

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR ANTIOKSİDAN OLARAK RESVERATROLÜN, SİSPLATİN VE
DOKSORUBİSİNİN İNDÜKLEDİĞİ KROMOZOMAL VE
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLERE KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Günsel BİNGÖL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

KOCAELİ
2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR ANTIOKSİDAN OLARAK RESVERATROLÜN, SİSPLATİN VE
DOKSORUBİSİNİN İNDÜKLEDİĞİ KROMOZOMAL VE
BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLERE KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Günsel BİNGÖL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

Danışman:
Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ

KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi
Tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2010/103
KOCAELİ
2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


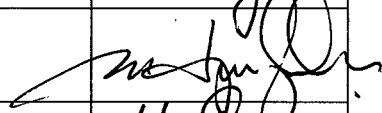
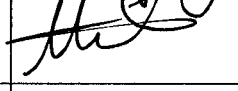

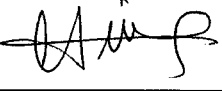
Tez adı: Bir Antioksidan Olarak Resveratrolün, Sisplatin ve Doksorubisinin İndüklediği
Kromozomal ve Biyokimyasal Değişimlere Karşı Koruyucu Etkisinin
Araştırılması

Tez yazarı: Günsel BİNGÖL

Tez savunma tarihi: 28.06.2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Başkan	Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE	
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ	
Üye	Prof. Dr. Meltem ÖZLEN DİLLİOĞLUGİL	
Üye	Doç. Dr. Murat KASAP	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğumu onaylarım.

...../...../2012

Prof. Dr. Ümit Biçer
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bir Antioksidan Olarak Resveratrolün, Sisplatin ve Doksorubisinin İndüklediği Kromozomal ve Biyokimyasal Değişimlere Karşı Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Bu çalışmada, Doksorubisin (DXR) ve Sisplatinin (cDDP) indüklediği kromozomal ve biyokimyasal değişimlere karşı resveratrolün (RES) koruyucu etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bir fitoaleksinin olan resveratrol, antioksidan ve antigenotoksik etkileri sebebiyle son yıllarda büyük ölçüde dikkat çekmektedir. DXR ve cDDP'nin sadece tümöral hücrelerde değil, normal hücreler üzerinde de toksik etkileri söz konusudur. DXR ve cDDP, kemik iliği hücrelerinde, DNA üzerinde tek ve çift iplik kırılmalarına ve yapısal kromozom anomalilerine neden olmaktadır. Ayrıca, DXR ve cDDP; kalp, karaciğer ve böbrek dokularında; malondialdehit (MDA), konjuge dien (CD) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinde anlamlı artmaya, glutatyon (GSH) düzeyleri ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinde anlamlı azalmaya yol açmaktadır.

150-200 gr ağırlığında wistar albino erkek sıçanlar, her grupta 6 hayvan olacak şekilde 9 deney grubuna ayrıldı. DXR ve cDDP gruplarında, sıçanlara sadece DXR (90mg/kg/bw, i.p.) ve sadece cDDP (5mg/kg/bw, i.p.) tek doz, i.p. olarak verildi. Resveratrol ve kombinasyon gruplarında (DXR+RES12,5, DXR+RES25, cDDP+RES12,5, cDDP+RES25), resveratrol, intraperitoneal yolla 12,5 ve 25 mg/kg/bw dozlarında, 24 saatlik periyot içinde 6 saatte bir, i.p. olarak verildi.

DXR+RES25 gruplarındaki toplam kromozom hasarı ve anormal metafaz frekansları, DXR gruplarına göre anlamlı olarak düşük ($p<0,05$); fakat kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Diğer taraftan, aynı parametreler açısından bakıldığında, cDDP+RES25 grubunda, cDDP grubuna göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0,05$), kontrol grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Resveratrolün, sıçan kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, DXR ve cDDP'nin indüklediği, artmış MDA, CD, ve NO düzeylerini, anlamlı düzeyde azalttığı ($p<0,05$), azalmış GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerini ise anlamlı düzeyde yükselttiği ($p<0,05$) görüldü. Sonuç olarak, resveratrolün, DXR ve cDDP'nin indüklediği klastojenik etkilere karşı koruyucu fonksiyonu olduğu, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında antioksidan aktiviteyi artırdığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Kromozomal Hasar, DXR, cDDP, RES, MDA, CD, NO, GSH, SOD

ABSTRACT

Effects of Resveratrol as an Antioxidant, Against Doxorubicin and Cisplatin Induced Chromosomal Aberrations and Biochemical Changes in Rats

This study aims to find out whether or not resveratrol has protective effect against chromosomal aberrations and biochemical changes, induced by Doxorubicin (DXR) or Cisplatin (cDDP). Recently, resveratrol, a phytoalexin, has attracted considerable attention due to its antioxidant and antigenotoxic effects. DXR and cDDP has toxic effects not only on tumoral cells, but also on normal cells. DXR and cDDP, in bone marrow cells, induces single and double strand breaks on DNA and structural chromosomal aberrations. On the other hand, in heart, liver and kidney tissue samples, DXR and cDDP cause a significant increase in malondialdehyde (MDA), conjugated diene (CD) and nitric oxide (NO) levels; a significant decrease glutathione (GSH) level and superoxide dismutase (SOD) activity.

Wistar albino male rats, weight of about 150-200 g, were divided into nine experimental groups with six animals each. In DXR and DDP groups, only DXR (90 mg/kg/bw, i.p.) and only DDP (5 mg/kg/bw, i.p.) were administered as a single dose to the rats. In resveratrol and combination groups (DXR+RES12,5, DXRRES25, cDDP+RES12,5, cDDP+RES25), resveratrol with doses 12,5 and 25 mg/kg bw was applied for every six hours in a 24-hour period by intraperitoneally.

The mean total chromosome aberration and abnormal metaphase frequency were significantly lower ($p < 0,05$) in the DXR+RES25 group compared to the DXR group; but, significantly higher ($p < 0,05$) in this combination group compared to the control group. On the other hand, the mean total chromosome aberration and abnormal metaphase frequency were significantly lower ($p < 0,05$) in the cDDP+RES25 group compared to the cDDP group; but, statistically similar ($p > 0,05$) both cDDP+RES25 group and control group. Resveratrol, in the heart, liver and kidney tissues of rats, significantly ($p < 0,05$) reduced the increase in MDA, CD and NO levels, and increased ($p < 0,05$) the fallen in GSH levels and SOD activity induced by DXR and cDDP. As a result, it was observed that resveratrol had a preventive function against to clastogenic effects induced by DXR and cDDP and increased the antioxidant activity in the heart, liver and kidney tissues of rats.

Key words: Antioxidant, Chromosomal Aberrations, DXR, cDDP, RES, MDA, CD, NO, GSH, SOD

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca çok değerli bilgileri ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ'a;

Tez çalışmamdaki katkı ve yardımlarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Meltem ÖZLEN DİLLİOĞLUGİL'e;

Doktora çalışmalarım sırasında sundukları katkılardan dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Hakkı DALÇIK'a ve Doç. Dr. Murat KASAP'a;

Manevi destekleri ve yardımlarından dolayı arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR, Arş. Gör. Dr. Aylin ÖZON KANLI, ve Arş. Gör. Sinem ÖZGÜL'e;

Katkı ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Fikriye POLAT'a;

Zor günlerimde yanımda bulunarak manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Yasemin KATRANCI'ya,

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri sevgi ve hoşgöründen dolayı eşim Prof. Dr. Yılmaz BİNGÖL'e, biricik kızım Ezcan Ezgi BİNGÖL'e ve sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar	2
2.2. Kemoterapötik İlaçların Genotoksik ve Sitotoksik Etki Mekanizmaları	3
2.3. Kromozom Anomalileri	4
2.3.1. Translokasyon (Translocation)	4
2.3.2. Delesyon (Deletion)	4
2.3.3. Duplikasyon (Duplication)	4
2.3.4. İnversiyon (Inversion)	5
2.3.5. Yüzük kromozom (Ring Chromosome)	5
2.3.6. İzokromozom (Isochromosome)	5
2.3.7. Kromozom Kırıkları (Break)	5
2.3.7.1. Kromozom tipi kırıklar	5
2.3.7.2. Kromatid tipi kırıklar	6
2.4. Serbest Radikaller	6
2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	7
2.4.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)	7
2.4.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	7
2.4.1.3. Hidroksil radikali ($\cdot OH$)	8
2.4.1.4. Peroksil radikali ($ROO\cdot$)	9
2.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	9
2.4.3. Oksidatif Stres	10
2.4.4. Hücre ve Doku Hasarlarında Serbest Radikallerin Rolü	10
2.4.4.1. Serbest radikallerin hücre membranına etkileri ve lipid peroksidasyonu (Malondialdehit; MDA ve Dien konjugat; CD)	11
2.4.4.2. Serbest radikallerinin proteinlere etkileri	11
2.4.4.3. Serbest radikallerinin nükleik asit ve DNA'ya etkileri	12
2.5. Doksorubisin (DXR): Etki Mekanizmaları ve Toksisitesi	12

2.6. Sisplatin (cDDP): Etki Mekanizmaları ve Toksisitesi	16
2.7. Antioksidanlar	18
2.7.1. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar	18
2.7.2. Yapılarına Göre Antioksidanlar	18
2.7.3. Etki mekanizmalarına Göre Antioksidanlar	19
2.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)	19
2.7.5. Glutasyon (GSH)	20
2.7.6. Resveratrol	20
2.7.6.1. Resveratrolün kardiovasküler sistem üzerine etkileri	22
2.7.6.2. Resveratrolün anti-kanser etkileri	22
2.7.6.3. Resveratrolün anti-oksidan etkileri	23
2.7.6.4. Resveratrolün apoptosise etkileri	24
2.7.6.5. Resveratrolün inflamasyona etkileri	25
2.7.6.6. Resveratrolün hücre döngüsüne etkileri	26
2.7.6.7. Resveratrolün hücre proliferasyonuna etkileri	27
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Deney İçin Gerekli Kimyasal Maddeler	28
3.1.2. Deney İçin Gerekli Olan Cihazlar	29
3.1.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar	30
3.1.4. Kontrol ve Deney Grupları	30
3.1.5. Doksorubisin (DXR) Dozu ve Uygulanışı	31
3.1.6. Sisplatin (cDDP) Dozu ve Uygulanışı	31
3.1.7. Resveratrol (RES) Dozu ve Uygulanışı	32
3.1.8. Kolşisin Dozu ve Uygulanışı	32
3.2. Yöntemler	32
3.2.1. Kromozom Anomalilerinin Tespiti	32
3.2.1.1. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	32
3.2.1.2. Sıçan Kemik İliği Hücrelerinin Eldesi	33
3.2.1.3. Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	33
3.2.1.4. Kromozom Anomalilerinin Skorlanması	34
3.2.1.5. Kromozomların İstatistiksel Analizi	34
3.2.2. Biyokimyasal Metodlar	35
3.2.2.1. Dokuların Çıkarılması ve Saklanması	35
3.2.2.2. Doku protein düzeyi ölçümü (Lowry yöntemi)	35
3.2.2.3. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeyi Ölçümü	36

3.3.2.4. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü	37
3.3.2.5. Doku Glutasyon (GSH) Düzeyi Ölçümü (Ellman Yöntemi)	39
3.3.2.6. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü	40
3.3.2.7. Konjuge Dien Düzeyi Ölçümü	41
3.3.2.8. Biyokimyasal Verilerin İstatistiksel Analizi	42
4. BULGULAR	43
4.1. Kemik İliği Hücreleri Kromozom Anomali Bulguları	43
4.1.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	43
4.1.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	46
4.1.3. Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	48
4.2. Kalp, Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Biyokimyasal Bulgular	48
4.2.1. Kalp Dokusu MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri ve SOD Aktiviteleri	48
4.2.1.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	48
4.2.1.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	49
4.2.2. Karaciğer Dokusu MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri ve SOD Aktiviteleri	50
4.2.2.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	50
4.2.2.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	50
4.2.3. Böbrek Dokusu MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri ve SOD Aktiviteleri	51
4.2.3.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	51
4.2.3.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	52
4.2.4. Sağlıklı Kontrol ve Resveratrol Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması	53
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR DİZİNİ	88
ÖZGEÇMİŞ	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMO	: Anormal Metafaz Ortalaması
CD	: Konjuge dien
cDDP	: Sisplatin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DXR	: Doksorubisin
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
İK	: İzokromatid Kırığı
K	: Kromatid Kırığı
KE	: Kompleks Exchange
MDA	: Malondialdehit
Mİ	: Mitotik İndeks
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
QF	: Quadriradial Figür
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
RES	: Resveratrol
SOD	: Süperoksit dismutaz
TF	: Triradial Figür
TK	: Toplam Kromozom Hasarı
TKO	: Toplam Kromozom Ortalaması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doksorubisinin yapısı	13
Şekil 2.2. Sisplatinin yapısı	16
Şekil 2.3. Resveratrolün yapısı	21
Şekil 4.1. Normal kromozom plağı	63
Şekil 4.2. Normal kromozom plağı	63
Şekil 4.3. İzokromatid kırık anomalisi	64
Şekil 4.4. Triradial figür anomalisi	64
Şekil 4.5. Kromatid kırığı anomalisi	65
Şekil 4.6. Gap	65
Şekil 4.7. Quadriradial figür anomalisi	66
Şekil 4.8. Kompleks Exchange anomalisi	66
Şekil 4.9. Kompleks Exchange ve kromatid kırığı anomalileri	67
Şekil 4.10. Triradial ve quadriradial figürler	67
Şekil 4.11. Translokasyon kromozomları	68
Şekil 4.12. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA düzeyleri	69
Şekil 4.13. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki CD düzeyleri	69
Şekil 4.14. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki NO düzeyleri	70
Şekil 4.15. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki GSH düzeyleri	70
Şekil 4.16. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki SOD aktiviteleri	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Çalışma ve kontrol grupları	31
Tablo 4.1. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kemik iliği hücrelerinde gözlenen yapısal kromozom anomali çeşit ve sayıları, Mİ (%), toplam kromozom anomali ortalamaları ile anormal metafaz ortalamaları frekansları	54
Tablo 4.2.a. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p<0,05$) kullanılarak karşılaştırılması	55
Tablo 4.2.b. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p<0,05$) kullanılarak karşılaştırılması	56
Tablo 4.3. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kemik iliği hücrelerinde gözlenen yapısal kromozom anomali çeşit ve sayıları, Mİ (%), toplam kromozom anomali ortalamaları ile anormal metafaz ortalamaları frekansları	57
Tablo 4.4.a. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p<0,05$) kullanılarak karşılaştırılması	58
Tablo 4.4.b. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p<0,05$) kullanılarak karşılaştırılması	59
Tablo 4.5. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutasyon düzeyleri (GSH) ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması	60
Tablo 4.6. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların karaciğer dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutasyon (GSH)düzeyleri ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması	61
Tablo 4.7. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların böbrek dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutasyon (GSH)düzeyleri ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması	62

1. GİRİŞ ve TEZİN AMACI

Resveratrol, bitkiler tarafından üretilen doğal polifenolik bir bileşiktir. Resveratrol'ün üzüm, fıstık, çoban üzümü gibi bitkilerde bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Resveratrolün anti-kanser, anti-inflamasyon, anti-aging ve anti-oksidan gibi birçok biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır.

Sisplatin ve doksorubisin, antitümoral etkisi olan iki temel ilaç olmakla birlikte insanlar üzerinde ikincil malignitelere yol açtıkları için mutajen karakterlidirler. Bu ilaçların hem DNA düzeyinde mutajenik etkileri, hem de birçok organ ve doku üzerinde ciddi toksik etkileri söz konusudur. Antitümöral aktiviteye sahip bu ilaçların ciddi yan etkilerinin olması, kullanımlarını sınırlamaktadır. Kemoterapötik ilaçların yan etkilerini ortadan kaldıracak birçok profiltik önlemler alınmasına rağmen, bunların yeterli olmadığı görülmektedir.

Bu araştırmada, sıçanlara, sisplatin veya doksorubisin verilerek genotoksik ve sitotoksik hasarlar oluşturuldu. Sisplatin veya doksorubisin uygulaması ile oluşabilecek kromozom anomalilerini ve hücrel antioksidan aktivite değışikliklerini resveratrolün nasıl etkileyeceğini gözlemlemek amacıyla, kombinasyon gruplarındaki sıçanlara, sisplatin veya doksorubisin ile birlikte resveratrol uygulandı. Biyokimyasal parametrelerde; doku malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve konjuge dien düzeyleri tayin edildi. Antioksidan durumu belirlemek için doku glutatyon (GSH) ve superoksit dismutaz (SOD) düzeyleri belirlendi.

Doksorubisin ve sisplatin tarafından oluşturulan hücrel hasarların önüne geçilebilmesinde antioksidanlar önemli rol oynamaktadır. Sisplatin veya doksorubisin ile indüklenen klastojenesiti üzerine vitamin E, vitamin C, vitamin B6, vitamin A, L-carnitin, triptofan, selenyum ve melatonin gibi maddelerin koruyucu etkinliği konusunda birçok çalışma vardır. Bu çalışma, bir antioksidan olan resveratrolün, sisplatin veya doksorubisin ile indüklenen klastojenesite üzerine koruyucu etkisinin araştırılması ve kemoterapötik ilaçlarla birlikte adjuvant bir terapinin gerekliliğinin tartışabilmesi açısından önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemoterapi ve Antineoplastik Ajanlar

Kemoterapinin amacı, sitotoksik ilaç kullanımı ile kanseri tedavi etmek, kanseri kontrol etmek veya kanserin semptomlarını azaltmaktır. Kemoterapötik ilaçlar, radyoterapi ile birlikte veya ameliyattan önce tümürlü dokuyu küçültmek (neoadjuvan kemoterapi) amacıyla kullanılabilirdiği gibi ameliyattan sonra ikincil tümör oluşumlarını engellemek (adjuvan kemoterapi) amacıyla da kullanılabilir.

Kemoterapötik ilaçların kullanımında farklı metodlar uygulansada genellikle dolaşım sistemi yolu ile ilacın hedefe gitmesi sağlanmaktadır. Bu ilaçlar, intravenöz enjeksiyon ile dolaşım sistemine doğrudan verilebilecekleri gibi oral yol kullanılarak da sisteme girmeleri sağlanabilmektedir. Bazı özel durumlarda, kemoterapötik ilaçlar doğrudan kas dokuya, göğüs boşluğuna veya beyin omirilik sıvısı içerisine enjekte edilebilmektedir.

Kemoterapötik ilaçlar kanserli hücelere zarar vermekle birlikte normal hüceler üzerinde de toksik etkilere sahiptirler. İstenmeyen bu yan etkiler ilaçtan ilaca değışiklik göstermektedir. Hatta, aynı ilaç, farklı hastalar üzerinde farklı yan etkilere neden olabilmektedir. Kemoterapötik ilaçların neden olduğu başlıca yan etkiler şu şekilde sıralanabilir:

- Yorgunluk; en yaygın yan etkidir ve gündelik hayatı olumsuz bir şekilde etkiler.
- Bulantı ve kusma; vücudun sıvı dengesini bozarak dehidrasyona neden olurlar.
- Dolaşım ve bağışıklık sistemleri üzerindeki etkileri; kemik iliği hücelerini baskılayarak kırmızı kan hüceleri (alyuvar), beyaz kan hüceleri (akyuvar) ve kan pulcuklarının (platelet) oluşumlarını etkilerler. Kırmızı kan hücelerinin azalması anemiye, beyaz kan hücelerinin azalması immün yetersizliğe, kan pulcuklarının azalması ise aşırı kanamaya yol açmaktadır.
- Alopesia; saç, vücut tüyleri ve kirpiklerde dökülmelere neden olurlar.
- Üretkenlik (fertility) üzerindeki etkileri; bazı sitotoksik ilaçlar erkek ve kadınlarda üretkenliği kalıcı veya geçici olarak etkilemektedir (Pazdur et al. 2007).

2.2. Kemoterapötik İlaçların Genotoksik ve Sitotoksik Etki Mekanizmaları

Kemoterapide kullanılan antineoplastik ajanların etki mekanizmaları birbirlerine benzememekle birlikte, hepsi direk veya indirek yollarla kanserli hücreleri öldürecek veya çoğalmalarını durduracak şekilde çalışırlar. Bazı ilaçlar, direk DNA üzerinde etkisini gösterirken, bazıları da kanserli hücrelerin beslenme kaynaklarını inhibe etmektedirler.

Kemoterapötik ilaçlar, hücre döngüsüne olan etkilerine göre veya hücreler üzerindeki etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler.

1. Hücre döngüsü üzerindeki etkilerine göre;

a) Siklus spesifik veya faz spesifik olanlar: Bu tip ilaçlar, siklusun herhangi bir fazına veya spesifik olarak belli bir faza karşı etkili olan ilaçlardır. Örneğin mekloreタミン siklusun herhangi bir fazında etkili olurken, vinblastin M fazındaki hücreler üzerinde etkilidir.

b) Siklus spesifik olmayanlar: Bu tip ilaçlar, hücre döngüsü üzerinde etkili olmayıp, dinlenme durumundaki hücrelerde etkilidirler. Örneğin mitomycin C, siklus spesifik bir ilaç değildir (Chamber et al., 2001).

2. Hücreler üzerindeki etki mekanizmalarına göre;

a) Alkilleyiciler: Bazı ilaçların, DNA üzerinde alkilleyici fonksiyonunun olması, DNA iplik kırıklarına, DNA sentezinin inhibisyonuna ve hücrelerin apoptoza sürüklenmesine neden olmaktadır. Faz spesifik olmayan alkilleyici ajanlara örnek olarak, siklofosamid, thiotepa ve sisplatin verilebilir (Chamber et al., 2001; Li et al., 2008).

b) Antimetabolitler: Bu gruptaki ilaçlar hücrenin ihtiyaç duyduğu metabolitleri taklit ederek etkilerini gösterirler. Antimetabolitler, faz spesifik olup özellikle S fazında etkili olmaktadır. Pürin, pirimidin ve folat antagonistleri bu gruba girmektedir (Chamber et al., 2001; Li et al., 2008).

c) Bitki alkaloidleri: Bu ilaçlar, hücreleri, faz spesifik olarak etkilerler. Vinblastin bir bitki alkaloididir ve hücreleri M fazında durdurmaktadır (Chamber et al., 2001; Li et al., 2008).

d) Antitümöral antibiyotikler: Bu ilaçlar faz spesifik değildir ve direk DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu ve replikasyonu engellerler. Doksorubisin, bleomisin ve daunorubisin gibi ilaçlar antitümöral antibiyotiklerdendir (Chamber et al., 2001; Li et al., 2008).

Kemoterapötik ilaçların tümörlü dokular üzerinde gösterdikleri hasar verici etkileri normal hücre ve dokularda da göstermeleri ciddi problemlere neden olmaktadır. Bu etkiler; kromozomlarda anomalilere sebep olmak ve serbest radikal oluşumlarını indüklemektir.

2.3. Kromozom Anomalileri

Kemoterapötik ilaçların genotoksik etkileri nedeniyle, DNA'da mutasyonlar ve kromozomlarda yapısal anomaliler ortaya çıkmaktadır. Kromozomlarda görülen belli başlı yapısal anomaliler şunlardır; translokasyon, delesyon, duplikasyon, inversiyon, yüzük kromozom, izokromozom.

