile HepG2 hücrelerinin serbest radikal hasarına uğrayacağını düşünmekteyiz. Aynı zamanda kombine grubun zamana bağımlı olarak (6 ve 24 saat) pro-oksidan etki ile SOD aktivasyonunu azaltmasının hücrel antioksidan savunma sisteminde ki dengeyi bozarak reaktif oksijen türlerine karşı hücreyi savunmasız bırakabileceğini ve ϵ -viniferinin göstermiş olduğu etki ile benzer etki gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın birinci aşamanın son kısmı olarak maddelerin hepatoma hücrelerindeki hücrel GSH seviyesine olan doğrudan etkilerini incelenmiştir. yVNF ve dVNF grupları, bütün zaman gruplarında hücrel GSH düzeyini K grubuna göre arttırmıştır ($p < 0,05$). Resveratrol ile HepG2 hücrelerinde daha önce yapılmış olan bir çalışmada (2002) resveratrolün GSH senteziyle ilgili olan γ -glutamil sistein sentaz enziminin ekspresyonunu arttırdığı dolayısı ile hücrel GSH düzeyini yükselttiği gözlenmiştir (114). Bu bağlamda biz de artan GSH düzeyinin resveratrol dimeri olan ϵ -viniferinin resveratrola benzer özellik göstererek γ -glutamil sistein sentaz enziminin ekspresyonunu arttırması ile alakalı olabileceğini düşünmekteyiz. dVCR ve yVCR gruplarında ise zamana bağımlı hiçbir grupta GSH düzeyleri K grubuna göre anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0,05$). Kombine gruplara baktığımızda; d(VCR+VNF) grubu 3 ve 6 saatlik inkübasyonda GSH düzeyini K grubuna göre arttırmıştır ($p < 0,05$), inkübasyon süresini uzattığımızda ise K grubuna göre herhangi bir etki göstermemiştir

($p > 0,05$). Ancak d(VCR+VNF) grubu dVCR ve dVNF gruplarına göre GSH düzeyi azaltmıştır. İstatistiksel anlamlılık yalnızca d(VCR+VNF) ile dVNF grupları arasında gözlenmiştir ($p < 0,05$). Çalışmamızda y(VCR+VNF) grubu 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarda K grubuna göre GSH düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir ($p > 0,05$). Ancak 3 ve 6 saatlik inkübasyonlarda yVNF grubuna göre GSH düzeyini anlamlı olarak azaltarak ve yVCR grubu ile hemen hemen aynı etkiyi göstermiştir ($p < 0,05$). Lee ve arkadaşları, HepG2 hücrelerinde GSH düzeyinin Chang hücrelerine göre 1,4 kat daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir ve yüksek GSH seviyesinin HepG2 hücre büyümesini arttırabileceğini ve farklı koşullarda bile hücreyi koruyabileceğini savunmuşlardır (150). Huang ve arkadaşları (2001), HepG2 hücrelerinde yaptıkları çalışmada artan GSH seviyesinin HepG2 hücrelerinin büyümesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. HepG2 hücrelerini GSH etil ester (GEE) ile muamele ederek hücre GSH miktarını arttırmışlar, bu artışla DNA sentezinin dolayısı ile hücre büyümesinin arttığını gözlemişlerdir. Daha sonra hücreleri GSH seviyesinin düşmesini sağlayan bütionin sülfoksimin (BSO) ile muamele ettiklerinde DNA sentezinin azaldığını ve hücre büyümesinin azaldığını gözlemişlerdir (57). Bu bağlamda çalışmamızda, GSH düzeylerine doğrudan etkilerini incelediğimiz maddelerden ϵ -viniferinin doza ve zamana bağımlı olarak hücre GSH düzeyini arttırmış olması ile HepG2 hücrelerini koruduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca 3 ve 6 saatlik inkübasyonda y(VCR+VNF) grubunun yVCR grubu ile ve 24 saatlik inkübasyonda d(VCR+VNF) grubunun dVCR grubu ile hemen hemen aynı GSH düzeyi etkilerini göstermeleri bundan sonra yapılacak olacak kombine çalışmalar için yarar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın ikinci aşamasında; ϵ -viniferinin tek başına ve VCR ile kombine uygulamasının, dışsal yollarla oluşabilecek hücre oksidatif stres ortamına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Zamana ve doza bağımlı madde uygulamalarından sonra HepG2 hücreleri, kısa dönemli *in vitro* hücre kültürü deneylerinde farmakolojik oksidatif stresi indüklemek için yaygın olarak kullanılan H_2O_2 ile 37 °C’ de 1 saat inkübe edilerek hücre oksidatif stres indüklenmiştir (1, 38, 69, 91). Radikal olmayan bir reaktif oksijen türü olan H_2O_2 canlı hücrelerde hücre metabolizmasının bir sonucu

olarak üretilmektedir. H₂O₂ hücrede DNA, lipidler ve diğer makromoleküllere hasar vererek hücrede oksidatif hasar oluşturabilir (1). Metabolize olmadığı zamanlarda Fe²⁺ ve Cu²⁺ gibi geçiş metal iyonları ile reaksiyona girerek oldukça reaktif hidroksil radikalini (\cdot OH) meydana getirebilir ki bu da hücrelerdeki oksidatif hasarın yayılmasına yol açabilir (48, 53). Bu nedenle canlı hücrelerin yaşamını devam ettirebilmesi için H₂O₂' nin aşırısının indirgenmesi gerekmektedir (86).

Çalışmamızın ikinci aşamasında uyguladığımız H₂O₂' nin, HepG2 hücrelerinde LPO düzeyine olan etkisini gözlemlemek ve maddelerin oksidatif stres yaratılmış ortamdaki LPO düzeylerine karşı koruyucu etkilerini incelemek için K grubuyla birlikte H₂O₂-K grubu kurulmuştur. Daha önce ki çalışmalarda olduğu gibi (31, 68, 107) yaptığımız çalışmada 3, 6 ve 24. saatlerde kurulan H₂O₂-K grubunda LPO düzeyi K gruplarına göre sırasıyla 4,5, 3,6 ve 1,2 kat anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). H₂O₂ ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı maddelerin 3 saatlik koruyucu etkilerine baktığımızda; yVCR ve yVNF grupları H₂O₂ ile indüklenmiş hücresel LPO düzeyinde anlamlı bir değişiklik göstermezken y(VCR+VNF) grubu LPO düzeyinde ki artışı H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak engellemiştir (p<0,05). Daha önce yapılan çalışmalarda, H₂O₂ ile indüklenmiş HepG2 hücrelerinde ϵ -viniferinin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının LPO üzerine koruyucu etkileri incelenmemiştir. Bu bakımdan ϵ -viniferinin etkileri benzer çalışmalar ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Do Amaral ve arkadaşlarının (2008) yapmış olduğu çalışmada anti-tümör ilaç olarak kullanılan cDDP ile ratlarda böbrek nefrotoksisitesi oluşturulmuş, cDDP ve antioksidan olarak kullanılan resveratrol kombine verilmiş ve çalışma sonunda tek başına cDDP uygulanan grup kontrolle kıyaslandığında MDA düzeyleri istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Kombine uygulama ise cDDP ile indüklenen MDA artışını tek başına cDDP uygulanan gruba göre azaltmıştır (30). Buna benzer yapılan bir başka *in vivo* çalışmada (2002) gentamisin ile oluşturulmuş nefrotoksisitede resveratrol uygulanması MDA oluşumunu anlamlı olarak engellemiştir (88). Çalışmamızda, H₂O₂-K grubuna göre yVCR ve yVNF gruplarının 3 saatlik koruyucu etkileri 6 saatlik