2.3.1. Translokasyon (Translocation): Kopan bir kromozom segmentinin, homolog olmayan başka bir kromozoma yerleşmesi durumudur. Resiprokal, robertsonian ve transpozisyon olmak üzere üç tip translokasyon vardır. Hiçbir genetik materyal kaybı olmaksızın, homolog olmayan iki kromozom arasındaki karşılıklı parça değişimine resiprokal translokasyon denilmektedir. Homolog olmayan, akrosentrik iki kromozomun kısa kollarının kopması ve uzun kollarının birleşmesi, robertsonian translokasyon adını almaktadır. Transpozisyon ise homolog olmayan iki kromozomdan birinde meydana gelen iki kırılma sonucu, kopan parçanın, diğer kromozomdaki tek kırılmanın olduğu bölgeye girmesi ile oluşan translokasyondur (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.2. Delesyon (Deletion): Kromozom üzerindeki bir parçanın kopması veya eksilmesi durumunda ortaya çıkan bir anomalidir. Delesyon, terminal ve intertisyel olmak üzere iki tiptir. Terminal delesyonda kromozom ucuna yakın bölgelerde tek bir kırık sonucu parça kopması söz konusudur ve kopan parça sentromer içermediğinden ilk bölünmede hücreden atılmaktadır. İntertisyel delesyon ise kromozom üzerinde meydana gelen iki kırılma arasındaki bölgenin koparak ayrılmasıdır. Delesyon sonucu genetik materyal kaybı görülmektedir (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.3. Duplikasyon (Duplication): Kromozomun bir parçasının, iki veya fazla sayıda tekrarlarla görülmesidir. Duplike olan parçalar serbest olabileceği gibi eşinin bulunduğu kromozom içerisinde de bulunabilir. Duplikasyonlar, delesyonlar kadar zararlı olmasa da gen dengesini bozduğu için çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.4. İnverson (Inversion): Bir kromozom üzerindeki iki noktada görülen kırık sonucu arada oluşan segmentin, 180°lik açı ile ters dönerek tekrar aynı bölgeye yerleşmesidir. İnverson, perisentrik ve parasentrik olmak üzere iki tiptir. Sentromeri içine alan perisentrik inverson, kromozom kollarının uzunluğunun ve gen sırasının değişmesine neden olmaktadır. Parasentrik inverson ise sentromerin dahil olmadığı bir inversondur ve gen sırasının değişmesine neden olmaktadır (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.5. Yüzük kromozom (Ring Chromosome): Bir kromozomun iki kolunun uçlarında kopma meydana gelmesi durumunda, bu kolların birleşerek yuvarlak bir şekil alması sonucu görülen bir anormalliktir (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.6. İzokromozom (Isochromosome): Mitoz bölünmenin anafaz safhasında, kromatidler birbirinden sentromerin boyuna bölünmesi ile ayrılmaktadır. Bununla birlikte, sentromerin enine bölünmesiyle, kısa kolların bir kromozomda, uzun kolların ise diğer kromozomda kalmasıyla izokromozom denilen anormallik ortaya çıkmaktadır (Czepulkowski, 2001; Gupta, 2007).

2.3.7. Kromozom Kırıkları (Break): Kromozomlarda görülen kırıklar, kromozom tipi kırıklar ve kromatid tipi kırıklar olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

2.3.7.1. Kromozom tipi kırıklar: Bir kromozomun, her iki kromatidinin aynı bölgesinde görülen kırıklardır ve izokromatid tip kırık olarak da adlandırılır. Kırılma sonucu, kromozom boyunda kısalma ile birlikte asentrik fragment oluşmaktadır. Bu tip kırıklar, genellikle, hücre siklusunun G1 fazında görülmektedir. Kromozomlarda görülen lezyonlar, iki veya ikiden fazla olduğunda kromozomlar arasında veya kromozom içerisinde bir takım düzensizlikler ortaya çıkmaktadır (Savage, 1975).

Kromozomlar arasında görülen değişmeler (interchange): Homolog veya homolog olmayan kromozomlar arasında görülen değişmelerdir. Karşılıklı etkileşim iki kromozom arasında olduğunda disentrik veya translokasyonlara neden olabilmektedir. Etkileşim, ikiden fazla kromozom arasında olduğunda polisentrik (trisentrik, tetrasentrik) veya kompleks translokasyon hasarlanmaları ortaya çıkabilmektedir (Savage, 1975).

Kromozom içerisinde görülen değişmeler (intrachange): Tek bir kromozom içerisinde görülen değişmelerdir. Değişme, iki kol arasında (inter-arm intrachanges) veya

tek bir kol içerisinde (intra-arm intrachanges) olabilir. Karşılıklı kollar arasındaki etkileşimlerde, sentrik ring, perisentrik inversiyon, terminal delesyon gibi hasarlanmalar ortaya çıkmaktadır. Tek bir kol içerisindeki etkileşimler ise intertisyel delesyon, parasentrik inversiyon, terminal delesyon gibi anormalliklere neden olmaktadır (Savage, 1975).

2.3.7.2. Kromatid tipi kırıklar: Bir kromozomun sadece bir kromatidinde meydana gelen kırıklardır. Kırılma sonucu kromatid boyunda kısalma ile birlikte asentrik fragment oluşmaktadır. Kromatid tipi kırıklar hücre siklusunun S fazı ile S/G2 geçişlerinde oluşmaktadır. Kromatidlerde görülen lezyonlar iki veya ikiden fazla olduğunda kromatidler arasında veya kromatid içerisinde bir takım düzensizlikler ortaya çıkmaktadır (Savage, 1975).

Kromatidler arasında görülen değişmeler (interchanges): Homolog veya homolog olmayan farklı kromozomların kromatidlerinde bulunan iki veya ikiden fazla lezyon arasında görülen yeniden düzenlemelerdir. Kromatidler arasında oluşan lezyonlar arasındaki etkileşim disentrik, ring, para ve perisentrik inversiyon, intertisyel ve terminal delesyon, resiprokal translokasyona neden olabilmektedir (Savage, 1975).

Kromatid içerisinde görülen değişmeler (intrachanges): Değişme, iki kardeş kromatid arasında (inter-chromatid inter-arm intrachanges) veya tek bir kromatid içerisinde (intra-chromatid intrachanges) olabilir. Kromatidler içinde oluşan lezyonlar arasındaki etkileşim disentrik, ring, para ve perisentrik inversiyon, intertisyel ve terminal delesyon, resiprokal translokasyona neden olmaktadır (Savage, 1975).

Triradial figürler: İki kromozomun kromatidleri arasında görülen bir çeşit kromatid düzensizliğidir. Bir kromozomdaki izokromatid kırık ve başka bir kromozomdaki tek bir kromatid kırığının karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan üç kollu konfigürasyonlardır (Savage, 1975).

Quadriradial figürler: Farklı kromozomların kromatidleri arasında görülen düzensizlikler olup dört kollu oluşumlara neden olurlar (Savage, 1975).

2.4. Serbest Radikaller

Serbest radikal, dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller, oldukça reaktiftirler ve yarı ömürleri çok kısadır. Bu moleküller, kararlı hale geçmek için elektron verip yükseltgenir veya elektron alarak

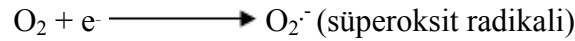
indirgenebilirler. Radikaller, radikallerle veya radikal olmayan ajanlar ile kolaylıkla reaksiyona girebilirler (Valko et al., 2006).

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Serbest radikallerin önemli bir bölümünü oksijenden oluşan radikaller oluşturmaktadır ve bunların hepsine birden reaktif oksijen türleri (ROT) denilmektedir. Reaktif oksijen türleri, radikaller ve radikal olmayanlar şeklinde iki sınıfa ayrılmaktadır. Radikal olanlar; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve semikuinon radikali (HQ) olarak adlandırılan moleküllerdir. Radikal olmayanlar ise hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid hidroperoksit (LOOH) ve singlet oksijendir (1O_2).

2.4.1.1. Süperoksit radikali (O_2^-)

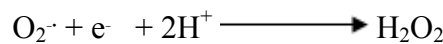
Süperoksit radikali, dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron içeren moleküler oksijenin dışarıdan bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşmaktadır.

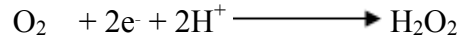


Süperoksit radikali, çok kolay oluşan, uzun yarı ömrü olan ve lipofilik özellik gösteren bir radikaldir. Süperoksitin, hem oksitleme hem de redükleme kabiliyeti vardır. Örneğin, süperoksit, sülfür, askorbik asit ve NADPH gibi molekülleri oksitlerken, sitokrom C ve metalleri indirgeyebilir. Normalde, fizyolojik pH'da konsantrasyonu düşük olduğu için reaktivitesi düşüktür. Süperoksit radikalının kendisinin güçlü bir hasar yapıcı etkisi olmasa bile oldukça güçlü radikallerin ortaya çıkmasına kaynaklık ettiğinden önemlidir. Örneğin, süperoksit radikalının nitrik oksit ile reaksiyonu sonucunda lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına neden olan oldukça reaktif peroksinitritler oluşabilmektedir (Kumar, 2011; Valko et al., 2006).

2.4.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Süperoksit radikali veya moleküler oksijenin elektron alarak oluşturdukları peroksit molekülünün iki hidrojen atomu ile birleşmesi sonucu oluşmaktadır.



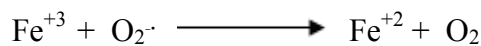
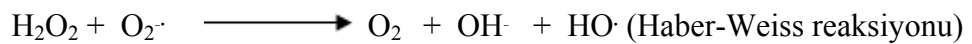
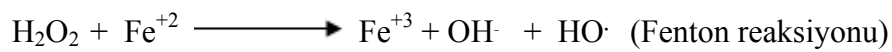


Biyolojik sistemlerde, hidrojen peroksit, süperoksitin dismutasyonu ile oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği bu reaksiyon sonucunda hidrojen peroksit ve moleküler oksijen açığa çıkmaktadır. Hidrojen peroksit, spesifik olarak reaktif olmamasına rağmen, süperoksit radikali veya demirle reaksiyona girerek oldukça reaktif olan hidroksil radikalının oluşmasına kaynaklık yapabilmektedir. Hidrojen peroksit tek zincir kırıklarıyla sonuçlanan DNA hasarlarına ve DNA protein çapraz bağlarının kurulmasına neden olmaktadır (Cheeseman and Slater, 1993; Kumar, 2011; Valko et al., 2006).

2.4.1.3. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)

Serbest radikaller içinde en reaktif olanıdır. Hidrojen peroksitin, süperoksit radikali ile (Haber-Weiss reaksiyonu) veya Fe^{+2} ile (Fenton reaksiyonu) reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ortaya çıkmaktadır. Yarılanma ömrü çok kısa olan hidroksil radikali DNA'da hasarlara neden olacak kadar mutajenik, dokuda mevcut her bir moleküle zarar verebilecek kadar sitotoksiktir. Hidroksil radikali, hücre zarının lipit tabakasındaki çoklu doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomlarını kopararak lipit peroksidasyonunu başlatma potansiyeline sahiptir (Cheeseman and Slater, 1993; Kumar, 2011; Sen et al., 2010; Valko et al., 2006).

Hücrelerdeki demir regülasyonu, çok sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Normalde, ferritin gibi demir tutucu moleküller sayesinde hücreler arası sıvıda serbest demir bulunmamaktadır. Bununla birlikte, süperoksit radikal artışı nedeniyle oluşan hücresel stres serbest demir salınımına yol açmaktadır. Ortamdaki serbest demir (Fe^{II}), Fenton reaksiyonunu tetikleyerek, hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır (Leonard et al., 2004). Süperoksit radikali, hem Haber-Weiss reaksiyonunu katalizlemekte, hem de Fenton reaksiyonunda kullanılan serbest demir (III)'ün indirgenme reaksiyonuna katılmaktadır. Oluşan hidroksil radikalleri, DNA bazları ile etkileşerek hasarlara ve DNA iplik kırıklarına neden olmaktadır.



2.4.1.4. Peroksil radikali (ROO·)

Oksijen radikal türevi olan peroksil radikali, yüksek enerjili radikaldır (Burcham, 1998). Yarılanma ömrü 7 saniyedir. Peroksil radikalleri DNA'da kırılma ve hasarlara neden olmaktadır.

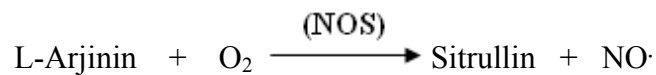


2.4.2. Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

Serbest azot radikallerinin hepsine birden reaktif nitrojen türleri (RNT) denilmektedir. Serbest azot radikallerinden nitrik oksit (NO·), radikal nitrojen türü olarak kabul edilirken; azot dioksit (NO₂) ve peroksinitritler (ONOO·) reaktif olmayan nitrojen türleri sınıfına girmektedir.

Nitrik oksit (NO·)

Reaktif nitrojen türü olan NO, birçok biyolojik olayda rol oynamaktadır. NO, kısa yarı ömürlü, düşük molekül ağırlıklı ve lipofilik bir moleküldür (Saran et al., 1990). NO, L-arjininden nitrik oksit sentaz enziminin (NOS) aktivitesi ile üretilmektedir. NOS, yapısal (cNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Yapısal NOS'un endotelial hücrelerden sentezlenen formu eNOS, nöronal hücrelerden sentezlenen formu ise nNOS olarak adlandırılmaktadır. Hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun artması yapısal NOS'u aktif hale getirerek NO üretimine neden olmaktadır. Anti-inflammatory fonksiyonu olan eNOS kaynaklı NO'nun, süperoksit radikali ile etkileşiminin, vasküler tonusun düzenlenmesinde etkili olduğu ve bu yüzden iyi bir vazodilatör olduğu rapor edilmiştir (Lowenstein and Snyder, 1994; Grozdanoviç et al., 1994). nNOS kaynaklı NO ise merkezi sinir sisteminde nöromodulator olarak görev yapmaktadır. İndüklenebilir NOS (iNOS) ise makrofaj, hepatosit, lökosit ve damar düz kasları tarafından sentezlenmektedir. iNOS tarafından üretilen NO'nun antimikrobiyal ve antitümoral etkileri bulunmaktadır (Durak et al., 2001; Jessup, 1996; Mohanakumar et al., 2002).



Biyolojik sistemlerde, NO biyoyararlılığının düşmesi çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Bununla birlikte NO konsantrasyonunun artması sonucunda da hücre ve doku harabiyetleri oluşabilmektedir. Örneğin NO, yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türleri ile birleşerek oldukça reaktif peroksinitritlerin oluşmasına ve dolayısıyla lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (Frombaum et al., 2012). Ayrıca NO'nun DNA sentezini inhibe etmek, DNA kırılmalarına neden olmak, serbest demir salınımını indüklemek ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek enzim aktivitelerini değiştirmek gibi etkileri de bulunmaktadır (Kwon et al., 1991; Lancaster and Hibbs, 1990).



2.4.3. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen (ROT) ve reaktif nitrojen (RNT) türleri organizmadaki birtakım metabolik reaksiyonlar sonucu (endojen) veya çevresel faktörlerce (ekzojen) oluşabilmektedir. Solunum zinciri reaksiyonları, nötrofil ve makrofaj stimülasyonu, sitokrom P450 ve ksantin oksidaz enzimlerinin aktiviteleri gibi mekanizmaları kapsayan etmenler endojen kaynaklı etmenlerdir. Ayrıca demir ve diğer geçiş metallerinin dahil olduğu reaksiyonlar sonucu da serbest radikaller oluşmaktadır. Ekzojen kaynaklı etmenlere ise endüstriyel kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, stres, hava kirliliği, sigara gibi indükleyiciler girmektedir (Çavdar et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1986; Kumar, 2011; Sen et al., 2010). Birtakım hücresel cevapların oluşmasında düşük konsantrasyonlardaki serbest radikallerin önemli bir yeri vardır. Bununla birlikte, ROT ve RNT oluşumlarının aşırı artışı, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açmaktadır. Eğer, artan ROT ve RNT oluşumları, antioksidant savunma sistemleri tarafından hızlı bir şekilde uzaklaştırılmazsa oksidatif stres meydana gelmektedir (Lobo et al., 2010). Oksidatif stres DNA, protein, lipit ve karbonhidratlar üzerinde hasarlara yol açarak tümör oluşumlarına ve kansere neden olabilmektedir (Cheseman and Slater, 1993).

2.4.4. Hücre ve Doku Hasarlarında Serbest Radikallerin Rolü

Serbest radikaller, hücre membran yapısında peroksidasyona, proteinlerde oksidasyona, enzim aktivitelerinde değişmelere ve DNA'da mutasyonlara neden olmaktadır. Kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, akciğer hastalıkları, sindirim

sistemi rahatsızlıkları, iskemi ve kanser gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasında serbest radikallerin payı büyüktür (Kumar, 2011; Sen et al., 2010).

2.4.4.1. Serbest radikallerin hücre membranına etkileri ve lipit peroksidasyonu; Malondialdehit (MDA) ve Dien konjugat (CD)

Hücre zarlarının fosfolipit tabakasında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikallerin zararlı etkilerine maruz kalan hedeflerin başında gelmektedir. Lipit peroksidasyonu, hidroksil radikalının etkisiyle başlatılan ve zincirleme olarak devam eden bir reaksiyondur. Yağ asitlerinden bir hidrojenin koparılması ile lipit radikalleri oluşmakta, bunlar da dien konjugatlarına (CD) dönüşmektedir. Oluşan CD'lerin oksijen ile reaksiyonu sonucu lipit peroksil radikalleri meydana gelmektedir. Lipit peroksil radikallerinin diğer doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomlarını çıkarmaları ile reaksiyon tekrar başlatılmakta ve zincirleme reaksiyonlar bu şekilde devam etmektedir. Lipit peroksil radikallerinin kendileri ise ortaya çıkan hidrojen atomları ile birleşerek lipit hidroksiperoksitlerine dönüşmektedir. Lipit peroksidasyonu sürecinde oluşan son ürün MDA'dır (Sterbauer et al., 1991; Nyska and Kohen, 2002). Lipit peroksidasyonu zar yapısı ve akışkanlığını bozarak iyon transportuna ve enzim fonksiyonlarına zarar vermektedir (Lobo et al., 2010).

2.4.4.2. Serbest radikallerinin proteinlere etkileri

Oksidatif stres, proteinlerin spesifik aminoasitlerinde modifikasyona, peptid zincirlerinde kırılmalara ve protein-lipit peroksidasyon ürünleri çapraz bağlanmalarına neden olabilmektedir (Kumar, 2011; Lobo et al., 2010). Serbest radikaller katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan sisteme ait enzimlerin aktivitelerini azaltabilmekte, DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotidlere zarar verebilmektedir (Sen et al., 2010). Proteinlerin oksidatif hasarı ile reseptörlerin aktivitesine, membran transportuna ve signal transdüksiyon mekanizmasına zarar verilebilmektedir (Lobo et al., 2010). ROT'ların neden olduğu proteinlerin oksidasyonu ile oluşan protein hidroperoksitlerin reaktivitesi oldukça yüksektir. Oksitlenen proteinler hücreden uzaklaştırılmazsa birçok hastalığa zemin hazırlayabilirler.

2.4.4.3. Serbest radikallerinin nükleik asit ve DNA'ya etkileri

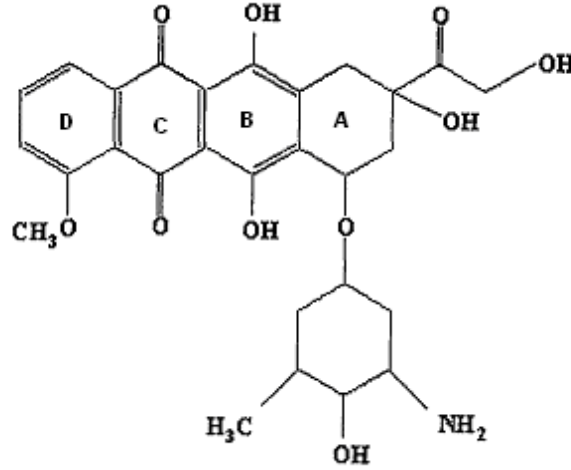
Serbest oksijen radikalleri, DNA üzerinde; pürin ve pirimidin hasarlarına, deoksiriboz iskeletinde modifikasyonlara ve DNA tek ve çift iplik kırıklarına neden olurlar. Ayrıca, DNA-DNA ve DNA-protein etkileşimlerinde, çapraz bağlarının kurulmasına yol açabilirler (Kumar, 2011; Lobo et al., 2010). DNA üzerinde mutasyonların oluşması kanserle sonuçlanabilmektedir. Serbest radikal hasarında, DNA'da glikol, dTG ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (oxo8Gd) miktarlarının arttığı rapor edilmiştir (Hattori et al., 1997). Oxo8Gd, hidroksil radikalının guanin bazında yol açtığı bir modifikasyondur ve oksidatif stresin ve karsinogenesizin önemli biyolojik belirteçlerinden biridir (Shigenaga et al., 1989). Diğer taraftan, p53 (tümör supressor) geninde görülen mutasyonlardan biri olan G-T transversiyonuna serbest radikaller neden olmaktadır ve bu gendeki mutasyonlar tümör oluşumuna ve kansere yol açmaktadır. Serbest nitrojen türleri de DNA da hasarlara neden olmaktadır. Örneğin, peroksinitritler, guanin bazında 8-nitroguanin modifikasyonuna neden olmaktadır (Brown and Borutaite, 2001). MDA'nın DNA üzerinde özellikle adenin, guanin ve sitozin bazları ile etkileşmesiyle DNA adduktları oluşabilmektedir (Marnett, 1999).

2.5. Doksorubisin (DXR): Etki Mekanizmaları ve Toksisitesi

Anti-neoplastik ilaçlar grubunda olan doksorubisin (adriamycin;DXR), birçok kanser tipini tedavi etmek için yıllardır kullanılan en etkili sitotoksik antibiyotiktir. (Quiles et al., 2006). *Streptomyces peucetis* mantarından elde edilen polisiklik, aromatik ve kırmızı pigmentli antibiyotiktir (Lown, 1993). Özellikle göğüs, gastrik, hepatik, jinekolojik, akciğer, pankreas, tiroid, testis, yumuşak doku, lösemi, lenfoma kanserleri, Wilms tümörü ve kemik tümörlerinin tedavilerinde kemoterapötik ilaç olarak kullanılmaktadır (BCCA, 2006; Hortobagyi, 1997).

Doksorubisin, tetrasiklik antrokinon çekirdeğinin daunozamin denilen şeker molekülüne bağlanması ile oluşur. Tetrasiklin yapısı suda çözünmezken, şeker yapısı suda çözünür. Yapıdaki şeker ve tetrasiklin halkasının varlığı ilaca antitümoral aktivite kazandırmaktadır. İlacın moleküler formülü $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ ve molekül ağırlığı 580.0 gr/mol'dür. Molekülün B halkası hidrokuinon grubu iken, C halkası kuinon grubudur ve bu gruplar semikuinon radikaline aktive edilebilmektedir (Keizer et al., 1990). Oral kullanıma uygun bir ilaç değildir, çünkü oral yol ile %5'inden daha azı absorbe olabilmektedir. İlacın plazma yarılanma ömrü 31.7 saattir. İlaç ile ilgili başlıca klinik toksisite belirtileri bulantı,

kusma, alopesi, ateş ve kemik iliği baskılanması şeklinde sayılabilir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Doksorubisin>)



Şekil 2.1. Doksorubisinin yapısı

Doksorubisinin neden olduğu toksik etkiler; genotoksisite, sitotoksisite ve kardiyotoksisitedir.

DXR genotoksisitesi: DXR, genotoksik etkisini, DNA yapısında mutasyonlara yol açarak ve DNA biyosentezinde inhibisyona neden olarak göstermektedir. DXR genotoksisite mekanizmaları; DNA Topoizomeraz II (TopoII) inhibisyonu, DNA interkalasyonu ve DNA alkilasyonu şeklinde sıralanabilir (Granados-Principal et al., 2010; Kayaalp, 2000; Müller et al., 1997).

DNA TopoII, süperhelikal yapıdaki DNA'da gerilimi hafifletmek için geçici çift zincir kırıkları oluşturmaktadır. DXR, TopoII'nun tirozin residülerine bağlanarak DXR-DNA-topoII kompleksinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu kompleks, DNA-TopoII kompleksini stabilize ederek replikasyonun inhibisyonuna ve DNA'da çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (Bigioni et al., 2001; De Graff et al., 2003; Fortune et al., 2000; Giles et al., 2005; Minotti et al., 2004; Noviello et al., 1994; Sabourin et al., 2000; Walker and Nitiss, 2000).

DNA interkalasyonunda, DXR, özellikle guanin ve sitozin baz çifti arasına girerek mutasyonlara yol açmaktadır. İn vitro genotoksisite çalışmalarında, DXR'nin, hücre serilerinde, kromozomal anomalilere özellikle tek ve çift iplik kırılmaları ve sister kromatid exchange oluşumlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Ally et al., 1999; Helbig

and Speit, 1995; Newsome and Littlefield, 1975; Szabova, 1996). DXR, faz spesifik bir ilaç olmamakla birlikte hücre siklusunun G2/M fazında daha etkindir. İn vivo genotoksisite çalışmalarında, DXR'nin, deney hayvanlarının kemik iliği ve kan lenfosit hücrelerinde, kromozom ve kromatid tipte hasarlar, sister kromatid exchange oluşumları, kompleks yeniden düzenlemeler (triradial, qudriradial figürler ve disentrik) gibi kromozom anomalilerinin yanında mitotik indekste azalma, anormal metafazda artmaya yol açtığı belirtilmektedir (Au and Hsu, 1980; Dhawan et al., 2003; Gülkaç et al., 2004; Larramendly et al., 1980; Rosselli et al., 1990; Szabova, 1996; Tavares et al., 1998; Tohamy et al., 2003).

DXR'nin neden olduğu genotoksik etkilerden bir diğeri DNA alkilasyonudur. DXR, serbest radikal oluşumlarını indükleyerek ve metallerle etkileşerek DNA alkilasyonuna neden olmaktadır. Serbest radikallerin lipit peroksidasyonu sonucu MDA üretimi artmaktadır. MDA'nın DNA ile etkileşimi sonucu replikasyonu inhibe eden alkilleyici DNA adductları oluşmaktadır. Diğer taraftan, DXR'nin metallerle yaptığı kompleksler de DNA'yı hedefleyerek DNA'da çapraz bağların kurulmasına yol açmakta ve bu durum da helikaz enziminin hareketini engellemektedir (Minotti et al., 2004; Quiles et al., 2002).

DXR sitotoksisitesi: Doksorubisin, serbest radikal oluşumlarını indükleyerek, dolaylı yoldan, önemli yapılar üzerinde hasarlara neden olmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller, hücresel yapılardaki lipit ve proteinlerle etkileşerek biyokimyasal mekanizmalara zarar vermektedir. DXR, semikuinon üretimi, NAD(P)H oksidaz aktivasyonu, ve metallerle etkileşim gibi mekanizmalarla serbest radikal oluşumlarına neden olmaktadır.

Semikuinon üretiminde sitokrom P450 redüktaz enzimine gereksinim vardır. Sitokrom P450 redüktaz, NADH dehidrogenaz veya ksantin oksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar ile NADH veya NADPH'dan bir elektron alınarak DXR'den semikuinon serbest radikali oluşturulmaktadır. Semikuinon radikali, bir elektronu ortamdaki moleküler oksijene transfer ederek süperoksit anyonunun oluşmasını sağlarken kendisi tekrar kuinona dönüşmektedir. "Doksorubisinin redoks döngüsü" denilen bu döngü ile süperoksit radikali üretimi daha da artırılmaktadır. Oluşan süperoksit radikali, hidroksil radikaline veya SOD enzimi ile hidrojen peroksite dönüştürülmektedir (Quiles et al., 2002).

DXR'nin NAD(P)H oksidazı indüklemesi ile ortaya çıkan süperoksit radikalinin nitrik oksit ile reaksiyonu sonucu peroksinitritler oluşmaktadır. Oldukça reaktif olan

peroksinitrit oluşumları, DXR kardiyotoksitesinin başlıca sebeplerinden biridir (Horenstein et al., 2000; Jung and Reszka, 2001).

DXR, demir metali ile etkileşerek serbest radikal oluşturabilmektedir. DXR'nin demir ile etkileşimi enzimatik olmayan reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Semikuinonun hidrojen peroksit ile reaksiyonu oldukça reaktif olan hidroksil radikalının oluşmasına neden olmaktadır. Ortamda oksijen konsantrasyonu düşük olduğunda, semikuinon, Fe (III)'ü indirgeyerek Fe(II)'nin oluşumuna neden olmaktadır. Fe(II)'nin hidrojen peroksit ile reaksiyonu da hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu reaksiyon Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir. Semikuinonun, Fe(II) varlığında hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ve tekrar kuinon oluşmaktadır. Görüldüğü gibi bu reaksiyonlar dizisi de doksorubisinin redoks döngüsü ile gerçekleşmektedir (Chen et al., 2007).

Hücre membranının lipit kompozisyonu ve yapısal fonksiyonları enzim aktiviteleri açısından gereklidir (Sanderman, 1978; Schmidley, 1990). Ortamda serbest yağ asitleri ve serbest radikaller çok düşük düzeyde olsa bile, bu durumun, Na^+ , K^- -ATPase aktivitesini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır. Serbest radikal oluşumları ile Na^+ , K^- -ATPase aktivitesi inhibe edilmekte ve bunun sonucunda da lipit peroksidasyonunun arttığı rapor edilmiştir (Chong et al., 1985; Simao et al., 2011; Wyse et al., 2000). Yapılan bir çalışmada, resveratrol tedavisinin ROT oluşumunu düşürdüğü ve Na^+ , K^- -ATPase aktivitesindeki inhibisyonu önleyerek lipit peroksidasyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (Simao et al., 2011). Başka bir çalışmada da DXR'nin neden olduğu azalmış Na^+ , K^- -ATPase aktivitesinin resveratrol kullanımı ile düzeldiği ve artmış MDA düzeyinin azaldığı gözlenmiştir (Tatlidere et al., 2009).

DXR indüklü enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla oluşan serbest radikaller, lipit peroksidasyonuna ve proteinlerde oksidasyona yol açmaktadırlar. Lipit peroksidasyonu ile hücrelerin membran akışkanlığı ve iyon transportu bozulmaktadır. Ayrıca oluşan serbest radikaller endojen antioksidan sistemin zayıflamasına neden olmaktadır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, DXR'nin MDA düzeylerini yükselttiği, GSH düzeyi ve SOD aktivitelerini ciddi anlamda düşürdüğünü göstermektedir (Horenstein et al., 2000; Jung and Reszka, 2001; Öktem, 2002; Quiles et al., 2002).

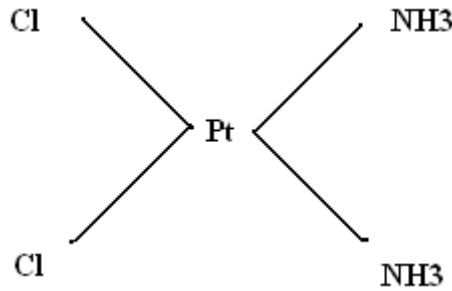
DXR kardiyotoksitesi: Kanser kemoterapisinde uygulama alanı geniş olsada, DXR'nin neden olduğu kardiyotoksite ilacın kullanımını sınırlamaktadır. DXR kardiyotoksitesi, ROT oluşumlarından, DXR'nin kardiyolipine bağlanmasından ve DXR'nin kalsiyum metabolizmasını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. DXR'nin kalp

mitokondri iç membranında bulunan kardiyolipine yüksek afinite göstermesi, kardiyolipin-sitokrom C kompleksinin oluşmasını önlemektedir. Bu durum solunum zincirindeki elektron transferinin ve ATP sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Ayrıca DXR, kalp dokusunda iyon kanallarını etkileyerek hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. DXR'nin bu etkileri mitokondri yapı ve fonksiyon bozukluğuna, ve kas kontraktilite kabiliyetinin azalmasına neden olmaktadır (Wallace, 2003; Goormaghtigh et al., 1990; van Norren et al., 2009). Bu yüzden hastalara verilecek DXR dozunun iyi ayarlanması gerekmektedir. Genellikle hastalara uygulanan kümülatif doz vücut yüzeyinin m² si başına 550 mg ile sınırlıdır.

2.6. Sisplatin (cDDP): Etki Mekanizmaları ve Toksisitesi

Sisplatin (sis-diaminodikloroplatinumII;cDDP), birçok kanser tipini tedavi etmek için 1970'li yıllardan bu yana kullanılan bir antineoplastik ilaçtır. cDDP, özellikle baş ve boyun, ovaryum, göğüs, özofagus, testis ve mesane kanser tipleri ile nöroblastom, hepatoblastom, osteosarkom gibi pek çok erişkin ve çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (Brabec and Kasparova, 2005; Bodo et al., 2005; Rosenberg, 1985).

cDDP, cis ve trans konfigürasyonlarında olup, cis formu sitotoksik özellik göstermektedir. Yatay düzlemde, ortada platin atomu etrafında klor ve amonyum atomları olan inorganik bir moleküldür. Molekül formülü C₁₂H₆N₂Pt olup, molekül ağırlığı ise 300.1 gr/mol'dür (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Sisplatin>).



Şekil 2.2. Sisplatinin yapısı

İlacın başlıca klinik toksisite belirtileri bulantı, kusma, alopesi, döküntü, anemi ve kemik iliği baskılanması şeklinde sayılabilir.

Sisplatinin neden olduğu toksik etkiler; genotoksisite, sitotoksisite ve nefrotoksisitedir.

cDDP genotoksisitesi: Sisplatin genotoksik etkisini DNA'ya direk bağlanarak veya serbest radikal oluşumlarına yol açarak göstermektedir. Sisplatinin sulu ortamda Cl iyonlarını kaybederek su molekülleri veya hidroksit iyonlarıyla pozitif yüklü bir bileşiğe dönüşebilmektedir. Oluşan bu aktif yeni bileşik, DNA üzerindeki nükleofilik bölgelerle reaksiyona girebilmektedir (Fuertes et al., 2002; Gentile et al., 1998; Kartalou and Essigmann, 2001). İlacın, DNA'ya direk bağlanması, DNA alkilasyonuna yol açmaktadır. İlaç, direk DNA ile tekli bağ kurabildiği gibi DNA-DNA, DNA-protein arasında çapraz bağlarda kurabilmektedir (Brabec et al.,1990; Jones et al., 1991; Vogel et al., 1991). Özellikle purin bazlarına N7 pozisyonunda bağlanan sisplatin, zincir içi ve zincirler arası kovalent çapraz bağlar oluşturarak DNA'da lezyonların oluşmasına neden olmakta, replikasyon ve transkripsiyonu inhibe etmektedir (Jones et al., 1991; Kliesch and Adler, 1987; Rabik and Dolan, 2007; Sidik, 2003). DNA'da meydana gelen bu lezyonlar hücre döngüsü duraklamasına, hücre ölümlerine veya mutasyonlara neden olmaktadır.

cDDP, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktif oksijen türlerinin oluşumunu indükleyerek de DNA'da mutajenik etki yaratmaktadır (Badary et al., 2005; Baliga et al., 1998; Masuda et al., 1994; Matsushima et al., 1998; Shino et al., 2003). Nitekim, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, cDDP'nin, normal hücrelerde, sister kromatid exchange, kromozom anomalileri ve mikronükleus oluşumlarına neden olduğu rapor edilmiştir (Adler and El-Taras, 1989; Antunes et al., 2005; Antunes et al., 2000; Blasko et al., 1987; Edelweiss et al., 1995; Kliesch and Adler, 1987; Masuda et al., 1994; Ohe et al., 1990; Osanto et al., 1991).

cDDP sitotoksisitesi: Sisplatinin sitotoksik etkisi neden olduğu serbest radikal üretimi ile ilgilidir. ROT üretimi, doku ve organlardaki antioksidant aktiviteyi azaltmakta ve toksisiteye yol açmaktadır. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda cDDP'nin böbreklerde lipit peroksidasyonunu artırdığı ve GSH düzeyinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Amaral et al., 2008; Sıdık, 2003).

cDDP nefrotoksisitesi: cDDP, ant-tümör ilaç olarak kullanılmasına rağmen yüksek dozlarda ROT oluşumlarına neden olduğu için dokularda ototoksisite, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve nörotoksisiteye yol açmaktadır (Mendonc et al., 2009). Renal doku hasarı ve tübüler hücre ölümü, cDDP nefrotoksisitesinin en belirgin histopatolojik özelliğidir. Nefrotoksisite, ilacın en önemli doz sınırlayıcı yan etkisidir. Kanser hastalarında cDDP'nin terapötik dozu intravenöz yoldan 40-175 mg/m² (Weijl et al., 1997) olarak belirlenmiştir.

2.7. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücre ve dokuları serbest radikal hasarından koruyan veya serbest radikalleri nötralize eden moleküllerdir. Antioksidanlar, yapılarına, kaynaklarına ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır.

2.7.1. Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar: Bu gruba bilirubin, glutatyon (GSH), lipoik asit, N-asetil sistein, koenzim Q₁₀, ürik asit molekülleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri ve metal bağlayıcı proteinler (albumin, ferritin, miyoglobin, transferin) girmektedir.

Ekzojen antioksidanlar: Vitamin E (α - tokoferol), vitamin C (askorbik asit), β - karoten, polifenoller gibi bileşikler ekzojen kaynaklı antioksidanlar olup diyetle dışarıdan alınması gerekmektedir (Halliwell and Gutteridge, 1999; Valko et al., 2006).

2.7.2. Yapılarına Göre Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar: Serbest radikalleri, enzimatik aktiviteleri ile detoksifiye eden antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanların başında süperoksit dismutaz enzimi (SOD) gelmektedir. SOD, süpürücü etki göstererek, süperoksit radikalini, H₂O₂'ye dönüştürmektedir. Stoplazmada bulunan glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ise elektron akseptörü olarak GSH'ı kullanmakta ve oluşan hidrojen peroksiti H₂O'ya indirgemektedir. GPx'in bu katalitik reaksiyonu ile H₂O₂'den OH radikal oluşumu önlenmektedir. Okside olan glutatyonu tekrar redükte formuna çeviren enzim ise glutatyon redüktaz (GR)'dir ve elektron donörü olarak NADPH molekülünü kullanmaktadır. Hücrede bulunan antioksidan enzimlerden bir diğeri katalaz enzimidir. Katalaz, H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanmasını katalizlemektedir (Valko et al., 2006; Fang et al., 2002).

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

2.7.3. Etki mekanizmalarına Göre Antioksidanlar

Katalitik etkili antioksidanlar: Serbest radikallerin, enzimatik aktivitelerle zararlı etkilerinin önlenmesidir. Katalaz, SOD ve GPx katalitik etkileri olan antioksidanlardır.

Giderici etkili antioksidanlar (quencher): Serbest radikal oluşumunun antioksidanlar tarafından baskılandığı mekanizmalardır. Karotenoidler bu gruba girmektedir. β -karoten, singlet oksijen radikali üzerinde en iyi giderici etki gösteren antioksidandır.

Süpürücü etkili antioksidanlar (scavenge): Antioksidanların, aktif radikallerle (hidroksil, süperoksit ve lipit peroksil radikalleri) direk etkileşimiyle veya zincirleme reaksiyonları kırarak etkilerini göstermeleridir. Süpürücü etki gösteren antioksidanlar, oksidanlara bir H^+ aktararak onların aktivitelerini önlemektedirler. GSH, vitamin E, vitamin C, melatonin, flavonoidler ve polifenollerin redükleyici fonksiyonları sayesinde serbest radikaller ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. En etkili zincir kırıcı antioksidan olan vitamin E, lipit peroksidasyonunda oluşan peroksil radikale bir H atomu vererek zincirleme reaksiyonları engellemektedir.

Önleyici etkili antioksidanlar: Ferritin, seroplazmin, albumin gibi metal bağlayan proteinler sayesinde serbest metal kaynaklı ROT oluşumu engellenmektedir. Glutasyon peroksidaz ve katalazın hidrojen peroksiti suya indirgemesi ile hidroksil radikalının oluşması önlenmektedir.

2.7.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksidin, radikal olmayan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşmesini katalizleyen önemli bir endojen antioksidan enzimdir. SOD'un katalizlediği reaksiyonda, radikal olmayan ürünler oluştuğu için dismutasyon olarak adlandırılmaktadır. SOD, insanda üç farklı izoforma sahiptir. Bunlar sırasıyla stoplazmada bulunan Cu-Zn SOD, mitokondri ve peroksizomlarda bulunan Mn-SOD ve ekstrasellüler bölgede bulunan EC-SOD enzimleridir. Hücrede en bol bulunan izomer Cu-Zn SOD'dur. SOD'un temel fonksiyonu hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korumaktır. SOD, aerobik hücrelerin çoğunda ve ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır (Zelko et al., 2002; Johnson and Giulivi, 2005). Yüksek aktivitedeki SOD, hücrelerin oksidatif strese karşı toleransını artırmaktadır.

2.7.5. Glutasyon (GSH)

Endojen antioksidan olan glutasyon, ökaryotik hücrelerde bol miktarda bulunan, düşük molekül ağırlıklı bir tripeptiddir. Yapısında γ -glutamik asit, glisin ve sistein aminoasitleri olup, aktif sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. GSH, hücreleri serbest radikallerden korumada radikal süpürücü olarak görev yapan bir antioksidandır. Hidroksil ve singlet oksijen radikallerini doğrudan yakalayarak hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır. GSH'ın oksidatif strese karşı hücreyi koruyucu özelliğinin yanında hücrel redoks düzeyinin idamesinin sağlanmasında da önemli rol oynamaktadır (Giles, 2006). GSH özellikle, metabolizma, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi proseslerde önemli olan proteinlerin sülfidril gruplarının redükte durumda kalmasını sağlayan bir moleküldür. Bunlara ek olarak GSH'ın, hücrel sistein depo kaynağı, Ca^{+2} homeostasisi regülatörü ve immun sistemle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Filomeni et al., 2002; Estrela et al., 2006; Townsend et al., 2003).

GSH, hidrojen peroksit ve lipit hidroksiperoksidazların detoksifikasyonunda görevli glutasyon peroksidazın substratıdır. GSH'ın peroksitlerle ve disülfitle reaksiyonu sonucu glutasyonun okside formu olarak bilinen glutasyon disülfid (GSSG) oluşmaktadır. Daha sonra GSSG hızlı bir şekilde glutasyon redüktaz ile glutasyona indirgenmektedir. Oksidatif stres durumunda glutasyon redüktaz aktivitesi artırılarak veya GSSG hücreden uzaklaştırılarak GSH/GSSG redoks dengesi sağlanmaktadır.

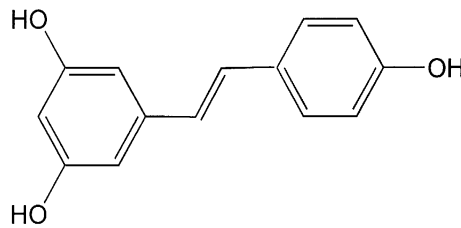
GSH, enzimatik (glutasyon-S-transferaz enzimi ile) veya enzimatik olmayan yollarla bazı ksenobiyotiklere bağlanabilmektedir. Oluşan GSH konjugatlarının hücreden uzaklaştırılması sonucunda hücrel GSH konsantrasyonu düşmektedir (Townsend and Tew, 2003). Hücrelerde tükenen GSH'ın yerine konulması gerekmektedir.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

2.7.6. Resveratrol

Resveratrol, besinlerle dışarıdan alınan ekzojen kaynaklı bir antioksidandır. Üzüm tanelerinin kabuklarında bol miktarda bulunan resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), doğal, stilben yapısında bir polifenolik bileşiktir. Resveratrolün fitoaleksinin özelliği sayesinde, bitkiler, *Botrytis cinerea* enfeksiyonu gibi fungal enfeksiyonlara karşı doğal bir

şekilde korunmaktadır (Hain et al.,1990). Resveratrol, kuraklık, ultraviyole ışınlar gibi çevresel etmenlerin neden olduğu çeşitli hasarlara karşı da bitkiler üzerinde koruyucu etki göstermektedir (Aggarwal et al. 2004; Langcake and Pryce, 1976; Li, 2006). İlk olarak 1940 yılında *Veratrum grandiflorum* O. Loes (yalancı beyaz çöpleme) bitkisinin köklerinden izole edilmiştir (Takaota'dan aktaran Baur and Sinclair, 2006). 1963 yılında, resveratrol, özellikle uzak doğu ülkelerinde deri hastalıklarını tedavi etmede kullanılan *Polygonum cuspidatum* (çobandeğneği) bitkisinin köklerinden elde edilen aktif bir bileşen olarak tanımlanmıştır (Nonomura'dan aktaran Baur and Sinclair, 2006; Burns et al. 2002). Daha sonraki yıllarda *Vitis vinifera* (asma), *Arachis hypogaeae* (yerfıstığı), *Vaccinium myrtillus* (çoban üzümü), *Vaccinium vitis-ideae* (kekreyemiş), *Vaccinium macrocarpes* (turnayemişi), *Humulus lupulus* (şerbetçiotu), *Rheum rhaponticum* (kuzukulağı), *Eucalyptus* L. (ökaliptus) ve *Yucca* L. (avize ağacı) gibi 70'in üzerinde bitki türünde resveratrolün varlığı tespit edilmiştir (Baur and Sinclair, 2006).

Resveratrol doğada cis ve trans konfigürasyonlarında bulunmasına rağmen trans konfigürasyonuna daha sık rastlanılmaktadır (Ndiaye et al. 2011). Molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ olup, molekül ağırlığı ise 228.25 gr/mol'dür. Oral yolla alındıktan 30-60 dakika sonra metabolize olmakta ve sıklıkla karaciğer ve onikiparmak bağırsaklarında konjugasyon ile glukuronoid ve sülfat metabolitlerine dönüşmektedir (Ndiaye et al. 2011). Bazı çalışmalarda resveratrol metabolitlerinin biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Boocock et al., 2007; Vitrac et al., 2003; Hoshino et al., 2010; Calamini et al., 2010).