koruyucu etkileriyle benzerlik göstermiş ve H₂O₂ ile indüklenen LPO düzeyindeki artışa karşı herhangi bir koruyucu etki göstermemiştir. y(VCR+VNF) grubu ise H₂O₂-K grubuna göre LPO düzeyindeki artışı engellemiştir ancak istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (p>0,05).

dVNF grubu 6 saatlik ön inkübasyonda LPO düzeyini H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak engelleyerek koruyucu etki göstermiştir (p<0,05). Fenolik bir bileşik olan ε-viniferinin bu etkisi diğer fenolik bileşikler ile yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (1, 11, 78). Fenolik bileşiklerin metal iyonları ile şelat yapabilme ya da zincir kırıcı antioksidanlar gibi davranma yetenekleri vardır (104) ki bu da fenolik bileşikler ile yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonundaki gözlenen azalmayı açıklayabilir (78, 79, 94). Maddelerin inkübasyon süresi 24 saate çıkarıldığında, y,VNF grubu H₂O₂-K grubuna göre LPO artışını indüklemiştir (p<0,05). dVNF grubunun, 6 saatlik ön inkübasyonda H₂O₂ ile indüklenmiş LPO düzeyinde koruyucu etki göstermesi ancak inkübasyon süresini uzattığımızda bu etkisini kaybetmesi ve d(VCR+VNF) grubunun, 24 saatlik inkübasyonda H₂O₂-K grubuna göre LPO artışını indüklemesi (p<0,05) ε-viniferinin zamana bağımlı olarak hücreler tarafından metabolize edilmesiyle alakalı olabilir (119, 149).

Çalışmamızda, H₂O₂ ile oksidatif stresin indüklendiği ortamda maddelerin SOD aktivasyonuna karşı koruyucu etkileri de incelenmiştir. Bu bağlamda 3 ve 6 saatlik inkübasyon çalışmasında kurulan H₂O₂-K gruplarının SOD aktivasyonu K gruplarına göre sırasıyla 1,2 ve 2,6 kat istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p<0,05). HepG2 hücrelerinin H₂O₂ ile indüklenerek hücrel SOD aktivasyonunu arttırması daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyumluluk göstermiştir (3, 11). 24 saatlik çalışmanın kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). Çalışmamızda, 3 saatlik inkübasyonda yVNF ve dVNF grupları H₂O₂ ile indüklenmiş SOD aktivasyonunu H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak daha da arttırmıştır (p<0,05), y(VCR+VNF) grubu ise SOD aktivasyonunda ki artışı engellemiştir ancak değer istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır (p>0,05). Çalışmamızda, 3 saatlik inkübasyonda y(VCR+VNF) grubunu ile yVCR grubu SOD aktivasyonuna karşı hemen hemen aynı

sonuçları göstermiştir. İnkübasyon süresi iki katına çıkarıldığında, yalnızca dVCR grubu SOD aktivasyonunu H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır (p<0.05). 24 saatlik inkübasyonda ise, hem yVNF ve dVNF grupları hem de y(VCR+VNF) ve d(VCR+VNF) grupları SOD aktivasyonunu H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır (p<0.05). 3 ve 24 saatlik inkübasyonlarda ε-viniferin tek başına uygulandığı gruplarda ve 24 saatlik inkübasyonlarda vinkristin sülfat ile kombine uygulandığı gruplarda SOD aktivasyonunu hem K grubuna göre hem de H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı için bu maddelerin HepG2 hücrelerini oksidatif stresin hasarlarında koruyabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın ikinci aşamasının son kısmında, maddelerin H₂O₂ ile oluşturulmuş oksidatif stres ortamındaki hücrel GSH düzeylerine olan koruyucu etkilerini incelediğimizde; maddelerin 3 saatlik koruyucu etkilerini gözlemek için kurulan H₂O₂-K grubunda GSH düzeyi K grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (p<0,05). Maddeler ile 3 saat inkübe edilen tüm gruplarda GSH artışı hem H₂O₂-K grubuna göre hem de K grubuna göre anlamlı olarak engellenmiştir (p<0,05). Çalışmamızla uyumlu olarak, Kim ve arkadaşlarının (2009) yapmış oldukları bir çalışmada HepG2 hücrelerinin H₂O₂ ile inkübasyonu hücrel GSH seviyesini arttırmıştır. Kuarsetinin detoksifikasyon mekanizmasını açıklamak için yapılan bu çalışma da kuarsetin ile ön muamelenin H₂O₂ ile indüklenen GSH artışını azalttığı gözlenmiştir ve bunu da kuarsetinin antioksidan olarak hareket etmesinden ziyade pro-oksidan olarak hareket etmesi ile açıklamışlardır (68). Bu bağlamda bizde HepG2 hücrelerine uyguladığımız maddelerin 3 saatlik inkübasyonda H₂O₂ ile indüklenmiş GSH düzeyinin artışına karşı pro-oksidan etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarda H₂O₂-K grubunun GSH düzeyi K grubuna göre azalış göstermiştir ancak değerlerde istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (p>0,05). 3 saatte pro-oksidan etki gösteren kombine gruplar inkübasyon süresini uzattığımızda farklı etki göstererek H₂O₂ ile indüklenen GSH düzeyini hem K grubuna hem de H₂O₂-K grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır (p<0,05). Çalışmamızla uyumlu olarak, Martin ve arkadaşları (2010) oksidatif stres