Şekil 2.3. Resveratrolün yapısı

Toksisite çalışmaları, resveratrolün LD50 (%50 letal doz) dozunun günlük 2 gr'dan yüksek olduğunu göstermektedir. Sıçanlara gavaj ile 28 gün boyunca 300, 1000 ve 3000 mg/kg bw dozlarında resveratrol uygulaması sonucunda 3000mg/kg bw doza karşı yan etkiler olduğu görülmüştür (Crowel et al., 2004; Hebbbar et al., 2005). NIEHS 2002 raporuna göre resveratrolün sıçanlarda yan etki oluşturmayan günlük dozunun

(NOAEL=No-Observed-Adverse-Effect-Level) 300 mg/kg bw olduğu belirtilmektedir (NIEHS, 2002).

Resveratrolün in vitro bakteriyel mutajenite testinin (Ames) sonucu negatiftir (Edwards et al.,2011; Matsuoka et al.,2001). Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da 2,000 mg/kg bw doza kadar klastojenisite açısından negatif sonuçlar elde edilmiştir (Williams et al., 2009).

Resveratrolün, anti-kanser, anti-genotoksik, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-oksidan gibi birçok biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır.

2.7.6.1. Resveratrolün kardiovasküler sistem üzerine etkileri: 1992 yılında, diyetle makul düzeylerde alınan şarabın (20-30gr/günde), Fransa'da, koroner kalp hastalıklarından (KKH) dolayı görülen ölüm riskini %40 oranında azalttığını gösteren bir çalışma, şarabın içerisindeki maddelerden biri olan resveratrolü ilgi odağı haline getirmiştir (Renauld and de Lorgeril, 1992). Dünyadaki birçok gelişmiş ülkenin tersine, Fransa'da, kolesterolce yüksek, doygun yağca zengin bir beslenmeye rağmen KKH'den dolayı görülen ölüm oranının düşük olması "Fransız Paradoksu" olarak adlandırılmaktadır (Ferrie, 2004). Fransız paradoksunu destekleyen bazı çalışmalarda, resveratrolün, platelet agregasyonu ve kolesterol oksidasyonunu inhibe ederek kan-damar hastalıkları için iyi bir serbest radikal süpürücü rolü üstlendiği belirtilmektedir (Ferrie, 2004; Frankel, 1993; Pace-Asciak et al., 1995; Szekeres et al., 2011).

2.7.6.2. Resveratrolün anti-kanser etkileri: Resveratrolün, prostat, akciğer, göğüs, kolon, ovaryum, tiroid, deri ve pankreas kanserleri ile lösemi, lenfoma gibi birçok insan kanser tipini önlediği ve kemopreventive etkisi olduğu yapılan çalışmalarda rapor edildi (Athar et al. 2007; Baur and Sinclair 2006). Resveratrolün kemopreventive etkisi ilk defa 1997 yılında ortaya konuldu. Yapılan bir çalışmada, resveratrolün, malignant hücrelerde özellikle DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek tümör hücrelerinin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Szekeres et al., 2011; Fontecave et al., 1998). Ayrıca resveratrolün, kanserli hücrelerde, NFκB aktivasyonunu inhibe ederek ve TNFα üretimini azaltarak tümör gelişimini önlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Holmes et al., 2000; Banerjee et al., 2002; Manna et al., 2000; Martin et al. 2006). NFκB, hücrel redoks statüsündeki değişmelere cevap veren önemli transkripsiyon faktörlerinden biri olmasına rağmen regülasyon mekanizması oldukça karmaşıktır (Meyer et al. 1993; Schmidt et al. 1995; Holmes et al. 2000; Draczyska et al.1998). NFκB, hücre

proliferasyonu, transformasyonu ve tümör gelişiminde rolü olan bir moleküldür. Resveratrol, tümör gelişiminin daha sonraki aşamaları olan anjiogenez ve metastaz safhalarında da etkili olmaktadır. İnsan umbilikal vein endotelial hücreleriyle yapılan bir çalışmada, resveratrolün, VEGF indüklü angiogenezi inhibe ettiği ve VE-cadherin ve β catenin aktivitelerini engellediği gösterilmiştir (Lin et al. 2003)

2.7.6.3. Resveratrolün anti-oksidan etkileri: Yapılan çalışmalar resveratrolün iyi bir antioksidan olduğunu göstermektedir (Aftab et al. 2010; Rubilio et al., 2008). Resveratrolün antioksidan etkisinin hangi mekanizmalar ile olduğu konusundaki bilgiler yetersizdir. Resveratrolün bu etkisinin onun direk antioksidan fonksiyonundan ve/veya anti-oksidan mekanizmaları aktive etme yeteneğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fenolik antioksidanlar, serbest radikallerle girdikleri reaksiyonlarda hidrojen atomu vericisi veya elektron vericisi olarak davranabilmektedirler. Resveratrolün çoğunlukla hidrojen atomu vericisi olduğu belirtilmektedir (Tang et al., 2011). Resveratrolün yapısındaki hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda 4 OH'nin 3 ve 5 OH'dan daha aktif olduğu tespit edildi (Caruso et al., 2004; Mikulski et al., 2010; Queiroz et al., 2009). Bir çalışmada, resveratrolün OH radikalleri ile oldukça etkin biçimde reaksiyona girdiği ve bu şekilde radikal süpürücü olarak fonksiyon gördüğü belirtildi (Leonard et al., 2003). Başka bir çalışmada, 30 ve 90 μ M'lık dozlarında uygulanan resveratrolün, H₂O₂ ile oksidatif strese indüklenen sıçan fibroblast kültüründe ortaya çıkan reaktif oksijen birikimlerini %26.4-%57.3 azalttığı gösterildi (Sgambato et al., 2001). Ayrıca resveratrolün lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği yapılan lipid peroksidasyon ölçümleriyle gösterildi (Leonard et al., 2003). Resveratrolün anti-oksidan fonksiyonunun, oksidatif DNA üzerinde de etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada bir karsinojen olan potasyum bromid ile indüklenen böbrek hücrelerinde ortaya çıkan oksidatif DNA hasarını resveratrolün anlamlı düzeyde azalttığı gösterildi (Cadenas and Barja, 1999). 30 μ M'lık resveratrolün kullanıldığı başka bir çalışmada, TAR ile (sigara dumanı) fragmentasyona indüklenen DNA'da ortaya çıkan kırıkların anlamlı düzeyde azaldığı ifade edildi (Sgambato et al., 2001).

Resveratrol, hücrel antioksidan sistemin aktivitesi üzerinde de etkili olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, oksidatif strese indüklenen sıçan karaciğer hücrelerinde, resveratrolün, detoksifikasyon mekanizmalarını düzenlediği, özellikle katalaz, SOD, glutatyon redüktaz, NADPH kinon oksiredüktaz ve glutatyon S transferaz enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı ve oksidatif hasarı azalttığı belirtilmektedir (Rubilio et al., 2008).

Aynı çalışmanın devamında, resveratrolün, SOD, glutasyon redüktaz, katalaz gibi enzimlerin ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörü Nrf2 üzerinde de etkili olduğu gösterildi (Rubilio et al., 2008). Başka bir çalışmada, 10 günlük uygulama periyodunda, 30 mg/kg bw dozundaki resveratrolün, sıçanların beyin, akciğer, karaciğer, böbrek ve testis dokularındaki akrilamid indüklü artmış malondialdehit (MDA) düzeylerinde anlamlı bir azalmaya, azalan glutasyon (GSH) düzeylerinde de anlamlı bir artışa neden olduğu gözlemlendi (Alturfan et al. 2012). Çok yüksek miktarlarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde SOD aktivitesi düşmektedir. İn vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda, siklosporin, LPS (lipopolisakkarit), glutamat gibi indükleyici ajanlarla oksidatif stres oluşturulan modellerde, resveratrolün karaciğer, kalp, böbrek dokuları ile hücre kültürlerindeki azalmış SOD aktivitelerini anlamlı olarak yükselttiği ifade edilmektedir (Chander et al., 2005; Fukui et al., 2010; Rubilio et al., 2008; Sebai et al., 2011). Resveratrol etkinliği ile SOD aktivitesini karşılaştıran bir çalışmada da, LPS veya PMA'nın indüklediği süperoksit radikal oluşumunun neden olduğu artmış AA (Arachidonic asit) salınımını resveratrolün (30µM) %56, SOD'un ise %48 inhibe ettiği rapor edildi (Martinez and Moreno, 2000).

2.7.6.4. Resveratrolün apoptosise etkileri: Kanser tedavisinde önemli stratejilerden biri hücrelerde apoptosisi indüklemektir. Yapılan çalışmalarda, resveratrolün apoptosisi farklı mekanizmalar üzerinden etkilediği ve bu etkilerin hücre tipine ve uygulanan resveratrol konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Prostat, göğüs, deri, pankreas, akciğer ve leukemia gibi kanser hücre serilerinde (Aziz et al.,2005; Cecchinato et al., 2007; Kim et al., 2003; Kotha et al., 2006; Kuo et al., 2002; Li et al., 2006; Shih et al., 2004) ve bazı in vivo modellerde (Aggarwal, et al., 2004; Aziz et al., 2003; Carbo et al., 1999), resveratrolün, apoptosisi indüklediği tespit edildi. Resveratrol, p53 ve Bax aktivasyonu veya Bcl2, Bcl-XL, survivin ve apoptosisi inhibitörlerinin (IAPs) inaktivasyonunu sağlayarak apoptosisi indüklemektir (Aggarwal et al., 2004; Alkhalaf 2007; Delmas et al., 2003; Jiang et al. 2005; Kim et al., 2003; Kim et al., 2004; Narayanan et al., 2003). Resveratrolün, NFκB transkripsiyonunu inhibe edici fonksiyonu sayesinde p53 proteini aktive olmakta ve dolayısıyla hücre apoptoza sürüklenmektedir (Gao et al., 2001).

Resveratrolün apoptotik etkisinin yanında anti-apoptotik etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Csaki et al. 2008; Kumar et al. 2007). Bir çalışmada, resveratrolün, ROT oluşumunu azaltarak, artmış intraselüler Ca⁺² seviyesini düşürdüğü ve

Kaspas 3 aktivasyonunu inhibe ederek apoptosisi önlediği gösterildi (Zhao et al., 2009). Başka çalışmalarda da oksidatif stres oluşturulmuş sıçan karaciğer (Rubilio and Vega 2008) ve PC12 (sıçan pheochromocytoma) hücre serilerinde (Jang and Surh 2001), indüklenmiş apoptosisin resveratrol tarafından engellendiği gösterildi.

2.7.6.5. Resveratrolün inflamasyona etkileri: İnflamasyon, doku ve organlarda hasarlara ve birçok hastalıklara neden olmaktadır. Kronik inflamasyon hastalıklarına romatid artrit ve bazı bağırsak hastalıkları örnek verilebilir (Yamanishi et al., 2002). Resveratrolün, inflamasyonla ilgili moleküller üzerinde inhibisyon etkisi bulunmaktadır (Sebai et al., 2011; Tsai et al., 1999). Enfeksiyon durumunda, bağışıklık cevabı oluşmasındaki önemli yollardan biri NF- κ B yolağıdır. Resveratrolün, NF- κ B aktivasyonu ile indüklenen IL-1 β 'yi baskıladığı ve bu sayede IL-1 β 'nin insan kondrositlerinde yol açtığı sitotoksik ve apoptotik etkilerini azalttığı belirtilmektedir (Csaki et al. 2009). Diğer taraftan, resveratrol, NF κ B'nin transkripsiyonel aktivitesini önleyerek NO salınımını azaltmaktadır. LPS (lipopolisakkarit) indüksiyonu, memeli hücrelerinden genellikle monositleri, makrofajları, endotel hücreleri ve nötrofilleri stimüle ederek bu hücrelerden iNOS aktivasyonu ile NO salınmasına neden olmaktadır. Normalde, bakteriyel lipopolisakkarit olan LPS'ye karşı iNOS ekspresyonu ile düşük konsantrasyonda NO üretilerek antimikrobiyal aktivite gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlardaki NO, inflamasyona neden olmaktadır. Bir çalışmada, resveratrolün, iNOS geninin aktivasyonunda rolü olan transkripsiyon faktörlerinden biri olan NF κ B'nin promotöre bağlanmasını inhibe ettiği ve bu sayede NO salınımının azalmasını sağladığı belirtilmektedir (Tsai et al., 1999).

Oksidatif stres ile indüklenen inflamasyonda, transkripsiyon faktörü NF κ B 'nin aktivasyonu ile pro-inflamatory sitokinlerin (TNF α) aktivasyonu sağlanmaktadır. TNF α , hücre proliferasyonu, inflamasyon ve lipid metabolizmalarını indükleyen önemli bir moleküldür (Chen et al., 2009; Yen et al., 2011). Resveratrolün, TNF α tarafından indüklenen adipokin ve oksidatif stres değişimleri üzerine etkisini göstermek için yapılan başka bir çalışmada, 3T3-L1 adiposit hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada TNF α indüklenmesi ile artan interlökin-6 (IL-6) salınımı ve ROT üretimini, resveratrolün (25-100 μ M) konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği gösterildi. Ayrıca, resveratrolün TNF α 'yı inhibe ettiği ve azalmış SOD aktivitesi ile GSH düzeylerini anlamlı olarak artırdığı ifade edildi (Yen et al., 2011). Başka bir çalışmada, resveratrolün, oksidatif strese

maruz kalan TM (Trabecular meshwork) hücrelerinde inflamatuvar markırlarının (IL1 α , IL6, IL8 ve ELAM-1) üretimini baskıladığı ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumlarını engellediği rapor edildi (Luna et al. 2009).

2.7.6.6. Resveratrolün hücre döngüsüne etkileri: Hücre döngüsü, siklin protein kinazlar (cdk) ve siklinler tarafından kontrol edilmektedir. Siklinlerin inhibisyonu, hücre döngüsünün belli safhalarda durmasına neden olmaktadır. Resveratrol, hücreleri G1, G1/S, S, ve G2/M fazlarında duraklatabilmektedir.

G1 ve G1/S fazlarının inhibisyonunda, resveratrol, p53 indüksiyonu ile p21 ve p27'in (cdk inhibitörleri) aktive edilmesini sağlamaktadır. p21 ve p27 aktivasyonu, G1 fazında cdk4'ü, G1/S geçişinde ise cdk 4, 6, 2 kinazları inhibe ederek Rb'nin (retinoblastoma tümör baskılayıcı proteini) fosforilasyonunu ve hiperfosforilasyonunu engellemektedir. Rb'nin fosforilasyonunun azalması G1 fazının, Rb hiperfosforilasyonunun azalması ise G1/S geçişinin duraklamasına neden olmaktadır (Ahmad et al., 2001; Zhang et al., 2004). Resveratrol, ayrıca, G1 ve G1/S fazlarında görev alan siklinler (D1, D2, E) ile siklin kinazların (cdk 4, 6, 2) üretiminde rolü olan transkripsiyon faktörü NF- κ B üzerinden de inhibisyon yapabilmektedir (Jeong et al., 2004).

Resveratrol, Rb defosforilasyonunu indükleyerek veya cdk1 defosforilasyonunu inhibe ederek S fazını duraklatabilmektedir (Delmas et al., 2002; Wolter et al., 2001). Bazı yayınlarda, resveratrolün, ribonükleotid sentaz ve DNA polimeraz enzimlerini inhibe ederek DNA sentezinin engellenmesine ve S fazının duraklamasına neden olduğu belirtilmektedir (Fontecave et al., 1998; Stivala et al., 2001). Resveratrol, cdk1'in aktive edilmesinde rolü olan cdk7'yi inhibe ederek, G2/M geçişini de duraklatabilmektedir (Benitez et al., 2007; Liang et al., 2003).

Resveratrolün, hücre döngüsü fazlarının dağılımı üzerindeki etkisi, yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Sgambato'nun yaptığı bu çalışmada, IC₅₀ değerlerine uygun konsantrasyonlarda resveratrol uygulanan hücre sıralarındaki hücre döngüsü fazlarının dağılımlarının kontrollerinden anlamlı düzeyde farklı olduğu gösterilmiştir. Özellikle MCF-7 ve HeLa hücre sıraları dışında diğer tüm hücre sıralarında, G2/M fazındaki hücre sayılarının kontrollerine göre ciddi anlamda düştüğü, S fazında da yükseldiği ifade edilmiştir. Bu etkinin moleküler düzeyde, resveratrolün, DNA polimeraz aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (Sgambato et al., 2001).

2.7.6.7. Resveratrolün hücre proliferasyonuna etkileri: NF- κ B, hücre proliferasyonu ve büyümesinde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür. (Jo et al., 2000; Liu et al., 1996; Wang et al., 1996). Resveratrol, NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek proliferasyonu ve hücre çoğalmasını engellemekte ve S fazı duraklamasına neden olmaktadır (Estrov et al., 2003; Gao et al., 2001). Hatta NF- κ B'nin inaktivasyonu apoptosisi indükleyen p53'ün ekspresyonuna yol açmaktadır (Estrov et al., 2003; Gao et al., 2001; Mahyar-Roemer et al., 2001). Çeşitli kanser hücre kültürleri (AML, gastrik, pankreatik, kolon, melanoma, prostat, epidermoid karsinoma vb) ile yapılan çalışmalarda, resveratrolün hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir (Bhat and Pezzuto, 2001; Ding et al., 2002; Estrov et al., 2003; Fuggetta et al., 2006; Holian et al., 2002; Hsieh et al., 2005; Kampa et al., 2000; Kim et al., 2006).

Bazı kanser ve normal hücre serileri ile yapılan bir çalışmada resveratrolün anti-proliferatif etkisi IC_{50} değerlerine bakılarak gösterildi. Çalışmada, IC_{50} değerleri, hücre tipine bağlı olarak 22-100 μ M arasında değiştiği; fakat, test edilen tüm hücre tiplerinde resveratrol konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğu vurgulandı. Hem normal, hem de kanser hücrelerinde görülen bu etkinin, resveratrolün direk sitotoksik etkisinden olamayacağı, çünkü, kültürlerde sınırlı sayıda ölü hücre saptandığı ifade edildi. Bu yüzden, resveratrolün bu etkisinin hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsünü S/G2 sınırında duraklatmasından kaynaklanabileceği öngörüldü (Sgambato et al., 2001). Yapılan başka bir çalışmada da, normal insan kemik iliği hücrelerinin, lösemik hücrelere göre resveratrole karşı daha az duyarlı olduğu belirtilmektedir. Örneğin, normal insan kemik iliği hücrelerindeki IC_{50} değerinin 60 μ M iken, çeşitli insan lösemik hücre kültürü modellerinde IC_{50} değerlerinin 5.07-42.76 μ M arasında değiştiği belirtilmektedir (Ferry-Dumazet et al., 2002).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Deney İçin Gerekli Kimyasal Maddeler

Entellan	(Merck 107960)
Giemsa	(Sigma 32884)
Resveratrol	(Sigma 501360)
Doksorubisin	(Adriablastina, Cas no:23214-92-8)
Sisplatin	(Platinil, Cas no: 15663-27-1)
Kolşisin	(Sigma C 9754)
Potasyum Siyanür	(Aldrich 20, 781-0)
Glasiyal metafosforik asit	(Sigma M 5043)
Tiyobarbitürik asit	(Merck UV 550480)
Trikloro asetik asit	(Sigma T 9159)
HCl	(Riedel-de Haen 30721)
Sodyum klorür	(Merck K 21787500)
EDTA	(Sigma E 9884)
Gultasyon	(Sigma G 3664)
Glasiyel asetik asit	(Merck 100063)
NaOH	(Merck KB 102462)
Na ₂ HPO ₄	(Sigma S 9763)
NaHPO ₄	(Sigma S 8282)
Sodyum sitrat	(Merck K 22028732)
KCl	(Merck TA 659635)
Na ₂ CO ₃	(Merck K28996729)
Ksantin	(Sigma X 2502)
Nitrobluetetrazolyum	(Sigma N 6876)
Bovine serum albumine	(BSA) (Sigma
Ksantin Oksidaz	(Sigma X 1875)
Na-K tartarat	(Sigma S 6170)
CuSO ₄	(Merck A 810587)
Folin ayıracı	(Sigma F 9252)

N-Naphthylethylene daimine	(Sigma N 9125)
Sülfanamide	(Sigma S 9251)
Glisin	(Sigma G 7403)
Sodyum borat	(Sigma S 9640)
Cadmiyum	(Fluka 00623)
Sodyum nitrat	(Sigma S 8170)
Sodyum nitrit	(Sigma S 2252)
L-hidroksiprolin	(Sigma H 5534)
3-sikloheksilamino-1-propan	(Sigma C 6070)

3.1.2. Deney İçin Gerekli Olan Cihazlar

Etüv	(Heraus)
Trinoküler Araştırma Mikroskobu	(Zeiss)
Vortex	(VELP Scientifica)
Buzdolabı (+ 4°C)	(AEG 1400 P)
Santrifüj Tüpü	(TPP)
Otomatik Pipet Seti	(Eppendorf)
Mini Santrifüj	(Eppendorf Mini Spin F45-12-11)
Soğutmalı Santrifüj (+ 4°C)	(Hettich Zentrifugen, Rotanta 460 R)
Spektrofotometre	(Biochrome WPA Biowave, S2100)
Spektrofotometrik ölçüm için küvet	(Biochrome, Type 40 00 9143)
Derin Dondurucu (- 86°C)	(Nuare, Ultraflow Freezer)
Derin Dondurucu (- 20°C)	(Arçelik 2031 D)
Hassas Terazi	(Scaltec SBC31)
Mikrodalga Fırın	(Vestel)
Benmari	(Nüve BM 402)
Homojenizatör	(Ultra-Turrakks T25)
Hassas terazi	(Sartorius BL2105)
Manyetik karıştırıcı	(Heidolph MR 301)
pH metre	(Crison GLP 22)

3.1.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Bu çalışmada seksüel olgunluğa erişmiş 150-200 gr ağırlığında 6 haftalık Wistar cinsi albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların 6 haftalık olarak seçilmesinin nedeni, bu dönemin, hayvanların olgunluk devresini ilk basamağını oluşturması ve yaşlılık sebebiyle meydana gelebilecek olan kromozom hasarlarının yol açabileceği değerlendirme hatalarını ortadan kaldırmasıdır (Antunes and Takahashi, 1998).

Deneylerde kullanılan hayvanlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden (DETAB) sağlandı.

Deney hayvanlarının genel bakımları DETAB tarafından yapılırken deneye alınan hayvanların gözetim ve bakımı bizzat araştırmacı tarafından üstlenildi. Çalışma süresince, deney ve kontrol gruplarındaki hayvanlar DETAB'ın standart koşulları olan 22 ± 5 °C sıcaklıkta, 50 ± 20 bağıl nem ortamında 12 saat karanlık 12 saat aydınlık evrede tutulup, standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

3.1.4. Kontrol ve Deney Grupları

Kontrol ve deney gruplarının her birinde 6'şar hayvan olacak şekilde toplam 9 grup oluşturuldu (Tablo 1).

Grup 1: Kontrol grubu: 2 cc bidistile su intraperitoneal verildi.

Grup 2: Resveratrol (RES, 12,5 mg/kg bw) grubu: RES, dozu 12,5 mg/kg bw hazırlandı ve hayvanlara 24 saat boyunca 5 kez intraperitoneal uygulandı.

Grup 3: Resveratrol (RES, 25 mg/kg bw) grubu: RES, dozu 25 mg/kg bw olarak ayarlandı ve hayvanlara 24 saat boyunca 5 kez intraperitoneal uygulandı.

Grup 4: Doksorubisin (DXR, 90.0 mg/kg bw) grubu: DXR, distile su ile sulandırıldıktan sonra tek doz intraperitoneal (i.p.) uygulandı.

Grup 5: Sisplatin (cDDP, 5.0 mg/kg bw) grubu: cDDP, distile su ile sulandırıldıktan sonra tek doz intraperitoneal uygulandı.

Grup 6: Doksorubisin (DXR, 90.0 mg/kg bw) + Resveratrol (RES, 12.5 mg/kg bw) grubu: RES, DXR uygulamasından yarım saat önce, DXR ile birlikte ve bunu takiben her 6 saatte bir olacak şekilde toplam 5 doz intraperitoneal uygulandı.

Grup 7: Doksorubisin (DXR, 90.0 mg/kg bw) + Resveratrol (RES, 25.0 mg/kg bw) RES, DXR uygulamasından yarım saat önce, DXR ile birlikte ve bunu takiben her 6 saatte bir olacak şekilde toplam 5 doz intraperitoneal uygulandı.

Grup 8: Sisplatin (cDDP, 5.0 mg/kg bw) + Resveratrol (RES, 12.5 mg/kg b.w.) grubu: RES, cDDP uygulamasından yarım saat önce, cDDP ile birlikte ve bunu takiben her 6 saatte bir olacak şekilde toplam 5 doz intraperitoneal uygulandı.

Grup 9: Sisplatin (cDDP, 5.0 mg/kg bw) + Resveratrol (RES, 25.0 mg/kg bw) grubu: RES, cDDP uygulamasından yarım saat önce, cDDP ile birlikte ve bunu takiben her 6 saatte bir olacak şekilde toplam 5 doz intraperitoneal uygulandı.

Bütün hayvanlar DXR ve cDDP uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden 75 dk. önce hayvanlara kolşisin (sigma, C9754) gram başına 0.01 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi.

Tablo 3.1. Çalışma ve kontrol grupları

Grup 1	n=6	Kontrol grubu, 2 cc bidistile su, i.p.
Grup 2	n=6	RES (12,5 mg/kg), i.p.
Grup 3	n=6	RES (25 mg/kg), i.p.
Grup 4	n=6	DXR (90 mg/kg), i.p.
Grup 5	n=6	cDDP (5 mg/kg), i.p.
Grup 6	n=6	DXR (90 mg/kg) i.p. + RES (12,5 mg/kg) i.p.
Grup 7	n=6	DXR (90 mg/kg) i.p. + RES (25 mg/kg) i.p.
Grup 8	n=6	cDDP (5 mg/kg) i.p.+ RES (12,5 mg/kg) i.p.
Grup 9	n=6	cDDP (5 mg/kg) i.p.+ RES (25 mg/kg) i.p.

RES resveratrol, *DXR* Doksorubisin, *cDDP* Sisplatin

3.1.5. Doksorubisin (DXR) Dozu ve Uygulanışı

Deneyde kullanılan antitümör ilaç doksorubisin (Adriablastina, Cas no:23214-92-8) yerel eczaneden (Kocaeli) 50 mg'lık flakon olarak satın alındı. Herbir flakon 5 ml bidistile su ile çözüldü ve hayvanlara 90 mg/kg b.w. olacak şekilde i.p. olarak enjekte edildi. Sıçan kemik iliğinde kromozom anomalilerinin indüklenmesinde etkin DXR dozunun 90 mg/kg bw olduğu rapor edilmiştir (Antunes and Takahashi, 1998).

3.1.6. Sisplatin (cDDP) Dozu ve Uygulanışı

Sisplatin (Platinil, Cas no: 15663-27-1) yerel eczaneden (Kocaeli) 50 mg/100ml'lik flakon olarak satın alındı. 50 mg/100 ml'lik solusyondan 5 mg/kg bw olacak şekilde i.p. olarak hayvanlara enjekte edildi. Sıçan kemik iliğinde kromozom anomalilerinin

indüklenmesinde etkin cDDP dozunun 5 mg/kg bw olduğu rapor edilmiştir (Antunes et al., 2000).

3.1.7. Resveratrol (RES) Dozu ve Uygulanışı

Moleküler saflıkta resveratrol (trans 3-4',5-trihydroxystilbene, sigma, Cas no: 501-36-0) İnterlab (İstanbul) firmasından satın alındı ve %95'lik etilalkolde çözüldü. Etil alkol ile stok çözelti 50 mg/ml olarak hazırlandı. Resveratrol, enjeksiyonlardan hemen önce bidistile su ile sulandırıldı. Uygulamadan önce, bu stok çözeltinin 0,05 ml'sine 0,45 ml distile su eklenerek son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. RES uygulaması, DXR veya cDDP uygulamasından yarım saat önce, DXR veya cDDP ile birlikte ve bunu takiben her 6 saatte bir olacak şekilde toplam 5 doz olarak (kümülatif doz 62.5-125 mg/kg bw) ve intraperitoneal uygulandı

3.1.8. Kolşisin Dozu ve Uygulanışı

0,08 gr kolşisin steril olarak tartılarak 100 ml distile suda sulandırıldı. Servikal dislokasyondan 70 dakika önce sıçana gram başına stok solüsyondan 0,01 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi (Ford and Hamerton, 1956).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kromozom Anomalilerinin Tespiti

3.2.1.1. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Carnoy's fiksatif solüsyonu

Methanol (3 kısım)	75 ml
Glacial asetik asit (1 kısım)	25 ml

(Her kullanımda taze olarak hazırlanır)

Hipotonik Solüsyon

Potasyum klorür	5,6 gr
Distile su	1000 ml

(KCl solüsyonu 0,075M olarak hazırlanır ve oda sıcaklığında 2-3 hafta saklanabilir)

Kolşisin Solüsyonu

Kolşisin (liyofilize) 0,08 gr

Distile su 100 ml

(Steril olarak hazırlanır. Stok solüsyon 2-5 °C’de birkaç ay saklanabilir)

Fosfat AB Tampon Solüsyonu

Sol A: KH₂PO₄ 9,08 gr 1000 ml’de çözülür

Sol B: Na₂HPO₄ 9,47 gr 1000 ml’de çözülür

AB buffer ⇒ 200 ml Sol A + 800 ml Sol B karıştırılarak elde edilir.

(pH 6,8’e HCl veya NaOH kullanılarak ayarlanır)

Giemsa Boya Solüsyonu (%8’lik)

Giemsa boyası 8,0 ml

AB tampon solüsyonu 2,0 ml

Distile su 90,0 ml

(Her boyama için taze olarak hazırlanır)

3.2.1.2. Sıçan Kemik İliği Hücrelerinin Eldesi

Kemik iliklerinin çıkarılmasında hipotonik şok tekniği kullanıldı. 37 °C’de ısıtılmış 0,075 M KCl ile femurlardan kemik ilikleri çıkarıldı ve materyal 25 dk etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra materyal 1000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Üst kısımdaki süpernatant atıldı. Dipteki peletin üzerine yavaş yavaş metanol/asetik asit (3:1) karışımından oluşan fiksatif eklendi. Fiksatif içinde 25 dk. bekletildikten sonra materyal 1000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Fiksatif ile yıkama işlemi üç kere tekrar edildi. Son yıkamada süpernatant atıldıktan sonra örnek üzerine 2-3 ml fiksatif eklenerek +4 °C’de saklandı (Ford and Hamerton, 1956).

3.2.1.3. Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Kemik iliği hücrelerinin bulunduğu süspansiyondan pipet ile alarak temiz lamların üzerine yaklaşık 30 cm yukarıdan damlatılarak preparatlar hazırlandı. Preparatlar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, fosfat AB tamponu kullanılarak hazırlanan %8’lik

giemsa boyasında 7 dk boyandı. Boyadan sonra preparatlar distile su ile fazla boyadan arındırıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu (Preston et al., 1987). Her bir hayvan için 40-42 kromozoma sahip 100 metafaz hücresine bakılarak kromozom aberasyonları sayıldı.

3.2.1.4. Kromozom Anomalilerinin Skorlanması

Preparatlarda, metafaz hücreleri incelendi. Hücrelerde 40-42 kromozoma analiz için bakıldı ve 100 metafazdaki kromozom anomali sayıları belirlendi (Savage, 1976). Kromozom anomalilerinin skorlanması:

(1) Kromozom veya kromatid gaplar; genişliği normal kromatidden daha az olan akromatik bölgeler

(2) Kromozom tip kırıklar; Bir kromozomun her iki kromatidinin aynı bölgesinde görülen kırıklardır ve izokromatid kırıklar olarak da adlandırılır.

(3) Kromatid tip kırıklar: Bir kromozomun sadece bir kromatidinde meydana gelen kırıklardır.

(4) Kompleks exchange; Kromozom veya kromatidlerde ortaya çıkan iki veya ikiden fazla sayıda görülen lezyonların neden olduğu düzensizliklerdir. Bu düzensizlikler kromozomlar veya kromatidler arasında olabileceği gibi tek bir kromozom veya kromatid içerisinde de oluşabilmektedir.

(5) Triradial figürler; İki kromozomun kromatidleri arasında görülen bir çeşit kromatid düzensizliğidir. Bir kromozomdaki izokromatid kırıklar ve başka bir kromozomdaki tek bir kromatid kırığının karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan üç kollu konfigürasyonlardır.

(6) Quadriradial figürler; Farklı kromozomların kromatidleri arasında görülen düzensizlikler olup dört kollu oluşumlardır.

(7) Toplam kromozom anomalisi ortalamaları; gaplar dışındaki kromozom, kromatid, kompleks exchange, triradial ve quadriradial figürlerin toplamıdır.

(8) Toplam anormal metafaz ortalamaları; 100 metafaz hücresinde kromozom anomalilerinin görüldüğü anormal hücrelerin sayısıdır.

(9) Mitotik indeks; 1000 hücre/hayvan için mitotik hücrelerin sayısıdır.

3.2.1.5. Kromozomların İstatistiksel Analizi

Kontrol ve deney gruplarına ait kromozom aberrasyon verilerini değerlendirmek için SPSS 13.0 istatistik programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak ifade

edildi. Grupların homojenizasyonunun belirlenmesinde One-Way-ANOVA testi kullanıldı. Tüm verilerin normal dağılıma uygunluklarının belirlenmesinde Kolmogrov Smirnov testi kullanıldı. Bağımsız grupların parametrelerinin karşılaştırılmasında öncelikle Kruskall Wallis tek yönlü varyans analizi uygulandı ve anlamlılıkları test edildi. Kruskall Wallis'e göre anlamlı bulunan gruplar arasında Mann Whitney U testi uygulandı. İstatistiklerin anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

3.2.2. Biyokimyasal Metodlar

3.2.2.1. Dokuların Çıkarılması ve Saklanması

Steril koşullarda çıkarılan kalp, karaciğer ve böbreklerden yaklaşık 0,5 gr doku örnekleri alındı. Doku örnekleri, soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurutularak ependorflar içerisine alındı ve çalışma gününe kadar -80°C de saklandı.

3.3.2.2. Doku protein düzeyi ölçümü (Lowry yöntemi)

Prensip: Proteinlerin yapısında bulunan tirozin aminoasitlerindeki fenolik OH grubunun belirlenmesine dayanan bir protein miktar belirleme yöntemidir (Lowry, et al., 1951).

Ayıraçlar:

Ayıraç A: %2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içinde):

0.4 gr NaOH

2 gr Na_2CO_3

100 ml distile su

Ayıraç B: %2 Na-K tartarat, %1 CuSO_4 ve Ayıraç A karışımı:

%2'lik Na-K çözeltisi: 0,2 gr Na-K tartarat, 10 ml distile su

%1'lik CuSO_4 çözeltisi: 1 gr CuSO_4 , 10 ml distile su

Karışım: 3 ml %2 Na-K tartarat + 3 ml CuSO_4 +294 ml Ayıraç A

Folin Ayıracı (2 N): Hazır folinden ayarlandı

Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi (1 mg/ml):

10 mg BSA, 10 ml salin (%0.9) içinde BSA standardı hazırlandı.

KCl çözeltisi (0,15 M):

11,18 gr KCl, 1000 ml distile su

Doku homojenatı: 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl çözeltisi içinde homojenize edilerek %10'luk homojenat elde edildi. Daha sonra bu homojenat 1/40 oranında salin ile seyreltildi.

Çalışma Yöntemi:

Numunelerin deney tüplerinde hazırlanması:

Kör	Standart	Örnek
Salin (0,1 ml)	Salin (0,875 ml)	Salin (0,05 ml)
Ayıraç B (1 ml)	Ayıraç B (1 ml)	Ayıraç B (1 ml)
Folin ayıracağı (0,05 ml)	BSA (0,125)	Doku homojenatı (0,05 ml)
	Folin ayıracağı (0,05 ml)	Folin ayıracağı (0,05 ml)

Hazırlanan tüpler 45 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 660 nm'de absorbansları okutuldu.

3.3.2.3. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeyi Ölçümü

Prensip: MDA'nın, tiyobarbitürük asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülerek MDA konsantrasyonunun tespit edilmesi yöntemidir (Beuge and Aust, 1978).

Ayıraçlar:

Stok standart (10 mM): 10 mM'lik TEP (1,1,3,3 tetra etoksipropan) çözeltisinden 0,1 ml alınır ve üzeri 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

TBA-TCA-HCl ayıracağı: %15 (w/v) TCA, %0,375 (w/v) TBA, 0,25 N HCl karışımı:

75 ml TCA (%100)

1,874 gr TBA

10,4 ml HCl (0.25 N)

500 ml distile su

KCl çözeltisi (0,15 M)

Doku homojenatı (%10): 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl içinde homojenize edildi.

Çalışma yöntemi:

Çözeltiler aşağıdaki miktarlarda tüplere eklendi.

Kör	Standart 1	Standart 2	Örnek
KCl (1 ml)	Distile su (0,75 ml)	Distile su (0,5 ml)	KCl (0,75 ml)
Ayıraç (2 ml)	Çalışma standardı (0,25 ml)	Çalışma standardı (0,5 ml)	Doku homojenatı (0,25 ml)
	Ayıraç (2 ml)	Ayıraç (2 ml)	Ayıraç (2 ml)

Reaksiyon karışımları 15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra 2500 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantların 535 nm'de absorbanları okundu. MDA konsantrasyonu nmol/100mg protein olarak hesaplandı.

3.3.2.4. Nitrik Oksit (NO) Düzeyi Ölçümü

Prensip: Aktifleştirilmiş kadminyum granülleri ile nitratın nitrite indirgenmesi aşamasından sonra griess ile renklendirilen komplekslerin spektrofotometrik olarak ölçülerek NO konsantrasyonunun tespit edilmesi yöntemidir (Cortas and Wakid, 1990).

Ayıraçlar:

Glisin-NaOH (pH=9,7 ve 0.2 M):

A= 1,877 gr glisin + 1,461 gr NaCl + 250 ml distile su

B= 1 gr NaOH + 250 ml distile su

Karışım= 67,5 ml B çözeltisi (NaOH) + 182,5 ml A çözeltisi (Glisin)

Bakır sülfat (CuSO₄) (100 mM):

Sülfanilamid:

1 gr sülfanilamid

100 ml %37'lik HCl (3 M)

N- Naphthylethylene daimine (NED) çözeltisi:

0,02 gr NED

100 ml distile su

Griess ayıracı:

100 ml Sülfanilamid + 100 ml NED karışımı (1:1)

Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (0,3N):

1,2 gr NaOH

100 ml distile su

Çinko sülfat (ZnSO₄) çözeltisi (%5):

5 gr çinko sülfat

100 ml distile su

KCl çözeltisi (0,15 M)

Doku homojenatı (%10): 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl içinde homojenize edildi. Homojenat 400xg'de 10 dakika santrifüj edilir ve üstteki süpernatant deproteinizasyon işleminde kullanılır.

Kadmiyumun (Cd) hazırlanması: Kadmiyum granülleri 0,2 M'lık sülfirik asit içinde bekletilerek redükte hale gelmesi sağlandı. Sülfirik asit boşaltıldıktan sonra bu granüller üç kez su ile yıkandı. Daha sonra 100mM'lık bakır sülfat çözeltisinde yaklaşık 2 dakika bekletildi. Son olarak 0,2 M Glisin-NaOH tamponu ile 3 kez yıkandı.

Çalışma Yöntemi:

Deproteinizasyon işlemi:

Homojenat (100µl) + çinko sülfat (300 µl) + ve NaOH (300 µl) + su (400 µl) Karışım 10000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Buradan elde edilen süpernatantlar sonraki aşamada kullanıldı.

Çözeltiler aşağıdaki miktarlarda tüplere eklendi.

Birinci aşama:

Kör	Örnek
Glisin-NaOH (1 ml)	Glisin-NaOH (1 ml)
Aktive edilmiş Cd granülleri (2.5 g)	Deproteinize numune (0.5 ml)
Deiyonize su (1 ml)	Aktive edilmiş Cd granülleri (2.5 g)
	Deiyonize su (0.5 ml)

Tüpler ağzı kapatılarak, karanlıkta 90 dakika bekletildi. Daha sonra 3000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar bir sonraki aşamada kullanıldı.

İkinci aşama:

Kör	Örnek
Süpernatant (1 ml)	Süpernatant (1 ml)
Griess ayıracı (1 ml)	Griess ayıracı (1 ml)

Reaksiyon karışımları karanlıkta 45 dakika bekletildikten sonra 545 nm'de absorpsanları okundu. NO konsantrasyonu $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak hesaplandı.

3.3.2.5. Doku Glutasyon (GSH) Düzeyi Ölçümü (Ellman Yöntemi)

Prensip: 2-nitrobenzoik asidin (DTNB), ortamdaki sülfidril grubu bileşiklerle redükte olmasıyla ortaya çıkan koyu sarı renkli bir kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesi yöntemidir. Elde edilen absorpsan değeri GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Ellman, 1959).

Ayırıcılar:

Proteinsizleştirme çözeltisi:

8,35 gr glasiyal meta fosforik asit

1 gr disodyum EDTA

150 gr NaCl

500 ml distile su

Disodyum fosfat çözeltisi (0,3 M):

10,65 gr Na_2HPO_4

250 ml distile su

Ellman renk ayırıcı:

40 mg DTNB

100 ml %1'lik sodyum sitrat

GSH standartı (0,1 mg/ml):

1 mg glutasyon

10 ml distile su

KCl çözeltisi (0,15 M)

Doku homojenatı (%10): 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl içinde homojenize edildi.

Çalışma Yöntemi:

Çözeltiler aşağıdaki miktarlarda tüplere eklendi.

Birinci aşama:

Kör	Standart	Örnek
KCl (2 ml)	KCl (1,5 ml)	KCl (1,5 ml)
Proteinsiz. çöz. (3 ml)	GSH (0,5 ml)	Homojenat (0.5 ml)
	Proteinsiz. çöz. (3 ml)	Proteinsiz. çöz. (3 ml)

Tüpler ağzı kapatılarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar bir sonraki aşamada kullanıldı.

İkinci aşama:

Kör	Standart	Örnek
Süpernatant (0,5 ml)	Süpernatant (0,5 ml)	Süpernatant (0,5 ml)
Na ₂ HPO ₄ çözeltisi (2 ml)	Na ₂ HPO ₄ çözeltisi (2 ml)	Na ₂ HPO ₄ çöz. (2 ml)
Ellman ayıracı (0,5 ml)	Ellman ayıracı (0,5 ml)	Ellman ayıracı (0,5 ml)

Tüpler karıştırıldıktan sonra 412 nm'de absorbanslar okundu. GSH konsantrasyonu nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.3.2.6. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü

Prensip: SOD aktivitesi ile üretilen süperoksit anyonunun nitrobluetetrazolium (NBT)'u indirgemesi prensibine dayanan bir testtir (Sun et al., 1988). Bu reaksiyonun inhibisyonundan sonra absorbanslar okunarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

Ayıraçlar:

Reaksiyon karışımı:

Na₂CO₃ (0,4 M): 4,5 gr Na₂CO₃, 100 ml distile suda çözüldü

Disodyum EDTA (0,6 M): 0,0192 gr disodyum EDTA, 100 ml distile suda çözüldü

Ksantin (0,3 mM): 0,004 gr ksantin, 100 ml distile suda çözüldü

NBT (nitrobluetetrazolium) (0,15 mM): 0,0053 gr NBT, 50 ml distile suda çözüldü

BSA (1 gr/L): 0,0215 gr BSA, 25 ml distile suda çözüldü

Karışım: 24 ml Na₂CO₃ + 40 ml disodyum EDTA + 80 ml ksantin + 40 ml NBT + 12 ml BSA

Ksantin oksidaz(0,2 U/ml): Ksantin oksidaz ve amonyum sülfat karışımıdır

A= Amonyum sülfat (2 M): 5,28 gr amonyum sülfat, 20 ml distile suda çözüldü.

B= Ksantin oksidaz çözeltisi: 0,2 U/ml hazırlamak için

50 µl ksantin oksidaz (57 mg protein/ml) + 8,55 ml amonyum sülfat

CuCl₂ çözeltisi (6 mM): 0,004 g bakır klorür, 50 ml distile suda çözüldü

KCl çözeltisi (0,15 M)

Doku homojenatı (%10): 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl içinde homojenize edildi. Daha sonra 600xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatantlar alınarak 10000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatantlar çalışma için kullanıldı.

Çalışma Yöntemi:

Çözeltiler aşağıdaki miktarlarda tüplere eklendi.

Birinci aşama:

Kör	Örnek
Reaksiyon karışımı (1 ml)	Reaksiyon karışımı (1 ml)
Distile su (0,1 ml)	Homojenat (0,05 ml)

Reaksiyon karışımları 25 °C'de 10 dakika bekletildi

İkinci aşama: Tüplere aşağıdaki çözeltiler eklendi.

Kör	Örnek
Ksantin oksidaz (0,005 ml)	Ksantin oksidaz (0,005 ml)

Reaksiyon karışımları 25°C'de 20 dakika bekletildi

Üçüncü aşama: Tüplere aşağıdaki çözeltiler eklendi.

Kör	Örnek
CuCl ₂ çözeltisi (0,1 ml)	CuCl ₂ çözeltisi (0,1 ml)

Reaksiyon karışımları 20 dakika bekletildikten sonra 560 nm'de absorbanları okundu. NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim miktarı enzim aktivitesini göstermektedir ve mg başına ünite (U/mg) olarak hesaplandı.

3.3.2.7. Konjuge Dien Düzeyi Ölçümü

Ayıraçlar:

Kloroform/Metanol karışımı (2:1)

N₂ (Azot) buharı

Sikloheksan

KCl çözeltisi (0,15 M)

Doku homojenatı (%10): 0,5 gr doku tartılarak 5 ml 0,15 M KCl içinde homojenize edildi.