oluşturdukları HepG2 hücrelerine karşı epikatesinin koruyucu etkilerini incelediklerinde t-BOOH ile azalan GSH seviyesini epikatesin uygulamasının engellediğini ve çalışmamızda olduğu gibi uzun dönem yüksek konsantrasyon oranlarının GSH düzeyini hem kontrol grubuna hem de t-BOOH-kontrol grubuna göre arttırdığını gözlemlemişlerdir. Epikatesin eklenmesiyle hücrelerin GSH seviyesinin yükselmesinin hücrelerin olası bir stres durumunda yaşamını sürdürebilmesi için bir avantaj olabileceği ile savunmuşlardır (83). Goya ve arkadaşları (2007) melanoidinin HepG2 hücrelerinde doğrudan ve koruyucu etkisini incelediklerinde toksik bir madde olan t-BOOH ile indüklenmiş GSH seviyesinde ki azalmı engellediğini gözlemlemişlerdir ve melanoidinin GSH konsantrasyonunda yarattığı değişme ile HepG2 hücrelerini oksidatif hasara karşı koruma yeteneğinin olduğunu savunmuşlardır (43). Yine yapılan bir çalışmada Alia ve arkadaşları (2005) t-BOOH ile indüklenmiş oksidatif stresin HepG2 hücrelerinde GSH düzeyini kontrole göre azalttığını ve quercetin ön uygulaması ile bu azalışın engellendiği gösterilerek quercetin HepG2 hücrelerini olası oksidatif stresten koruduğunu savunmuştur (11). Do Amaral ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları *in vivo* çalışmada cDDP ile oluşturulmuş rat böbrek nefrotoksisitesinde GSH düzeyi cDDP uygulanmamış kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Antioksidan olan resveratrolü cDDP ile kombine verdiklerinde ise cDDP ile indüklenmiş renal GSH azalımının engellendiğini gözlemişlerdir (30).

Ayrıca artan GSH düzeyi birçok tümör ilacının sitotoksik etkileri ile etkileşime girerek antikanser ilaçlarının sitotoksik etkilerinden hücreyi koruyabilmektedir (72). Kalinina ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada, eritrolösemi K562 hücrelerinde doksorubisin direnci arttığı zaman GSH seviyesinin arttığı gözlenmiştir (58). HepG2 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada (2001) hücrelere bütionin sülfoksimin (BSO) eklenerek hücrel GSH seviyesi azaltılmış ve bu durumda hücrelerde cDDP' nin sitotoksisite etkisinin arttığı gözlenmiştir ve sonuç olarak HepG2 hücrelerinin kemoterapötik ajan cDDP' ya karşı duyarlı hale gelmesinde GSH düzeyinin sınırlandırıcı bir proses olduğu savunulmuştur (132). Bu bakımdan yapmış olduğumuz çalışmada, HepG2 hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturduğumuz oksidatif stres ortamında, kısa inkübasyon süresinde GSH düzeyine karşı pro-oksidan olarak davranan ε-viniferin ve

kombine grupların zamana bağımlı olarak bu etkisinin tersine antioksidan gibi davranmaları, hücrelerin zamana bağımlı olarak kullandığımız maddelere karşı direnç kazanmış olabileceğini düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ϵ -viniferin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının HepG2 hücrelerinde LPO seviyesi, SOD aktivasyonu ve GSH düzeylerine doğrudan etkileri ve H_2O_2 ile oluşturulmuş oksidatif stres ortamına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır.

HepG2 hücreleri madde grupları ile zamana ve doza bağımlı olarak inkübe edilmişlerdir.

1- Sonuç olarak doğrudan etkilerini incelediğimiz maddelerden:

Vinkristin sülfat'ın LPO, GSH düzeylerine ve SOD aktivasyonuna direkt bir etkisi gözlenmemiştir. Bir antioksidan olan ϵ -viniferin ise yüksek dozda LPO seviyesinde değişiklik yaratmazken düşük dozda zamana bağımlı olarak LPO seviyesini arttırmıştır. ϵ -viniferin hem yüksek hem de düşük dozda zamana bağımlı olarak SOD aktivasyonunu azaltırken GSH düzeyini arttırmıştır. Bu bakımdan ϵ -viniferinin HepG2 hücrelerinde zamana bağımlı olarak SOD aktivasyonunu azaltmasının ona önemli bir antikarsinogenik özellik kazandırdığını düşünüyoruz. GSH düzeyindeki artışın ise, ϵ -viniferinin HepG2 hücrelerinde glutatyon sentezi ile ilgili enzimleri etkilemiş olabileceği ile ilgili olduğunu düşünüyoruz. ϵ -viniferini vinkristin sülfat ile kombine uyguladığımızda, hücrel LPO ve GSH düzeylerinde anlamlı bir etki gözlenmemiştir ancak SOD aktivasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Sonuç olarak, zamana bağımlı olarak kombine uygulamanın HepG2 hücrelerinde SOD aktivasyonunu azaltarak hücrel oksidatif stresi arttırabileceğini ve böylelikle hepatoma kanser hücrelerinde hasar yaratabileceğini düşünüyoruz. Ancak ϵ -viniferin ve vinkristin sülfat maddelerinin kombine olarak literatürlerde daha önce yapılmış bir çalışması olmadığından antioksidan enzim düzeylerinde ve aktivasyonlarında değişikliğe neden olan biyokimyasal mekanizmaların anlaşılması ve bu enzimatik değerlerin hepatoma hücrelerinde ölümcül bir hasar yaratıp yaratmayacağını anlaşılması için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* araştırmaya gerek vardır.

2- Sonuç olarak koruyucu etkilerini incelediğimiz maddelerden:

Vinkristin sülfatın, düşük ve yüksek dozda H₂O₂ ile indüklenmiş SOD aktivasyonuna, LPO ve GSH düzeylerine karşı belirgin bir koruyucu ya da prooksidan etkisi gözlenmemiştir. Düşük doz ε-viniferin zamana bağımlı olarak SOD aktivasyonunu ve GSH düzeyini arttırarak koruyucu etki göstermiştir. Yüksek doz ε-viniferin ise zamana bağımlı olarak SOD aktivasyonunda ve GSH düzeyinde değişiklik yaratmamıştır ancak LPO seviyesini arttırarak prooksidan etki göstermiştir. Uygulanan maddelerin koruyucu etkilerine baktığımızda; düşük doz kombine uygulamanın tüm parametrelerde artışa yol açarken, yüksek doz kombine uygulamanın LPO düzeylerini etkilemeden SOD aktivasyonunu ve GSH düzeylerini arttırması H₂O₂ ile uyarılarak oksidatif stres yaratılan bir ortamda HepG2 hücreleri üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Literatürlerde ε-viniferin tek başına ve vinkristin sülfat ile kombine uygulamasının, oksidatif stres ortamında antioksidan enzim düzeylerine olan koruyucu etkilerini içeren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız bu alana ışık tutacaktır. Maddelerin koruyucu mekanizmalarının aydınlatılabilmesi ve enzimlerde ki değişikliğe neden olan biyokimyasal mekanizmaların anlaşılması için ise ileri araştırmalara gerek olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- 1- Aherne, S. A., O'Brien, N.M., 1999, Protection by the flavonoids myricetin, quercetin, and rutin against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and HepG2 cells, *Nutr Cancer*, 34, 2, 160-166 p.
- 2- Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza yayınları, Konya.
- 3- Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L., 2005, Response of antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in human hepatoma cell line (HepG2), *J Biochem Mol Toxicol*, 19, 2, 119-128 p.
- 4- Alkan, R., 2007, Doğal bitki antibiyotiği: resveratrol, *Gıda*, 32, 5, 259-262 s.
- 5- Altan, N., Dinçel, A.S., Koca, C., 2006, Diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Tr Biokim Derg.*, 31, 2, 51-56 s.
- 6- Arias, H.R., Feuerbach, D., Targowska-Duda, K.M., Jozwiak, K., 2010, Catharanthine alkaloids are noncompetitive antagonists of muscle-type nicotinic acetylcholine receptors, *Neurochem Int*, 57, 2, 153-161 p.
- 7- Armağan, G.N., 2011, Metil-D-Aspartat reseptörleri aracılı nörodejenerasyonda bazı nonsteroidal antiinflatuar ilaçların nöroprotektif etkileri, Doktora tezi, T.C. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
- 8- Athar, M., Back, H.J., Tang, X., Kim K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L., 2007, Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention, *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 274-283 p.
- 9- Athar, M., Back, H.J., Kopelovich L., Bickers D.R., Kim, A.L., 2009, Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms, *Arch Biochem Biophys*, 486, 95-102 p.
- 10- Balendiran, G.K., Dabur, R., and Fraser, D., 2004, The role of glutathione in cancer, *Cell Biochem Funct*, 22, 343-352 p.
- 11- Barjot, C., Tournaire, M., Castagnino, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Rossi, J.F., 2007, Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol, *Life Sci*, 81, 1565-1574 p.
- 12- Baydaş, G., Yılmaz, O., Çelik, S., Yaşar, A., Gursu, M.F., 2002, Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Arch Med Res*, 33, 515-524 p.
- 13- Baykal, Y., 2000, Kocabalkan, F., Serbest radikalleri ve hücre hasarı, *Sendrom*. 9, 31-36 s.
- 14- Becker, J.V.W., Armstrong, G.O., Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A. and Pretorius, I.S., 2003, Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the winw- related antioxidant resveratrol, *FEMS Yeast Res*, 4, 79-85 p.
- 15- Bishayee, A., 2009, Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials, *Cancer Prev Res*, 2, 409-418 p.
- 16- Bounous, G., and Molson, J.H., 2003, The antioxidant system, *Anticancer Res*, 23, 1411-1416 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 17- Bruix, J., Boix, L ., Sala, M. and Llovet, J. M., 2004, Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell*, 5, 3, 215-9 p.
- 18- Buendia, M. A., 2000, Genetics of hepatocellular carcinoma, *Semin Cancer Biol*, 10, 185-200 p.
- 19- Büyükunal, E., 2002, Karaciğer kanseri tedavisinde medikal onkolojik yaklaşım, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, Hepatobilier ve pankreas hastalıkları sempozyumu dizisi, 28, 191 p.
- 20- Cao, Z., Li, Y., 2004, Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury, *Eur J Pharmacol*, 489, 39-48 p.
- 21- Cheeseman K.H., Slater T.F. 1993, An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49, 3, 481-93 p.
- 22- Colin, D., Lancon, A., Delmas, D., Lizard, G., Abrossinow, J., Kahn, E., Jannin, B., Latruffe, N., 2008, Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses, *Biochimie*, 90, 1674-1684 p.
- 23- Conklin, K.A., 2004, Cancer chemotherapy and antioxidants, *J Nutr*, 134, 3201-3204 p,
- 24- Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N., 2005, Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing, *Mol Nutr Food Res*, 49, 377-395 p.
- 25- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefrol Diyal Transplant Derg*, 3, 4, 92-95 s.
- 26- Çaylak, E., 2011, Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar, *Tıp Arast Derg*, 9, 1, 73-83 s.
- 27- David, A., Balong, E., Csoka, G., Racz. I., 1998, The preparation and examination of polymorphous vincristine sulphate, *İnt J Pharm*, 161, 245-251 p.
- 28- Dennison, J.B., 2007, Vincristine metabolism and the role of CYP3A5, a dissertation of philosophy, Department of Pharmacology and Toxicology, Indiana University, 217 p.
- 29- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *Japi*, 52, 794-804 p.
- 30- Do Amaral C.L., et al., 2008, Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Arch Toxicol*, 82, 363-370 p.
- 31- Duthie, S.J.,and Colins, A.R., 1997, The influence of cell growthi detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage in human cells, *Free Radic Biol Med*, 22, 717-724 p.
- 32- El-Serag, H. B., Mason, A. C., 1999, Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States., *N Engl J Med*, 340, 745 -750 p.
- 33- Farazi, P. A., DePinho, R. A., 2006, Hepatocellular carcinoma pathogenesis, from genes to environment, *Nature*, 674, 6 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 34- Farines,V., Monje, M.C., Telo, J.P., Hnawia, E., Sauvain, M., Nepveu, F., 2004, Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors, *Anal Chim Acta*, 513, 103-111 p.
- 35- Filomeni, G., et al., 2007, *trans*-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways, *Genes Nutr*, 2, 3, 295-305 p.
- 36- Franco, R., and Cidrowski, J.A., 2009, Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death Differ*, 16, 1303-1314 p.
- 37- Fremont, L., 2000, Biological effects of resveratrol, *Life Sci*, 66, 8, 663-673 p.
- 38- Fukui, M., Choi, H.J., Zhu, B.T., 2010, Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death, *Free Radic Biol Med*, 49, 800-813 p.
- 39- Ganesaratnam, K.B., Dabur, R., Fraser, D., 2004, The role of glutathione in cancer, *Cell biochemistry and function*, 22, 343-352 p.
- 40- Garcia, M.C., Amankwa-Sakyi, M., Flynn, T.J., 2011, Cellular glutathione in fatty liver in vitro models, *Toxicol In Vitro*, 25, 1501-1506 p.
- 41- Giddinga, C.E.M., Kellie S.J., Kampha, W.A., Graaf, S.S.N., 1999, Vincristine revisited ,*Crit Rev Oncol Hematol*, 29, 3, 267-87 p.
- 42- Goodman and Gillman, Tedavinin farmakolojik temeli, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009, 1315-1405 s.
- 43- Goya, L., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Bravo, L., Morales, F.J., 2007, Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide, *Mol Nutr Food Res*, 51, 5, 536-545 p.
- 44- Göksoy, E., Kapan, M., 2002, Karaciğerin primer habis tümörleri, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sürekli tıp eğitimi etkinlikleri, Gastrointestinal sistem hastalıkları sempozyumu dizisi, 28, 159 p.
- 45- Gönenç A, Özkan Y, Torun M, Şimsek B. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients. *J Clin Pharm Ther*, 2001, 26, 141-144 p.
- 46- Grizzi, F., and Chiriva-Internati, M., 2006, Cancer: looking for simplicity and finding complexity, *Cancer Cell Int*, 6, 4, 7 p.
- 47- Groninger, E., Meeuwse-de Boer, G. J., De Graaf, S. S. N., et al. 2002, Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: A mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species?, *Int J Oncol*, 21, 1339-45 p.
- 48- Guiardelli, A., Cattabeni F., 1997, Cantoni A., Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breaks, *Free Radic Res*, 26, 537-547 p.
- 49- Gül, H., 1995, Türkiye’ de Mesleksel Kanser Epidemiyolojisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Prevanatif Onkoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- 50- Gümüştaş, M. K., Atukeren, P., 2008, Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklarla ilişkisi, Türkiye’de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar, Sempozyum Dizisi, 62, 329-340 s.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 51- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem J*, 219, 1-14 p.
- 52- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol*, 49, 3, 577-587 p.
- 53- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C., editors. 1999, *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edition, New York, Oxford University Press.
- 54- Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57–70 p.
- 55- Hanif, H.A., Murad, N.A., Ngah, W.Z.W.W., and Yusof, Y.A.M., 2005, Effects of zingiber officinale on superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, glutathione and malondialdehyde content in HepG2 cell line, *Malaysian J Biochem Mol Biol*, 11, 36-41p.