Çalışma Yöntemi:

Çözeltiler aşağıdaki miktarlarda tüplere eklendi.

Birinci aşama: Homojenat (5 ml) + kloroform/metanol karışımı (5 ml)

Elde edilen karışım süzgeç kağıdından süzüldü

İkinci aşama: 2'şer ml'lik süzüntü toplandı ve azot buharı verilerek uçuruldu.

Çeperlere yapışan madde çalışıldı.

Üçüncü aşama: Tüplere 3'er ml sikloheksan eklendi ve çeperdeki maddelerin sikloheksan fazına geçmesi sağlandı. Örneklerin 233 nm dalga boyunda absorbanları okundu.

3.3.2.8. Biyokimyasal Verilerin İstatistiksel Analizi

Biyokimya testlerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 13.0 istatistik programı kullanıldı. Veriler, ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların homojenizasyonunun belirlenmesinde One-Way-ANOVA testi kullanıldı. Tüm verilerin normal dağılıma uygunluklarının belirlenmesinde Kolmogrov Smirnov testi kullanıldı. Bağımsız grupların parametrelerinin karşılaştırılmasında öncelikle Kruskall Wallis tek yönlü varyans analizi uygulandı ve anlamlılıkları test edildi. Kruskall Wallis'e göre anlamlı bulunan gruplar arasında Mann Whitney U testi uygulandı. İstatistiklerin anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kemik İliği Hücreleri Kromozom Anomali Bulguları

Kontrol ve deney gruplarında incelenen yapısal kromozom anomalileri ve anormal metafaz verileri normal dağılıma sahip olmadığı ve homojen dağılmadığı için gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığa non-parametrik test olan Kruskal Wallis ANOVA testi ile bakıldı. İki grup arasındaki kromozomal anomali frekanslarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Toplam kromozom anomalileri ile ilgili veri elde edilmesinde kromatid ve izokromatid tipi kırıklar, kompleks exchange, triradial ve quadriradial figürler hesaba katılırken gaplar bunun içinde değerlendirilmedi.

4.1.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Yaptığımız çalışmada, Kruskal Wallis ANOVA testine göre; kromatid tipi kırık, kompleks exchange, triradial figür ve quadriradial figür değerlerinde; kontrol, RES12,50, RES25, DXR, DXR+RES12,50 ve DXR+RES25 kombinasyon grupları arasında hem %0,1'lik hem de %5'lik seviyede anlamlılık bulundu ($p < 0,001$, $p < 0,05$). Bu sonuçlar; kontrol, RES12,50, RES25, DXR, DXR+RES12,50 ve DXR+RES25 kombinasyon gruplarındaki kromatid tip kırık, kompleks exchange, tri ve quadriradial figür değerlerinin önemli derecede farklı olduğunu göstermektedir. İzokromatid tip kırık değerleri açısından bakıldığında; RES12,50, RES25, DXR, DXR+RES12,50 ve DXR+RES25 kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). Bu sonuçlar; kontrol, RES12,50, RES25, DXR ve DXR+RES12,50 ve DXR+RES25 kombinasyon gruplarındaki izokromatid tip kırık değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Kruskal Wallis ANOVA testine göre anlamlılık gösteren grupların Mann Whitney U testine göre karşılaştırılması:

Kromatid tipi kırık değerlerinin karşılaştırılması: DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında kromatid tip kırık değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$). DXR+RES12,50 grubundaki kromatid kırıkları, DXR grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,029$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). DXR+RES25 grubundaki kromatid kırıkları, DXR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,004$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı

düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubuyla karşılaştırıldığında kromatid kırıkları anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,005$).

Kompleks exchange değerlerinin karşılaştırılması: DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında kompleks exchange değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında kompleks exchange değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,002$). DXR+RES25 grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kompleks exchange değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p=0,002$); DXR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında, kompleks exchange değerleri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,015$).

Triradial figür değerlerinin karşılaştırılması: DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında triradial figür değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,007$, $p=0,007$, $p=0,007$). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında, triradial figür değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,002$). DXR+RES25 grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında triradial figür değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p=0,002$), DXR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında, triradial figür değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Quadriradial figür değerlerinin karşılaştırılması: DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında quadriradial figür değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında, quadriradial figür değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,02$). DXR+RES25 grubu DXR grubuyla karşılaştırıldığında quadriradial figür değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,019$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında quadriradial figür değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Toplam kromozom anomalisi değerlerinin karşılaştırılması: Toplam kromozom anomalisi değerleri, DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$,

p=0,002). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). DXR+RES25 grubu DXR grubuyla karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,004$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerleri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,006$).

Toplam anormal metafaz değerlerinin karşılaştırılması: Toplam anormal metafaz değerleri, DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında toplam anormal metafaz değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,003$). DXR+RES25 grubu, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, toplam anormal metafaz değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,005$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). DXR+RES25 grubu, DXR+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında toplam anormal metafaz değerleri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,01$).

Mitotik indeks verilerinin karşılaştırılması: DXR grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında mitotik indeks verileri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). DXR+RES12,50 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında mitotik indeks verilerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). DXR+RES25 grubu ile DXR grubu karşılaştırıldığında mitotik indeks verileri anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES25 grubu ile DXR+RES12,50 grubu karşılaştırıldığında mitotik indeks verileri anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$).

DXR ve kombinasyon gruplarına ait yapısal kromozom anomalilerin sayıları, toplam kromozom anomalileri ve anormal metafaz değerleri ile bunların standart sapmaları Tablo 4.1'de verilmektedir. Kontrol ve deney gruplarında görülen gap, kromatid tipi ve izokromatid tipi kırık, kompleks exchange, triradial figür, qudriradial figür, toplam yapısal kromozom anomalileri ile anormal metafaz frekanslarının Mann Whitney U testi ($p<0,05$) kullanılarak karşılaştırılması Tablo 4.2.a ve Tablo 4.2.b.'de verilmektedir.

4.1.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Kruskal Wallis ANOVA testine göre; kromatid tipi kırık, kompleks exchange, toplam kromozom anomalileri ve toplam anormal metafaz değerleri açısından bakıldığında; RES12,50, RES25, cDDP cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 kombinasyon grupları arasında %0,1'lik seviyede anlamlılık bulundu ($p < 0,001$). Bu sonuçlar; kontrol, RES12,50, RES25, cDDP ve cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 kombinasyon gruplarındaki kromatid tip kırık, kompleks exchange, toplam kromozom anomalileri ve toplam anormal metafaz değerlerinin önemli derecede farklı olduğunu göstermektedir. İzokromatid tip kırık, triradial figür ve quadriradial figür değerleri açısından; RES12,50, RES25, cDDP cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). Bu sonuçlar; kontrol, RES12,50, RES25, cDDP ve cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 kombinasyon grupları arasında; izokromatid tip kırık, triradial figür ve quadriradial figür anomali değerleri açısından önemli derecede farklılık olmadığını göstermektedir.

Kruskal Wallis ANOVA testine göre, anlamlılık gösteren grupların Mann Whitney U testine göre karşılaştırılması;

Kromatid tip kırıkların karşılaştırılması: Kromatid tipi anomali değerleri, cDDP grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$). cDDP+RES12,50 grubunda, cDDP grubuna göre kromatid kırıkları anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,006$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). cDDP+RES25 grubu, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında kromatid kırıkları anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,004$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,019$). cDDP+RES25 grubu ile DXR+RES12,50 grubu karşılaştırıldığında kromatid kırıkları anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,012$).

Kompleks exchange değerlerinin karşılaştırılması: Kompleks exchange değerleri, cDDP grubunda sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$). cDDP+RES12,50 grubu, cDDP grubu ile karşılaştırıldığında kompleks exchange değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p > 0,05$); kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,007$). cDDP+RES25 grubu, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında kompleks exchange değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,013$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$). cDDP+RES25 grubu,

cDDP+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında kompleks exchange değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Toplam kromozom anomalisi değerlerinin karşılaştırılması: Toplam kromozom anomalisi değerleri, cDDP grubunda, sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$). cDDP+RES12,50 grubu ile cDDP grubu karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerleri anlamlı olarak düşük bulunurken ($p=0,005$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). cDDP+RES25 grubu, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,016$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). cDDP+RES25 grubu, cDDP+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında toplam kromozom anomalisi değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Toplam anormal metafaz değerlerinin karşılaştırılması: Toplam anormal metafaz değerleri, cDDP grubunda, sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,002$). cDDP+RES12,50 grubu ile cDDP grubu karşılaştırıldığında toplam anormal metafaz değerleri anlamlı olarak düşük bulunurken ($p=0,004$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,003$). cDDP+RES25 grubu, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında toplam anormal metafaz değerleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,004$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). cDDP+RES25 grubu, cDDP+RES12,50 grubu ile karşılaştırıldığında toplam anormal metafaz değerleri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,011$).

Mitotik indeks verilerinin karşılaştırılması: cDDP grubu ile sağlıklı kontrol, RES12,50 ve RES25 grupları karşılaştırıldığında mitotik indeks verileri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). cDDP+RES12,50 grubunda, cDDP grubuna göre mitotik indeks verileri anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). cDDP+RES25 grubu mitotik indeks verileri cDDP grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 grupları karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

cDDP ve kombinasyon gruplarına ait yapısal kromozom anomalilerin sayıları, toplam kromozom anomalileri, toplam anormal metafaz değerleri ve bunların standart sapmaları Tablo 4.3'de verilmektedir. Kontrol ve deney gruplarında görülen gap, kromatid tipi ve izokromatid tipi kırık, kompleks exchange, triradial figür, qudriradial figür, toplam

yapısal kromozom anomalileri ve toplam anormal metafaz frekanslarının Mann Whitney U testi ($p < 0,05$) kullanılarak karşılaştırılması Tablo 4.4.a ve Tablo 4.4.b’de verilmektedir.

4.1.3. Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Kontrol grubundaki hayvanların kemik iliği hücrelerine ait kromozomlar, RES12,50 ve RES25 grupları ile karşılaştırıldığında tüm yapısal kromozom anomalileri, toplam kromozom anomalileri ve anormal metafaz değerleri ile mitotik indeks verileri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). Aynı şekilde RES12,50 grubu ile RES25 grubu karşılaştırıldığında da anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

4.2. Kalp, Karaciğer ve Böbrek Dokularına Ait Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Kalp Dokusu MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri ve SOD Aktiviteleri

4.2.1.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

DXR grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p = 0,004$, $p = 0,01$, $p = 0,025$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p = 0,004$, $p = 0,004$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken ($p = 0,006$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p = 0,006$, $p = 0,006$). CD düzeyleri bakımından ise DXR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p = 0,025$, $p = 0,04$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p = 0,004$, $p = 0,004$). CD düzeyleri bakımından ise DXR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p = 0,002$, $p = 0,006$, $p = 0,018$); GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu ($p = 0,028$). SOD aktivitelerinde ise anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve CD düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p = 0,004$, $p = 0,016$); GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük ($p = 0,037$) bulundu. NO düzeylerinde ise anlamlı bir

farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). SOD aktiviteleri bakımından ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR+RES12,50 kombinasyon grubuyla kıyaslandığında doku MDA, CD, GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$); NO düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p=0,018$).

4.2.1.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

cDDP grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,01$, $p=0,025$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

cDDP+RES12,50 kombinasyon grubu, cDDP grubuyla kıyaslandığında, doku MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken ($p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$), CD düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). NO düzeyleri bakımından ise cDDP ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 kombinasyon grubu, cDDP grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,025$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

cDDP+RES12,50 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve CD düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,025$); GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,016$). NO düzeyleri ve SOD aktiviteleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku GSH düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,025$); doku MDA, CD ve NO düzeyleri ve SOD aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 grubu cDDP+RES12,50 grubuyla kıyaslandığında doku MDA, GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$); CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,037$, $p=0,021$).

Tüm gruplara ait kalp dokusu MDA, CD, NO, GSH düzeyleri ve SOD aktivite ortalamaları ve standart sapmaları (SD) Tablo 4.5’de verilmiştir.

4.2.2. Karaciğer Dokuları MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri Ve SOD Aktiviteleri

4.2.2.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

DXR grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,016$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,017$, $p=0,044$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,045$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,007$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,018$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,028$, $p=0,011$). CD düzeyleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken ($p=0,004$); NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,025$). GSH ve CD düzeyleri ve SOD aktiviteleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR+RES12,50 kombinasyon grubuyla kıyaslandığında doku CD, NO, GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$); doku MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük ($p=0,006$), SOD aktiviteleri ise anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,011$).

4.2.2.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

cDDP verilen hayvanların karaciğer dokusu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,002$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

cDDP+RES12,50 kombinasyon grubundaki hayvanların karaciğer dokusu, cDDP grubuyla kıyaslandığında doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,010$, $p=0,004$); SOD aktiviteleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p=0,016$). GSH düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 verilen hayvanların karaciğer dokusu, cDDP grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,004$).

cDDP+RES12,50 verilen hayvanların karaciğer dokuları, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı düzeyde düşük bulundu (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,006$). CD ve NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 grubu karaciğer dokuları, kontrol grubuyla kıyaslandığında sadece doku GSH düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p=0,037$); MDA, CD, NO düzeyleri ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

cDDP+RES25 verilen hayvanların karaciğer dokusu, cDDP+RES12,50 grubuyla kıyaslandığında doku GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p>0,05$); doku MDA, CD, NO düzeyleri anlamlı olarak düşük (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,016$, $p=0,016$), SOD aktiviteleri de anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,004$).

Tüm gruplara ait karaciğer dokusu MDA, CD, NO, GSH düzeyleri ve SOD aktivite ortalamaları ve standart sapmaları (SD) Tablo 4.6'da verilmiştir.

4.2.3. Böbrek Dokuları MDA, CD, NO, GSH Düzeyleri Ve SOD Aktiviteleri

4.2.3.1. DXR, DXR+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

DXR grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,006$, $p=0,002$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,016$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,006$); GSH

düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,011$). CD ve SOD aktiviteleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR grubuyla kıyaslandığında, doku MDA ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,004$, $p=0,03$). CD düzeyleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES12,50 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,043$, $p=0,006$); GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0,006$). Bununla birlikte SOD aktivitelerinde anlamlı düzeyde bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,046$, $p=0,004$); MDA, GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

DXR+RES25 kombinasyon grubu, DXR+RES12,50 kombinasyon grubuyla kıyaslandığında doku MDA, CD, NO, GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

4.2.3.2. cDDP, cDDP+RES ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

cDDP grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,006$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,016$).

cDDP+RES12,50 kombinasyon grubu, cDDP grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,037$, $0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,010$).

cDDP+RES25 kombinasyon grubu, cDDP grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,006$, $p=0,004$); GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,004$).

cDDP+RES12,50 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku MDA, CD ve NO düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,006$,

p=0,004); GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu (p=0,006). SOD aktiviteleri bakımından ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p>0,05)

cDDP+RES25 kombinasyon grubu, kontrol grubuyla kıyaslandığında, doku GSH düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunurken (p=0,016); doku MDA, CD, NO düzeyleri ve SOD aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p>0,05).

cDDP+RES25 kombinasyon grubu, cDDP+RES12,50 kombinasyon grubuyla kıyaslandığında doku MDA, CD, NO düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla p=0,006, p=0,037, p=0,010). Bununla birlikte GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p>0,05).

Tüm gruplara ait böbrek dokusu MDA, CD, NO, GSH düzeyleri ve SOD aktivite ortalamaları ve standart sapmaları (SD) Tablo 4.7’de verilmiştir.

4.2.4. Sağlıklı Kontrol ve Resveratrol Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

MDA, CD, NO ve GSH düzeyleri ile SOD aktivitelerinde, RES25 veya RES12,50 gruplarındaki hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokuları kontrol gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde bir farklılık bulunmadı (p>0,05). Aynı şekilde MDA, CD, NO ve GSH düzeyleri ile SOD aktiviteleri açısından RES12,50 grubunun kalp, karaciğer ve böbrek dokuları RES25 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0,05).

Tablo 4.1. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kemik iliği hücrelerinde gözlenen yapısal kromozom anomali çeşit ve sayıları, Mİ (%), toplam kromozom anomali ile anormal metafaz ortalamaları frekansları

Gruplar	Mİ(%)±SD (Ortanca)	Gap	Kırıklar		KE	TF	QF	TK	TKO±SD (Ortanca)	AMO±SD (Ortanca)	%TKO Azalma
			K	İK							
Kontrol	2,68 ± 0,69 (2,95)	2	1	0	0	0	0	1	0,17 ± 0,41 (0,00)	0,17 ± 0,41 (0,00)	
RES12,50	2,71 ± 0,80 (2,95)	3	2	0	0	0	0	2	0,33 ± 0,52 (0,00)	0,33 ± 0,52 (0,00)	
RES25	2,73 ± 0,62 (2,75)	1	0	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,00 (0,00)	0,0 ± 0,00 (0,00)	
DXR	0,88 ± 0,30 (0,75) ^a	13	158	2	63	14	9	246	41,00 ± 8,15 (38,50) ^a	25,33 ± 3,93 (26,50) ^a	
DXR + RES12,50	0,98 ± 0,19 (1,05) ^a	8	122	1	63	20	7	213	35,50 ± 6,35 (37,50) ^a	23,50 ± 2,43 (24,00) ^a	13,41
DXR + RES25	1,57 ± 0,19 (1,50) ^{b,c}	10	61	1	37	20	3	122	20,33 ± 3,44 (20,50) ^{a,b,c}	16,66 ± 3,39 (16,50) ^{a,b,c}	50,41

Gaplar hesaplanmıştır fakat toplam kromozom aberasyonları hesaplamalarına eklenmemiştir. Her hayvanda yüz hücre, toplamda her grup için 600 hücre analiz edilmiştir. *DXR*; Doksorubisin, *RES*; Resveratrol, *SD*; Standart sapma, *Mİ*; Mitotik İndeks, *K*; Kromatid Kırık, *İK*; İzokromatid Kırık, *KE*; Kompleks Exchange, *TF*; Triradial Figür, *QF*; Quadriradial Figür, *TK*; Toplam Kromozom Anomalisi, *TKO*; Toplam Kromozom Anomali Ortalaması, *AMO*; Toplam Anormal Metafaz Ortalaması.

^a Kontrol, RES12,5 mg/kg bw ve RES25 mg/kg bw gruplarından istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

^b DXR (90 mg/kg bw) grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

^c DXR + RES12,5 mg/kg bw grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

Tablo 4.2.a. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p < 0,05$) kullanılarak karşılaştırılması

	Kruskal-Wallis ANOVA (p)	DXR ve Kontrol	DXR+RES12,5 ve DXR	DXR+RES12,5 ve RES12,5	DXR ve RES12,5	DXR+RES12,5 ve Kontrol	Kontrol ve RES12,5
Gap	0,002	0,029(#)	0,241	0,030 (#)	0,046 (#)	0,014 (#)	0,575
K	0,000 (*)	0,003(#)	0,029 (#)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,523
İK	0,361	0,138	0,523	0,317	0,138	0,317	1,000
KE	0,000 (*)	0,002(#)	0,871	0,002 (#)	0,002 (#)	0,002 (#)	1,000
TF	0,000 (*)	0,007(#)	0,503	0,002 (#)	0,007	0,002 (#)	1,000
QF	0,000 (*)	0,002(#)	0,600	0,021 (#)	0,002 (#)	0,021(#)	1,000
TKO	0,000 (*)	0,003(#)	0,577	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003(#)	0,523
AMO	0,000 (*)	0,003(#)	0,227	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003(#)	0,523

* $p < 0,001$

$p < 0,05$

$p > 0,05$ (ilişki istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 4.2.b. DXR, DXR+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p < 0,05$) kullanılarak karşılaştırılması

	Kruskal-Wallis ANOVA (p)	Kontrol ve RES25	DXR ve RES25	DXR+RES25 ve Kontrol	DXR+RES25 ve RES25	DXR+RES25 ve DXR	RES12,5 ve RES25	DXR+RES25 ve DXR+RES12,5
Gap	0,002	0,523	0,016 (#)	0,011 (#)	0,005 (#)	0,457	0,241	0,465
K	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,003 (#)	0,002 (#)	0,004 (#)	0,138	0,005 (#)
İK	0,361	1,000	0,138	1,000	1,000	0,138	1,000	0,317
KE	0,000 (*)	1,000	0,002 (#)	0,002 (#)	0,002 (#)	0,063	1,000	0,015 (#)
TF	0,000 (*)	1,000	0,007 (#)	0,002 (#)	0,002 (#)	0,188	1,000	0,807
QF	0,000 (*)	1,000	0,002 (#)	0,056	0,056	0,019 (#)	1,000	0,201
TKO	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,003 (#)	0,002 (#)	0,004 (#)	0,138	0,006 (#)
AMO	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,003 (#)	0,002 (#)	0,005 (#)	0,138	0,010 (#)

* $p < 0,001$

$p < 0,05$

$p > 0,05$ (ilişki istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 4.3. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kemik iliği hücrelerinde gözlenen yapısal kromozom anomali çeşit ve sayıları, Mİ (%), toplam kromozom anomali ile anormal metafaz ortalamaları frekansları

Gruplar	Mİ(%)±SD (Ortanca)	Gap	Kırıklar		KE	TF	QF	TK	TKO±SD (Ortanca)	AMO±SD (Ortanca)	%TKO Azalma
			K	İK							
Kontrol	2,68 ± 0,69 (2,95)	2	1	0	0	0	0	1	0,17 ± 0,41 (0,00)	0,17 ± 0,41 (0,00)	
RES12,50	2,71 ± 0,80 (2,95)	3	2	0	0	0	0	2	0,33 ± 0,52 (0,00)	0,33 ± 0,52 (0,00)	
RES25	2,73 ± 0,62 (2,75)	1	0	0	0	0	0	0	0,0 ± 0,00 (0,00)	0,0 ± 0,00 (0,00)	
cDDP	1,62±0,48 (1,65) ^a	7	39	1	14	3	1	58	9,67 ± 2,58 (9,00) ^a	8,83 ± 1,47 (8,50) ^a	
cDDP + RES12,50	2,60±0,68 (2,50) ^b	9	18	0	8	1	1	28	4,67 ± 1,37 (4,50) ^{a,b}	4,33 ± 1,03 (4,00) ^{a,b}	51,72
cDDP + RES25	2,70±0,49 (2,70) ^b	3	8	0	4	1	4	17	2,83 ± 3,19 (2,00) ^b	1,67 ± 1,37 (1,50) ^{b,c}	70,69

Gaplar hesaplanmıştır fakat toplam kromozom aberasyonları hesaplamalarına eklenmemiştir. Her hayvanda yüz hücre, toplamda her grup için 600 hücre analiz edilmiştir. *cDDP*; Sisplatin, *RES*; Resveratrol, *SD*; Standart sapma, *Mİ*; Mitotik İndeks, *K*; Kromatid Kırık, *İK*; İzokromatid Kırık, *KE*; Kompleks Exchange, *TF*; Triradial Figür, *QF*; Quadriradial Figür, *TK*; Toplam Kromozom Anomalisi, *TKO*; Toplam Kromozom Anomali Ortalaması, *AMO*; Anormal Metafaz Ortalaması.