- 56- Harmsma, M., Gromme, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tussenius, K.J., and Ramaekers, F.C.S., 2004, Differential effects of *Viscum album* extract Iscador Qu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells, *Int J Oncol*, 125, 1521-1529 p.
- 57- Huang, Z.Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., and Lu S.C., 2001, Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration, *FASEB J*, 15, 1, 19-21 p.
- 58- Kalinina, E.V., Saprin, A.N., Solomka, V.S., Shcherbak. N.P., Chermnykh, N.S., Piruzian, L.A., 2001, Role of the antioxidant system and redoxdependent regulation of transcription factors bcl-2 and p53 in forming resistance of human K562 erythroleukemia cells to doxorubicin, *Vopr Onkol*, 47, 595–600 p.
- 59- Karahan, İ., Yılmaz, S., 2006, Ratlarda bazı nitrosoaminlerin düşük miktarda uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri, *F Ü Sağlık Bil Derg*, 20, 1, 73-78 s.
- 60- Karihtala, P., Soini, Y., 2007, Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, 115, 81-103 p.
- 61- Kayaalp, O., 2005, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Ankara, Hacettepe-Taş Yayıncılık, 1, 11, 317-343 s.,
- 62- Kaynak, K., 2002, Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü, *Solunum Derg*, 4, 4, 468-473 p.
- 63- Kedar, N. P., 2004, Multiple dietary antioxidants enhance the efficacy of standard and experimental cancer therapies and decrease their toxicity, *Integr Cancer Thers*, 3, 310-322 p
- 64- Kemerli, G.D., 2000, Diabetik hastalarda lipid peroksidasyonu eritrosit membranındaki protein oksidasyonu ve Na⁺K⁺ ATPaz aktivitesi, Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- 65- Keskin, N., Noyan, T., Kunter, B., 2009, Resveratrol ile üzümde gelen sağlık, *Türkiye Klin J Med Sci*, 29, 5, 1273-1282 p.
- 66- Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H., 2007, Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth, *Carcinogenesis*, 28, 2, 233-9 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 67- Kılınç, K., Kılınç A., 2002, Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, Hacettepe Tıp Derg, 33, 2, 110-118 s.
- 68- Kim, G.M., and Jang, H.D., 2009, Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells, Ann N Y Acad Sci, 1171, 530–537 p.
- 69- Kim, K.V., Suh, S.J., Kim, J.D., Kim, S.S., Lee, İ.S., Kim, J.K., Chang, G.T., Kim, D.S., Kim, C.H., 2008, Effects on lipid peroxidation and antioxidative enzymes of euonymus alatus in cultured rat hepatocytes, Basic Clin Pharmacol Toxicol, 104, 60-70 p.
- 70- Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E., and Walborg Jr, R.F., 1998, The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, Environ Health Perspect, 106, 289-295 p.
- 71- Koca, N., Karadeniz. F., 2003, Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan oluşum sistemleri, Gıda Mühendisliği Derg, 32-37 s.
- 72- Kondo, T., Lida, T., 1997, Gamma-GCS and glutathione- new molecular targets in cancer treatment, Gan To Kagaku Ryoho, 24, 2219–2225 p.
- 73- Kovacs, E., 2010, Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. comparison of viscum album QuFrF extract with vincristine in an in vitro model, ScientificWorldJournal, 10, 311–320 p.
- 74- Lançon, A., Hanet, N., Jannin, B., Delmas, D., Heydel, J.M., Lizard, G., Chagnon, M.C., Artur, Y., Latruffe, N., 2007, Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes, Drug Metab Dispos, 35, 5, 699-703 p.
- 75- Lee, M., Sorn, S., Baek, S., Jang, S., Kim, S., 2009, Antioxidant and apoptotic effects of Korean white ginseng extracted with the same ratio of protopanaxatriol saponins in human hepatoma HepG2 cells, Ann N Y Acad Sci., 1171, 217-27 p.
- 76- Lee, Y.Y., Kim, H.G., Jung, H.I., Shin, Y.H., Hong, S.M., Park, E.H., Sa, J.H., Lim, C.J., 2002, Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines, Mol Cells, 14, 2, 305-311 p.
- 77- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., 2003, Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses, Biochem Biophys Res Commun, 309, 1017–1026 p.
- 78- Lima, C.F., Ferreira, M.F., Wilson, C.R., 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels, Life Sci, 79, 2056-2068 p.
- 79- Lima, C.F., Valentao, P.C.R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Ferreira, M.F., Wilson, C.P., 2007, Water and methanolic extract of salvia officinalis protect HepG2 cells from t-BHP induce oxidative damage, Chem Biol Interact, 167, 107-115 p.
- 80- Lyons, M.M., Yu, C., Toma, R.B., 2003, Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries, J Agric Food Chem, 51, 20, 5867-5870 p.
- 81- Mansour, H.H., Tawfik, S.S., 2012, Efficacy of lycopene against fluoride toxicity in rats, Pharm Biol. 50, 6, 707-11 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 82- Marra, M., Sordelli, I.M., Lombardi, A., Lamberti, M., Tarantino, L., Giudice, A., Stiuso, P., Abbruzzese, A., Sperlongano, R., Accardo, M., Agresti, M., Caraglia, M., Sperlongano, P., 2011, Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview., *J Transl Med*, 10, 9, 171 p.
- 83- Martín, M. A., Ramos, S., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L., 2010, Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by the flavonoid epicatechin, *Phytother Res*, 24, 4, 503-09 p.
- 84- Mc Cord, J.M., 1992, Human disease, free radicals and oxidant balance, *Clin Biochem*, 26, 351-357 p
- 85- Mc Cormick, F., 1999, Signalling networks that cause cancer, *Trends cell biol*, 12, 53-6 p.
- 86- Meneghini, R., and Martins, E.L., 1993, Hydrogen peroxide and DNA damage, In *DNA and free radicals*, B Halliwell and OI Aruoma, New York, Ellis Horwood, 83-93 p.
- 87- Mercan, U., 2004, Toksikolojide serbest radikallerin önemi., *Y Y Ü Vet Fak Derg*, 15, 1-2, 91-96 s
- 88- Morales, A.I., Buitrago, J.M., Santiago, J.M., Fernandez- Tagarro, M., Lopez-Novoa, J.M., Perez-Barriocanal, F., 2002, Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity, *Antioxid Redox Signal*, 4, 893-898 p.
- 89- Nakazawa, H., Genka, C., Fujishima, M., 1996, Pathological aspects of active oxygens/free radicals, *Jpn J Physiol*, 46, 15-32 p.
- 90- Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin, *Free Rad Biol Med*, 31, 11, 1287-1371 p.
- 91- O'Brien, N.M., Woods, J.A., Aherne, S.A., O'Callaghan, Y.C., 2000, Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell culture model: modulatory effects of phytochemicals, *Biochem Soc Trans*, 28, 22-26 p.
- 92- Orallo, F., 2006, Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol, *Curr Med Chem*, 13, 87-98 p,
- 93- Özben, T., 2007, Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy, *J Pharm Sci*, 96, 9 p.
- 94- Patat, S., Akça, H., Kaleli, S., Karakoyun, İ., Koçak, A., Gültekin, F., 2003, Klorprifos-etil'in HepG2 hücre dizilerinde hücre canlılığına etkisi ve melatoninin koruyucu etkisi, *Süleyman Demirel Tıp Fak Derg*, 10, 3, 39-43 s.
- 95- Patel, T., Gores, G.J., 1996, Kaufmann, S. H., The role of proteases during apoptosis, *FASEB J*, 10, 587-97 p,
- 96- Pecorino, L., 2005, Molecular biology of cancer, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Sixth Edition*, Oxford University press,
- 97- Pinotti, J.A., Barros, A.C.S.D., Hegg, R., Zeferino, L.C., 1995, Breast cancer control program in developing countries, *breast dis.*, Elsevier Science Inc, 8, 243-250 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 98- Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D., 2003, Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages, *Life Sci*, 73, 1191-1213 p.
- 99- Piver, B., Fer, M., Vitrac, X., Merillon, J-M., Dreano, Y., Berthou, F., Lucas, D., 2004, Involvement of cytochrome P450 1A2 in the biotransformation of trans-resveratrol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 68, 4, 773-782 p.
- 100- Porrini, M., Riso, P., Brusamolino, A., Berti, C., Guarnieri, S., Visioli, F., 2005, Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection, *Br J Nutr*, 93, 1, 93-9 p.
- 101- Privat, C., Telo, J.P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J.P., Nepveu, F, 2002, Antioxidant properties of trans- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media, *J Agric Food Chem*, 50, 1213–1217 p.
- 102- Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., 2006, Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochem Pharmacol*, 72, 1439-52 p.
- 103- Ricci, M.S., Zong, W.X., 2006, Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways *Oncologist*, 11, 342-57 p.
- 104- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci*, 2, 4, 152-159 p.
- 105- Rodgers, E.H., Grant, M.H., 1998, The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem Biol Interact*, 116, 213–228 p.
- 106- Rodrigo, R., Bosco, C. 2006, Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney- A review, *Com Biochem Phys A*, 142, 317-327 p.
- 107- Röhrdanz, E., Ohler, S., Tran-thi, Q.H., Kahl, R., 2002, The phytoestrogen daidzein affects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H+IIE cells, *J Nutr*, 132, 370- 375 p.
- 108- Ruddon, R.W., *Cancer biology*, 2007, Fourth edition, Oxford University press,
- 109- Sang, S., Hou, Z., Lambert, J.D., Yang, C.S., 2005, Redox properties of tea polyphenols and related biological activities, *Antioxid Redox Signal*, 7, 1704-14 p.
- 110- Santandreu. F.M., Valle, A., Oliver, J., Roca, P., 2011, Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells, *Cell Physiol Biochem*, 28, 219-228 p.
- 111- Sarrias, A.G., Gromek, S., Niesen, D., Seeram, N.P., Henry, G.E., 2011, Resveratrol oligomers isolated from carex species inhibit growth of human colon tumorigenic cells mediated by cell cycle arrest, *J Agric Food Chem*, 59, 8632-8638 p.
- 112- Scharf, G., Prustomersky, S., Knasmuller, S., Schulte-Hermann, R., Huber, W.W., 2003. Enhancement of glutathione and g-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of glutathione synthesis, by chemoprotective plant-derived food and beverage components in the human hepatoma cell line HepG2, *Nutr Cancer*, 45, 74–83 p

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 113- Schulz, W. A., 2005, Molecular biology of human cancers, Springer, 11 p.
- 114- Sekhar, K.R., et al., 2002, Redox-sensitive interaction between kiaa0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of glutamylcysteine synthetase, Free Radic Biol Med, 32, 7, 650–662 p.
- 115- Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q., 2004, Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves, Plant Sci, 167, 6, 1235-1241 p.
- 116- Signorelli, P., Ghidoni, R., 2005, Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. J Nutr Biochem 16, 8, 449-466 p.
- 117- Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M.1997, Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?, Clin Biochem, 30, 2, 91-113 p
- 118- Sözmen, E.,Y. Yaslanma biyokimyası, İnsan Biyokimyası, Palme yayıncılık, Ankara, 2002, 667–672 s.
- 119- Subramanian, L., Youssef, S., Bhattacharya, S., et al., 2010, Resveratrol: challenges in translation to the clinic- a critical discussion, Clin Cancer Res, 16, 5942-5950 p.
- 120- Sun, Z.J., Pan, C.E., Liu, H.S., Wang, G.J., 2002, Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro, World J Gastroenterol, 8, 1, 79-81 p.
- 121- Tang, Z. Y., 2001, Hepatocellular carcinoma-cause treatment and metastasis, World J Gastroentero, 7, 4, 445-454 p.
- 122- Türker, F.A., Dizdar, Ö., 2005, Kemoterapötikler, Meslek İçi Eğt. Derg, 73-85 s.
- 123- Urso, M.L., Clarkson, P.M., 2003, Oxidative stress, exercise, and antioxidant, supplementation, Toxicology, 189, 41–54 p.
- 124- Uysal M., 1998, Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar, Klin Geliş, 11, 1, 2, 336-341 s
- 125- Uzunalimoğlu, O., Yurdaydın, C., Çetinkaya, H., Ökten, A., 2001, Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey, Dig Dis Sci, 46, 1022-8 p.
- 126- Ünal, D., 1999, Serbest radikaller, Sendrom, 68-80 s.
- 127- Vitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., Fogliano, V., 2004, Dietary antioxidant compounds and liver health, Crit Rev Food Sci Nutr, 44, 7, 8, 575-586 p.
- 128- Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Vescovi, N.C.P.P., Fogliano, V., Marchelli, R., 2005, Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans, Mol Nutr Food Res, 49, 495-504 p.
- 129- Wang, D., Hang, T., Wu, C., Liu, W., 2005, Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS, J Chromatogr B, 829, 1, 2, 97-106 p.