^a Kontrol, RES12,5 mg/kg bw ve RES25 mg/kg bw gruplarından istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

^b cDDP (5,0 mg/kg bw) grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

^c cDDP + RES12,5 mg/kg bw grubundan istatistiksel olarak farklı ($p < 0,05$)

Tablo 4.4.a. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p < 0,05$) kullanılarak karşılaştırılması

	Kruskal-Wallis ANOVA (p)	cDDP ve Kontrol	cDDP ve RES12,5	cDDP+RES12,5 ve Kontrol	cDDP+RES12,5 ve cDDP	Kontrol ve RES12,5	cDDP+RES12,5 ve RES12,5
Gap	0,212	0,368	0,601	0,058	0,505	0,575	0,116
K	0,000 (*)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,006 (#)	0,523	0,003 (#)
İK	0,416	0,317	0,317	1,000	0,317	1,000	1,000
KE	0,000 (*)	0,002 (#)	0,002 (#)	0,007 (#)	0,094	1,000	0,007 (#)
TF	0,342	0,140	0,140	0,317	0,461	1,000	0,317
QF	0,671	0,317	0,317	0,317	1,000	1,000	0,317
TKO	0,000 (*)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,005 (#)	0,523	0,003 (#)
AMO	0,000 (*)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,003 (#)	0,004 (#)	0,523	0,003 (#)

* $p < 0,001$

$p < 0,05$

$p > 0,05$ (ilişki istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 4.4.b. cDDP, cDDP+RES kombinasyon ve kontrol gruplarındaki sıçanların kromozomlarındaki Gap, K, İK, KE, TF, QF, TK, TKO ve AMO frekanslarının Mann Whitney U testi ($p < 0,05$) kullanılarak karşılaştırılması

	Kruskal-Wallis ANOVA (p)	Kontrol ve RES25	cDDP ve RES25	cDDP+RES25 ve cDDP	cDDP+RES25 ve Kontrol	cDDP+RES25 ve RES25	RES12,5 ve RES25	cDDP+RES25 ve cDDP+RES12,5
Gap	0,212	0,523	0,181	0,473	0,847	0,461	0,241	0,127
K	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,004 (#)	0,06	0,04 (#)	0,138	0,012 (#)
İK	0,416	1,000	0,317	1,000	0,317	0,317	1,000	0,317
KE	0,000 (*)	1,000	0,002 (#)	0,013 (#)	0,06	0,06	1,000	0,235
TF	0,342	1,000	0,140	0,461	0,317	0,317	1,000	1,000
QF	0,671	1,000	0,317	0,902	0,317	0,317	1,000	0,902
TKO	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,002 (#)	0,07	0,06	0,138	0,06
AMO	0,000 (*)	0,317	0,002 (#)	0,000 (*)	0,07	0,04 (#)	0,138	0,011 (#)

* $p < 0,001$

$p < 0,05$

$p > 0,05$ (ilişki istatistiksel olarak anlamlı değil)

Tablo 4.5. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların kalp dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutasyon düzeyleri (GSH) ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması

Gruplar	MDA (nmol/100 mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	CD (nmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	NO (µmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	GSH (nmol/mgprt) Ortalama±SD (Ortanca)	SOD (U/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)
Sağlıklı Kontrol (n=6)	8,35± 0,33 (8,29)	7,17± 1,07 (6,99)	2,17 ± 0,35 (2,10)	19,36± 2,30 (19,73)	2,29 ± 0,31 (2,25)
RES12,50 Kontrol (n=6)	8,05± 0,06 (8,05)	6,85 ± 0,45 (6,74)	2,03 ± 0,15 (2,00)	18,86 ± 2,19(19,68)	2,12 ± 0,13 (2,16)
RES25 Kontrol (n=6)	7,82± 0,48 (8,11)	6,83 ± 0,65 (6,94)	1,99 ± 0,16 (1,94)	19,03 ± 1,92 (19,72)	2,16 ± 0,16 (2,22)
DXR (n=6)	25,55 ± 2,71 (24,73) ^a	10,76 ± 1,95 (11,10) ^a	2,93± 0,55 (3,18) ^a	7,35± 1,05 (7,51) ^a	1,30 ± 0,20 (1,34) ^a
DXR+RES12,50 (n=6)	16,60±1,55 (16,15) ^{a,b}	10,98±1,85 (10,57) ^a	2,93 ± 0,52 (2,92) ^a	14,60±2,9 (14,13) ^{a,b}	2,49 ± 0,36 (2,43) ^b
DXR+RES25 (n=6)	19,34±5,49(19,29) ^{a,b}	10,01 ± 1,87 (9,91) ^a	2,15 ± 0,46 (2,07) ^{b,c}	14,93±3,22(14,51) ^{a,b}	2,58 ± 0,43 (2,49) ^b
cDDP (n=6)	24,28 ± 1,06 (24,62) ^a	9,83 ± 0,89 (10,08) ^a	2,70 ± 0,20 (2,69) ^a	6,79 ± 1,35 (6,90) ^a	1,29 ± 0,14 (1,31) ^a
cDDP+RES12,50 (n=6)	15,14±2,22 (14,08) ^{a,d}	9,26 ± 1,81 (8,75) ^a	2,57 ± 0,52 (2,45)	12,88±4,01(11,83) ^{a,d}	2,17 ± 0,50 (2,17) ^d
cDDP+RES25 (n=6)	12,64± 5,64 (13,06) ^d	6,16 ± 2,24 (5,43) ^{d,e}	1,54±0,45 (1,36) ^{d,e}	15,57±2,26(16,19) ^{a,d}	2,63 ± 1,11 (2,61) ^d

^aKontrol, RES 12,5 ve RES 25 gruplarından istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^bDXR grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^cDXR + RES 12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^dcDDP grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^ecDDP+RES12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

Tablo 4.6. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçamların karaciğer dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutatyon (GSH) düzeyleri ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması

Gruplar	MDA (nmol/100 mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	CD (nmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	NO (µmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	GSH (nmol/mgprt) Ortalama±SD (Ortanca)	SOD (U/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)
Sağlıklı Kontrol (n=6)	12,60 ± 0,18 (12,55)	8,03 ± 1,15 (7,83)	1,71± 0,25 (1,72)	12,37 ± 2,37 (12,75)	2,14 ± 0,42 (2,13)
RES12,50 Kontrol (n=6)	12,50 ± 0,17 (12,44)	9,02 ± 1,14 (8,82)	1,87± 0,12 (1,91)	11,36 ± 2,37 (11,74)	1,65 ± 0,41 (1,65)
RES25 Kontrol (n=6)	12,42 ± 0,16 (12,39)	7,65 ± 1,16 (7,45)	1,50 ± 0,24 (1,51)	11,93 ± 2,37 (12,30)	1,95 ± 0,42 (1,96)
DXR (n=6)	36,34 ± 2,24 (36,38) ^a	10,68 ± 1,45 (10,94) ^a	2,72 ± 0,38 (2,59) ^a	5,70 ± 1,03 (5,61) ^a	1,10 ± 0,25 (1,09) ^a
DXR+RES12,50 (n=6)	24,65 ±1,41 (23,76) ^{a,b}	8,74 ± 0,46 (8,66) ^b	2,09 ± 0,19 (2,01) ^{a,b}	9,03 ± 1,24 (8,95) ^{a,b}	1,44 ± 0,17(1,38) ^{a,b}
DXR+RES25 (n=6)	14,44±3,05 (15,43) ^{b, c}	8,56 ± 0,95 (8,49) ^b	1,99 ± 0,13 (1,98) ^{a,b}	10,49 ± 0,60 (10,43) ^b	1,98 ±0,24(1,98) ^{b,c}
cDDP (n=6)	35,57 ± 2,12 (35,39) ^a	9,80 ± 1,10 (9,59) ^a	2,66 ± 0,13 (2,68) ^a	6,77 ± 1,25 (6,89) ^a	1,18 ± 0,18 (1,19) ^a
cDDP+RE12,5 (n=6)	22,94 ±1,05 (23,45) ^{a,d}	8,02 ± 0,47 (8,01) ^d	1,87 ± 0,15 (1,88) ^d	8,39 ± 1,32 (8,39) ^a	1,45 ± 0,10(1,46) ^{a,d}
cDDP+RES25 (n=6)	11,37 ±1,17 (11,52) ^{d,e}	7,19 ± 0,47 (7,23) ^{d,e}	1,65 ± 0,08 (1,65) ^{d,e}	9,92 ± 1,28 (9,79) ^{a,d}	1,90 ±0,15(1,93) ^{d, e}

^aKontrol, RES 12,5 ve RES 25 gruplarından istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^bDXR grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^cDXR + RES 12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^dcDDP grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^ecDDP+RES12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

Tablo 4.7. Çalışma ve kontrol gruplarındaki sıçanların böbrek dokularındaki Malondialdehit (MDA), Konjuge dien (CD), Nitrik oksit (NO), Glutasyon (GSH) düzeyleri ve Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin karşılaştırılması

Gruplar	MDA (nmol/100 mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	CD (nmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	NO (µmol/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)	GSH (nmol/mgprt) Ortalama±SD (Ortanca)	SOD (U/mg prt) Ortalama±SD (Ortanca)
Sağlıklı Kontrol (n=6)	12,77±0,59 (12,51)	7,76±0,91 (7,71)	0,30 ± 0,03 (0,30)	17,72 ± 2,25 (17,68)	1,98 ± 0,21 (2,00)
RES12,50 Kontrol (n=6)	12,39 ± 0,64 (12,09)	7,55 ± 0,90 (7,51)	0,26 ± 0,04 (0,26)	18,38 ± 2,43 (18,20)	2,03 ± 0,20 (2,06)
RES25 Kontrol (n=6)	12,17 ± 0,58 (11,92)	7,52 ± 0,90 (7,60)	0,24 ± 0,05 (0,23)	18,72±2,26 (18,68)	2,08 ± 0,21 (2,11)
DXR (n=6)	31,97 ± 4,54 (30,15) ^a	10,90 ± 2,22 (9,97) ^a	0,92 ± 0,23 (0,84) ^a	6,07 ± 1,32 (5,70) ^a	1,64 ± 0,21 (1,65) ^a
DXR+RES12,50 (n=6)	20,04 ± 2,32 (19,55) ^{a,b}	9,58 ± 1,61 (9,52) ^a	0,59 ± 0,08 (0,61) ^{a,b}	12,02±2,38 (12,55) ^{a,b}	1,90 ± 0,49 (1,72)
DXR+RES25 (n=6)	16,79 ± 4,41 (16,19) ^b	9,47 ± 1,78 (9,51) ^a	0,49 ± 0,07 (0,48) ^{a,b}	14,27 ± 3,72 (14,07) ^b	2,05 ± 0,40 (2,03) ^b
cDDP (n=6)	39,12±4,13 (39,00) ^a	13,15±2,42 (12,81) ^a	1,16 ± 0,21 (1,14) ^a	6,99 ± 1,56 (7,20) ^a	1,57 ± 0,25 (1,57) ^a
cDDP+RE12,50 (n=6)	18,77 ± 1,19(18,55) ^{a,d}	10,25±1,34 (10,11) ^{a,d}	0,52 ± 0,09 (0,53) ^{a,d}	13,71±1,65 (14,05) ^{a,d}	2,14 ± 0,34 (2,05) ^d
cDDP+RES25 (n=6)	13,84 ± 2,08(13,26) ^{d,e}	8,65 ± 1,08 (8,46) ^{d,e}	0,33 ± 0,08 (0,30) ^{d,e}	14,37±1,30 (14,04) ^{a,d}	2,17 ± 0,09 (2,16) ^d

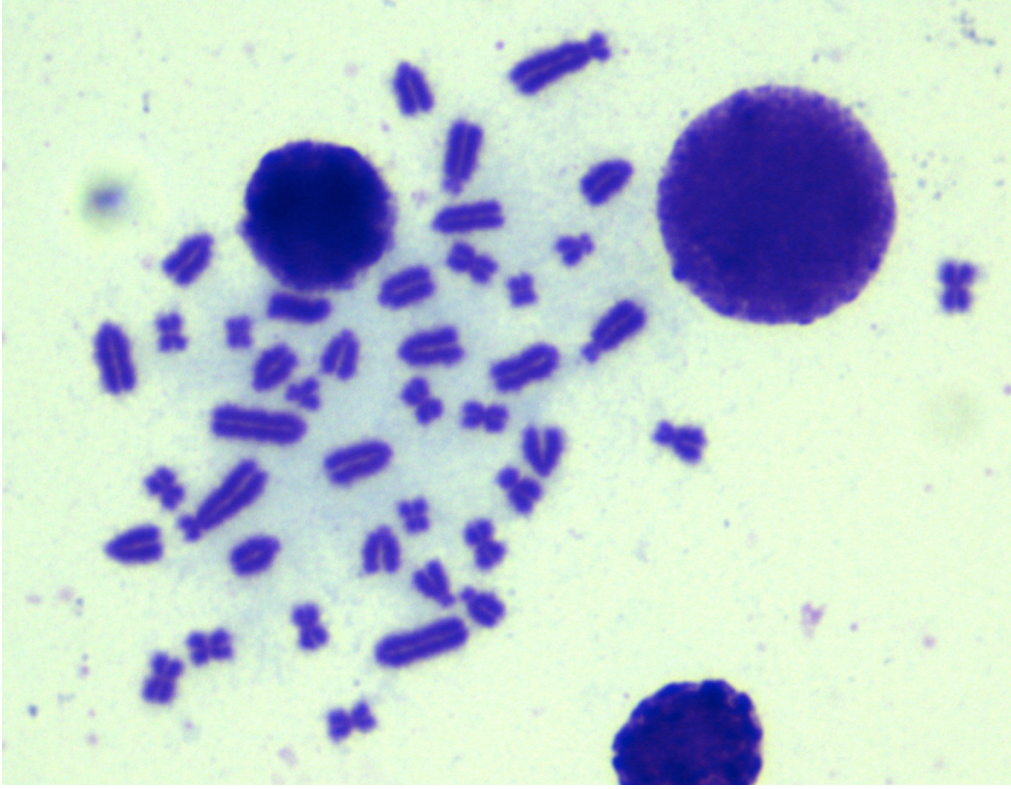
^aKontrol, RES 12,5 ve RES 25 gruplarından istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^bDXR grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

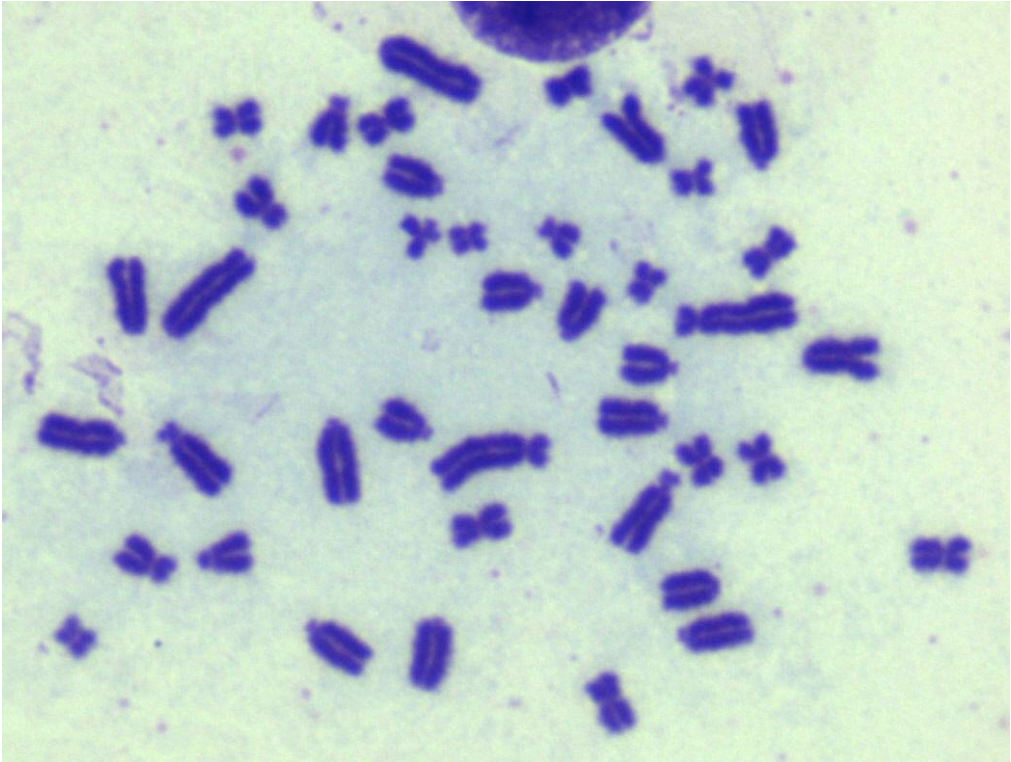
^cDXR + RES 12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

^dcDDP grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)

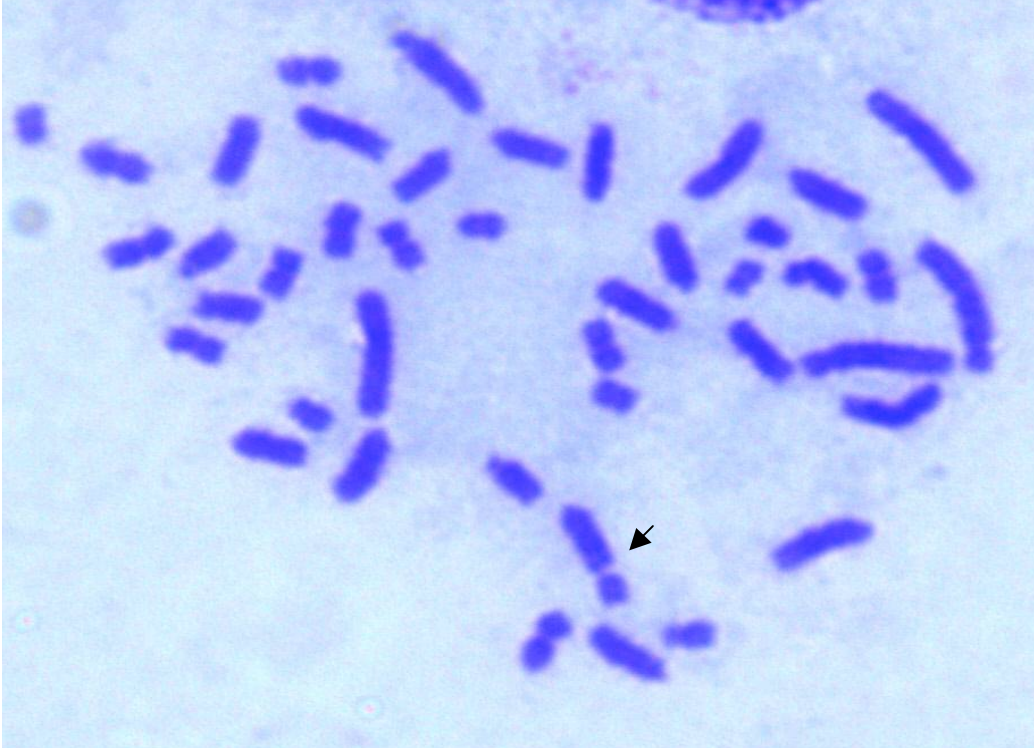
^ecDDP+RES12,5 grubundan istatistiksel olarak farklı (p<0,05)