KAYNAKLAR DiZiNi (devam ediyor)

- 130- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., 2004, Antioxidants and prevention of chronic disease, Crit Rev Food Sci Nutr, 44, 275–295 p.
- 131- Yao, L., H., Jiang, Y., M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S. S., 2004, Flavonoids in food and their health benefits, Plant Foods Hum Nutr, 59, 3, 113-22 p.
- 132- Zhang, K., Chew, M., Yang, E.B., Wong, K.P., Mack, P., 2001, Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms, Mol Pharmacol, 59, 837–843 p.
- 133- Zheng, Y., Liu, Y., Ge, J., Wang, X., Liu, L., Bu, Z., Liu, P., Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression, Mol Vis, 16, 1467-1474 p.
- 134- Zghonda, N., Yoshida, S., Araki, M., Kusunoki, M., Mliki, A., Ghorbel, A., Miyazaki, H., 2011, Greater effectiveness of ϵ -viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration, Biosci Biotechnol Biochem.75, 7, 1259-67 p.
- 135- http://www.flickr.com/photos/walter_pfliegler/8381678256/
- 136- <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Resveratrol.html>
- 137- [http:// cancer.gov](http://cancer.gov)
- 138- <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer002>
- 139- <http://w2.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1215/unite06.pdf>
- 140- <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>
- 141- <http://www.treknature.com/gallery/photo162712.htm>
- 142- http://www.makna.org.my/ar2006/MAKNA_AMD1_USM.html
- 143- <http://www.belgeler.com/blg/4ww/oksijen-ve-canlilar>
- 144- http://www.tpog.org.tr/pdf/hem_1.pdf
- 145- <http://pathman.smpdb.ca/pathways/SMP00437/pathway?level=2>
- 146- http://www.ctf.edu.tr/farma/onersuzer/pdf/tr/25_Antineoplastikler.pdf
- 147- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593100001460>
- 148- <http://ict.sagepub.com/content/3/4/310.long>
- 149- https://library.villanova.edu/Find/Summon/Record?id=FETCH-ulakbim_primary_939521
- 150- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442906>
- 151- <http://dc538.4shared.com/doc/oBSeoL49/preview.html>

8. EKLER DİZİNİ

EK-1

Tablo 2: LPO standart eğrisinden elde edilen deney sonuçlarının sayısal değerler (μmol).

		IC 50 Dozu						%80 Canlılık Dozu				
		H_2O_2	K	VCR (52.5 μM)	$\epsilon\text{-vnf}$ (98.3 μM)	ETO (55 μM)	(VCR+ $\epsilon\text{-vnf}$) (11.25 μM + 15.8 μM)	VCR (6 μM)	$\epsilon\text{-vnf}$ (80 μM)	ETO (7 μM)	(VCR+ $\epsilon\text{-vnf}$) (3.63 μM +3.75 μM)	
LİPİT HİDROPEROKSİT (LPO) μmol	3 saat	Direk etki	-	4,566 \pm 0.672	4.594 \pm 0,782	4.492 \pm 0.850	4.919 \pm 0.505	5.000 \pm 1.213	5.454 \pm 0,954	4.749 \pm 0.982	5.258 \pm 1.793	4.567 \pm 0.471
		Koruyucu etki *	20.908 \pm 1.587 [#]	3.774 \pm 0.348	19.153 \pm 3.171	18.842 \pm 6.699	16.802 \pm 4.956	15.285 \pm 3.464 ^b	14.070 \pm 2.823	21.077 \pm 3.057	22.236 \pm 2.609	23.543 \pm 5.789
	6 saat	Direk etki	-	4.485 \pm 1.304	6,843 \pm 3,278	7.371 \pm 3.360	7.365 \pm 4.008	7.764 \pm 4.316	7.276 \pm 3.019	7.615 \pm 3.120	7.310 \pm 2.827	8.252 \pm 3.451
		Koruyucu etki *	22.37 \pm 6.733 [#]	4.851 \pm 0.771	19.194 \pm 1.534	23.720 \pm 2.648	16.281 \pm 4.161	16.924 \pm 7.706	27.033 \pm 6.752	12.771 \pm 4.275 ^c	21.843 \pm 3.121	18.205 \pm 6.841
	24 saat	Direk etki	-	4.824 \pm 0.479	4,553 \pm 1,284	4.648 \pm 0.400	5.034 \pm 1.286	4.302 \pm 0.708	4.661 \pm 0.787	6.057 \pm 0.735 ^a	3.841 \pm 0,444	4.207 \pm 0.575
		Koruyucu etki *	19.70 \pm 7.954 [#]	8.977 \pm 4.869	16.23 \pm 7.875	27.561 \pm 3.057 ^d	18.252 \pm 1.003	20.508 \pm 2.967	22.588 \pm 7.167	20.217 \pm 2.857	26.673 \pm 5.692	31.558 \pm 7.288 ^e

* Maddelerin 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarından sonra hücreleri 1 saat 500 μmol H_2O_2 ile indüklenme.

Tablo 3: SOD aktivasyon eşitliğindeki sonuçların sayısal verileri (%)

			IC 50 Dozu					%80 Canlılık Dozu				
			H ₂ O ₂	K	VCR (52.5 μM)	ε-vnf (98.3μM)	ETO (55 μM)	(VCR+ε-vnf) (11.25 μM + 15.8 μM)	VCR (6 μM)	ε-vnf (80 μM)	ETO (7 μM)	(VCR+ε- vnf) (3.63 μM +3.75 μM)
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) %	3 saat	Direk etki	-	28.959 ± 0.600	18.711 ± 4.705 ^f	23.590 ± 2.832	25.198 ± 8.264	29.693 ± 0.233	21.842 ± 5.974	26.118 ± 3.949	26.738 ± 3.072	23.494 ± 1.292
		Koruyucu etki *	69.96 ± 12.967 [#]	32.333 ± 8.876	57.617 ± 4.498	89.146 ± 7.889 ^d	68.014 ± 5.556	59.873 ± 4.297	75.029 ± 7.843	85.904 ± 2.639 ^c	69.596 ± 4.821	81.378 ± 0.222
	6 saat	Direk etki	-	48.836 ± 1.511	39.345 ± 10.607	39.017 ± 0.017	21.665 ± 2.080	29.171 ± 3.633 ^g	48.314 ± 8.738	50.870 ± 0.555	35.446 ± 1.249	32.919 ± 5.364 ^h
		Koruyucu etki *	76.14 ± 0.940 [#]	21.194 ± 0.697	64.528 ± 1.179	71.267 ± 4.854	22.30 ± 0.441	78.329 ± 0.217	49.168 ± 18.641 ⁱ	66.396 ± 0.667	69.309 ± 2.085	70.690 ± 2.687
	24 saat	Direk etki	-	99.022 ± 0.477	85.227 ± 2.905	52.121 ± 7.079	87.357 ± 2.064	43.792 ± 13.431 ^g	94.328 ± 1.044	51.649 ± 17.517	90.073 ± 3.184	48.570 ± 15.203 ^h
		Koruyucu etki *	58.721 ± 0.000 [#]	64.077 ± 1.095	55.610 ± 1.100	73.297 ± 9.010 ^d	73.812 ± 2.905	87.829 ± 3.565 ^b	78.007 ± 16.304	94.657 ± 0.956 ^c	73.015 ± 0.854	89.733 ± 4.149 ^e

* Maddelerin 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarından sonra hücreleri 1 saat 500 μmol H₂O₂ ile indüklemeye.

EK-3

Tablo 4: GSH standart eğrisinden elde edilen deney sonuçlarının sayısal değerleri (mM)

		IC 50 Dozu						%80 Canlılık Dozu				
		H ₂ O ₂	K	VCR (52.5 µM)	ε-vnf (98.3 µM)	ETO (55 µM)	(VCR+ε-vnf) (11.25 µM + 15.8 µM)	VCR (6 µM)	ε-vnf (80 µM)	ETO (7 µM)	(VCR+ε- vnf) (3.63 µM +3.75 µM)	
İNDİRGENMİŞ GLUTATYON (GSH) mM	3 saat	Direk etki	-	1.564 ± 0.519	2.162 ± 0.398	4.368 ± 0.835 ^j	2.430 ± 0.177	2.073 ± 0,132	1.760 ± 0.068	3.142 ± 0.191 ^a	2.223 ± 0.096	2.676 ± 0.161 ^h
		Koruyucu etki *	2.69 ± 0.448	1.985 ± 0.240	1.138 ± 0.067	1.397 ± 0.043 ^d	1.199 ± 0.195	1.151 ± 0.031 ^b	1.083 ± 0.051	1.642 ± 0.088 ^c	1.146 ± 0.092	1.263 ± 0.141 ^e
	6 saat	Direk etki	-	3.083 ± 0.711	2.852 ± 0.908	4.016 ± 0.717 ^j	2.223 ± 0.561	2.395 ± 0.058	4.234 ± 0.915	4.521 ± 0.683 ^a	2.459 ± 0.627	4.495 ± 0.612 ^h
		Koruyucu etki *	1.491 ± 0.241	1.726 ± 0.382	1.499 ± 0.039	3.050 ± 0.188 ^d	1.824 ± 0.174	1.764 ± 0.042	1.700 ± 0.325	2.417 ± 0.183 ^c	1.496 ± 0.149	1.760 ± 0.087
	24 saat	Direk etki	-	2.523 ± 0.104	2.029 ± 0.175	3.767 ± 0.498 ^j	2.317 ± 0.104	2.935 ± 0.459	2.313 ± 0.764	3.759 ± 0.717 ^a	2.376 ± 0.324	2.093 ± 0.081
		Koruyucu etki *	0.609 ± 0.332	0.748 ± 0.008	0.839 ± 0.164	0.565 ± 0.118	0.208 ± 0.063	1.230 ± 0.228 ^b	0.174 ± 0.078	1.214 ± 0.099 ^c	0.477 ± 0.083	1.151 ± 0.167 ^e

* Maddelerin 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonundan sonra hücreleri 1 saat 500 µmol H₂O₂ ile indüklemek.

SEDA TARHAN

Adres: Cumhuriye Mah. Sakarya 1 Cad. Soyiç/Tarhan
Apt. 63/3 ESKİŞEHİR

Tel: 05073357102

E-mail: sedatarhan99@hotmail.com

Kişisel Bilgiler

- **Doğum Tarihi:** 18 Kasım 1985
- **Doğum Yeri:** Eskişehir
- **Medeni Hali:** Bekâr
- **Cinsiyet:** Bayan

Eğitim

Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir, 2008

Yüksek Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya A.B.D,
İzmir, 2008 (Terk)

Yüksek Lisans: Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim

Yabancı Diller: İngilizce (akıcı, çok iyi)

Bilimsel Etkinlikler

-Milli Eğitim Bakanlığı Akademik Batı Dilleri Eğitim Kurumu Özel Yabancı Dil
Kursu, İzmir, 2007

-Malvern House Language School English Certificate: Londra'da Malvern
House Language School'da 2 Şubat 2009–13 Eylül 2009 dil okulu

-GMP (Good Manufacturing Practice)- İyi Üretim Uygulamaları Sertifikalı
Eğitim Programı 10-11 Kasım 2007 / İzmir

-Kozmetik Üretim Yönetimi Sertifikalı Eğitim Programı 3-4 Kasım 2007 / İzmir

-Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası:
Deneysel Hayvanları Kullanımı ile İlgili Eğitim Programı, 20 Eylül-1 Ekim 2010