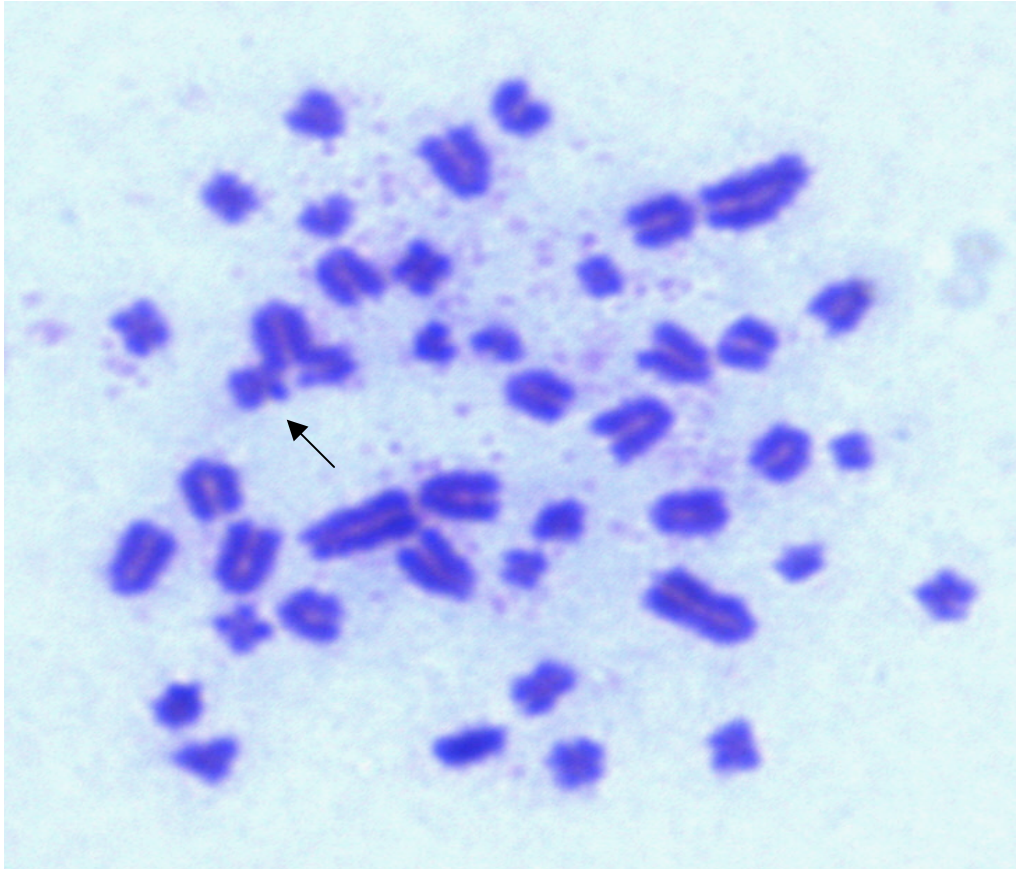
Şekil 4.1. Normal kromozom plağı



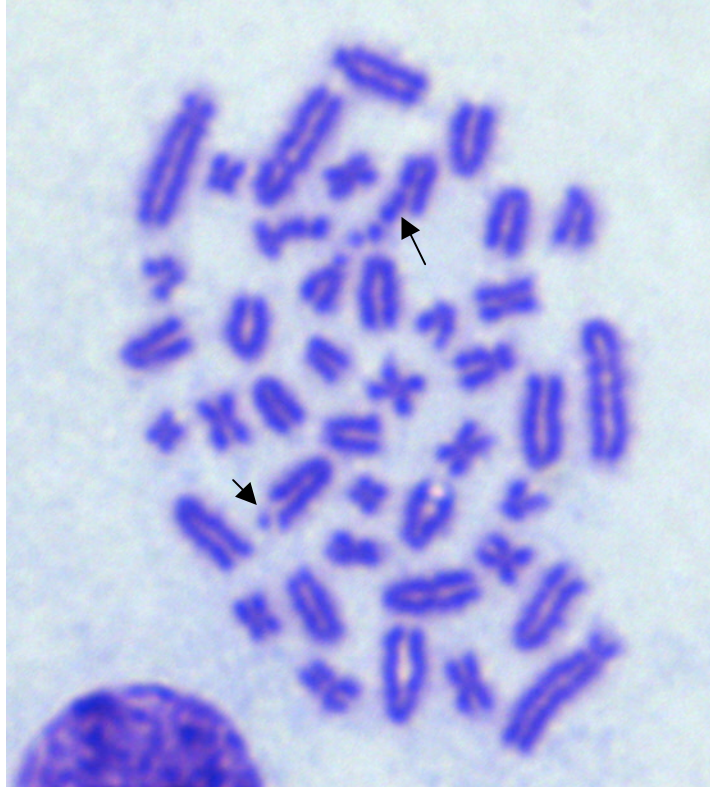
Şekil 4.2. Normal kromozom plağı



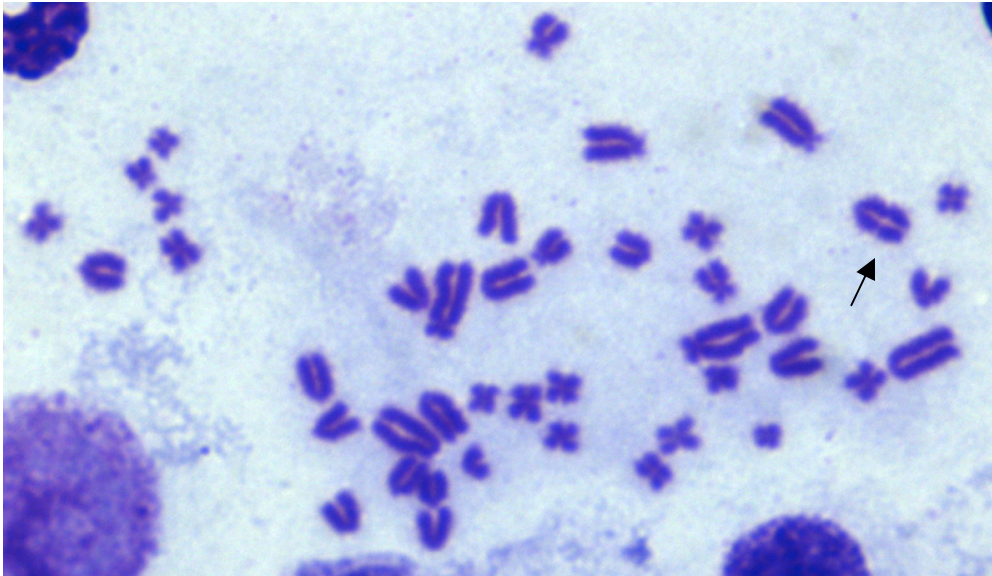
Şekil 4.3. İzokromatid kırık anomalisi



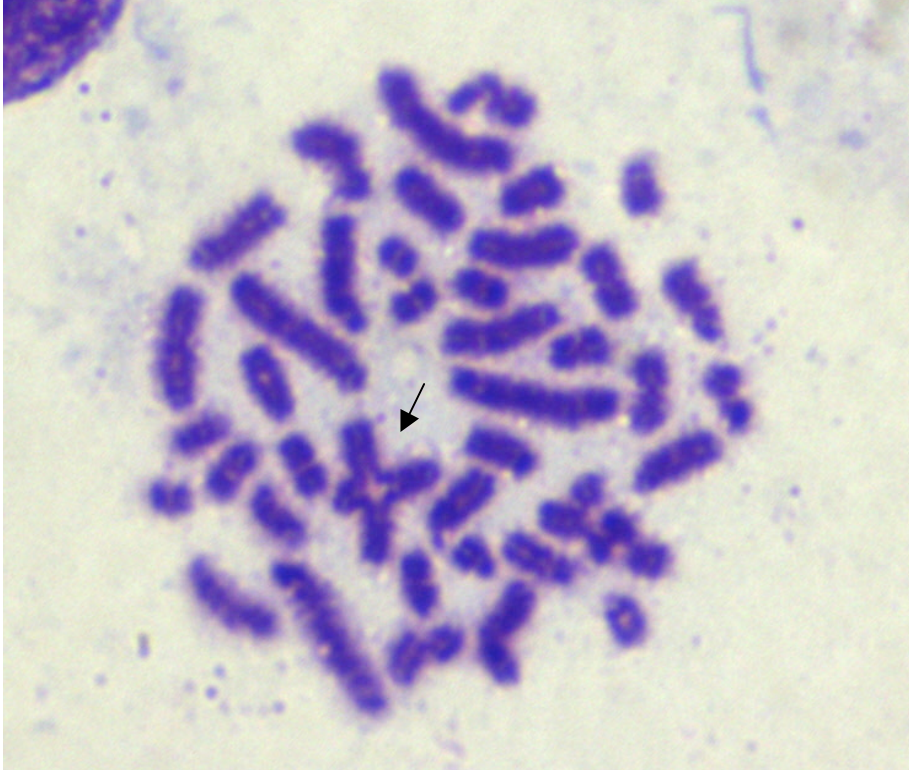
Şekil 4.4. Triradial figür anomalisi



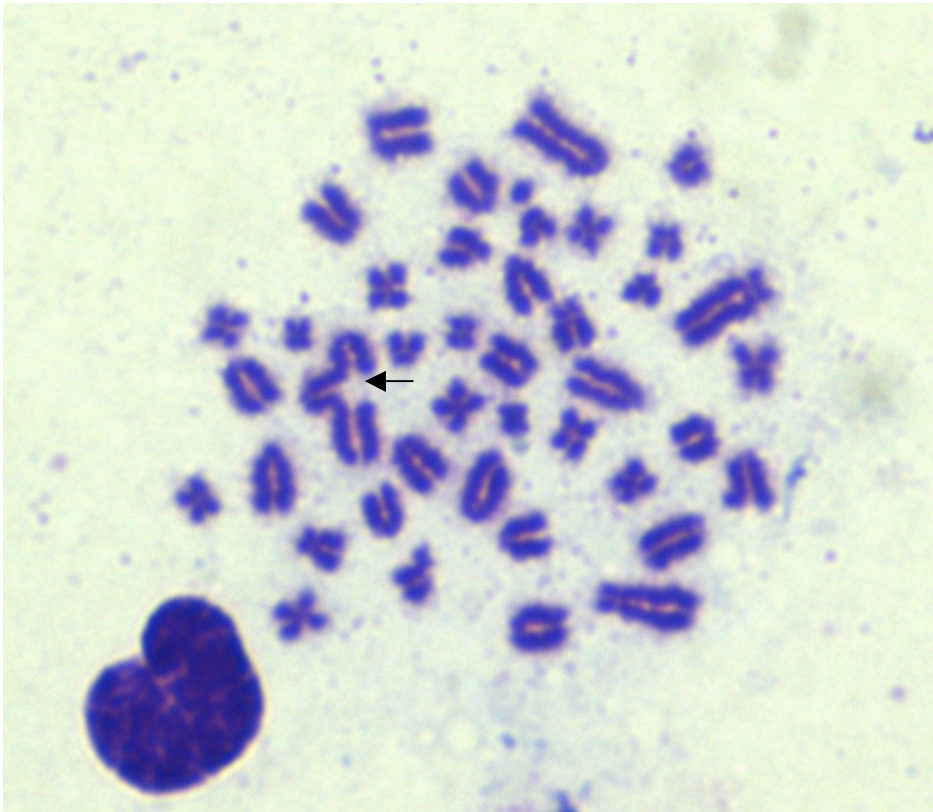
Şekil 4.5. Kromatid kırığı anomalisi



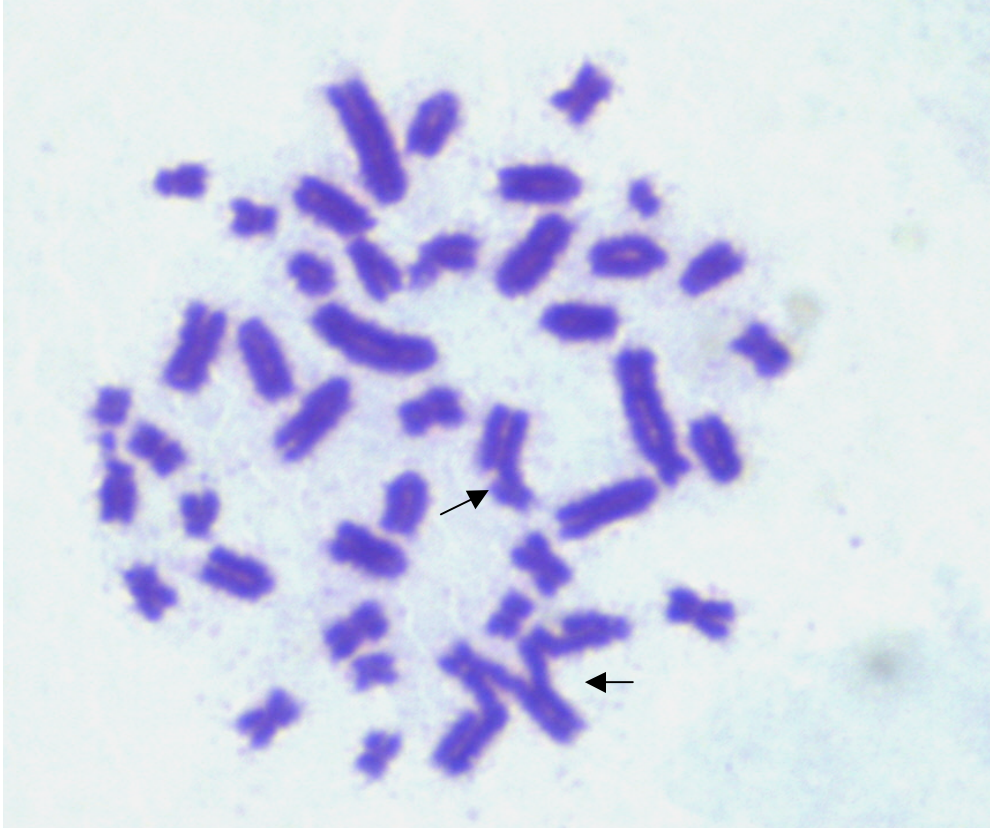
Şekil 4.6. Gap



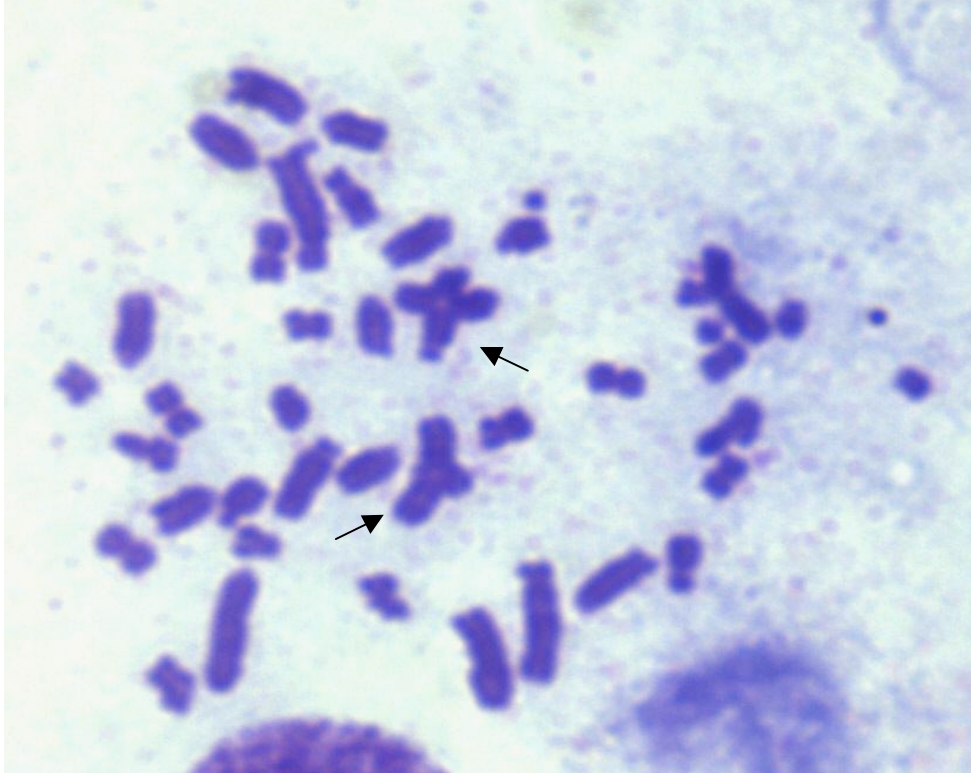
Şekil 4.7. Quadriradial figür anomalisi



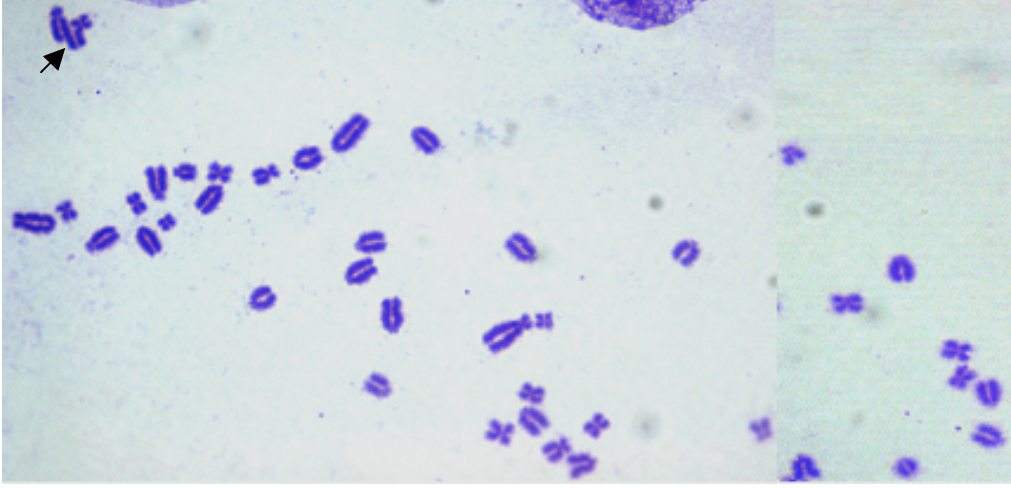
Şekil 4.8. Kompleks Exchange anomalisi



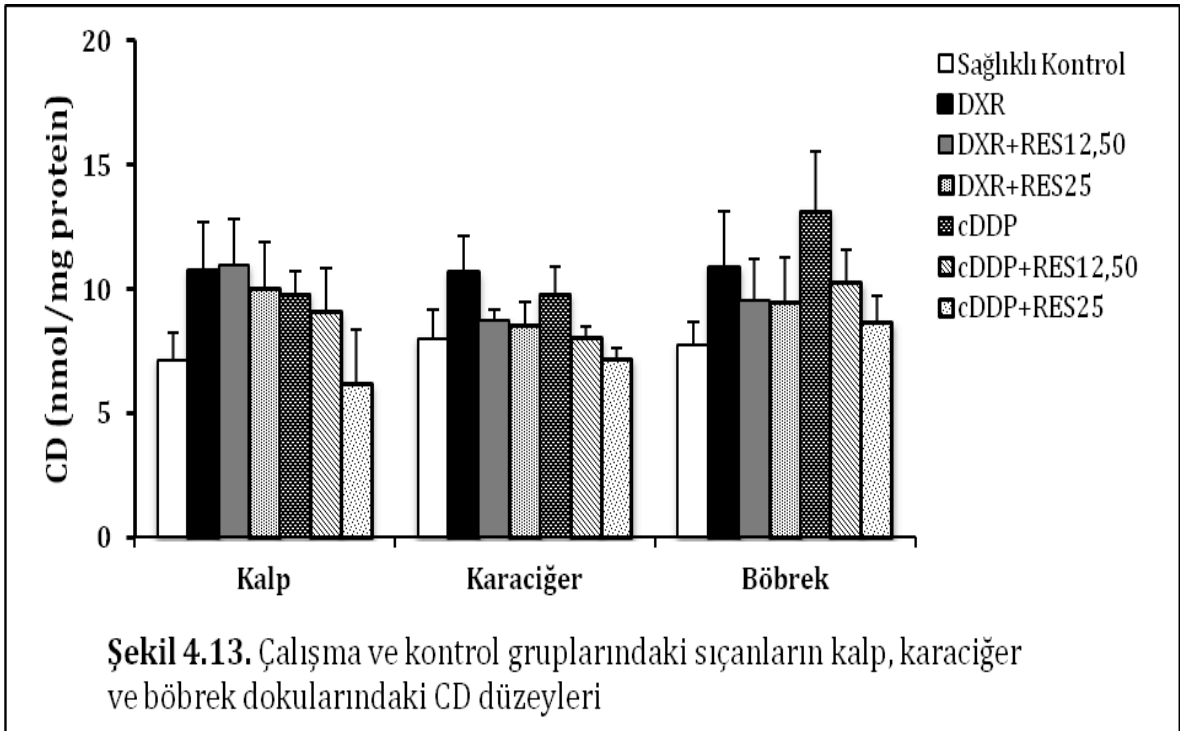
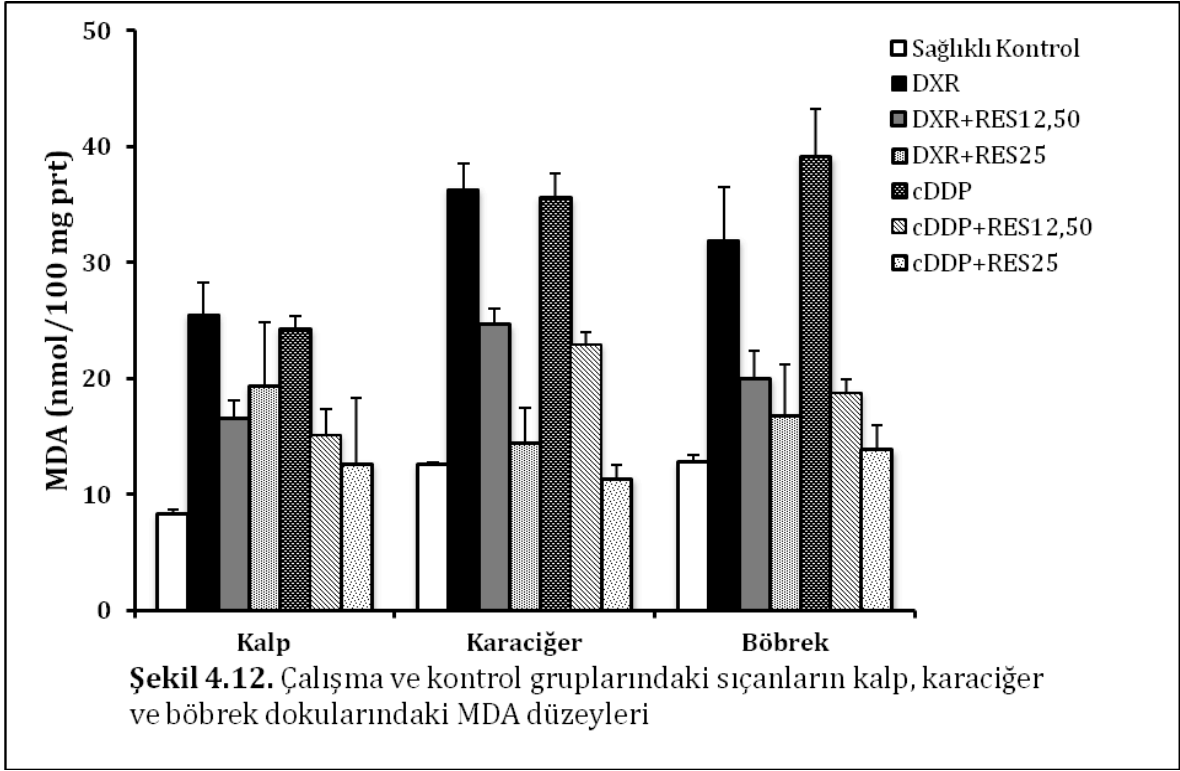
Şekil 4.9. Kompleks Exchange ve kromatid kırığı anomalileri

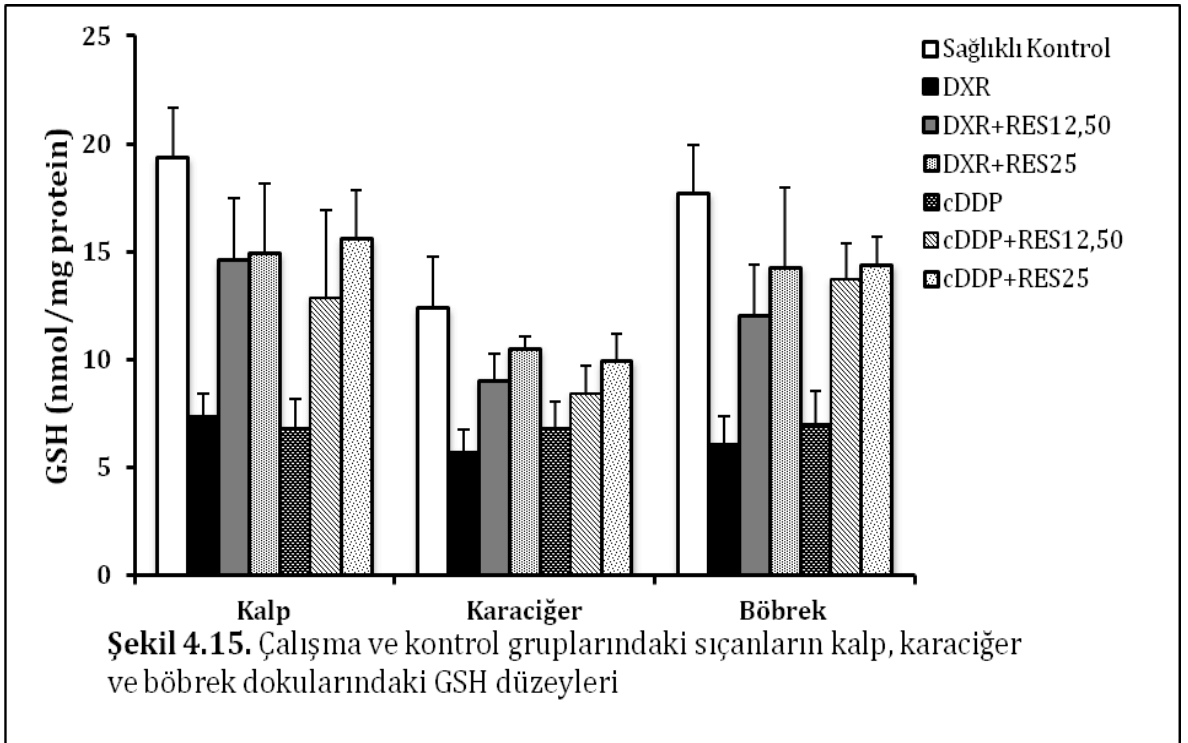
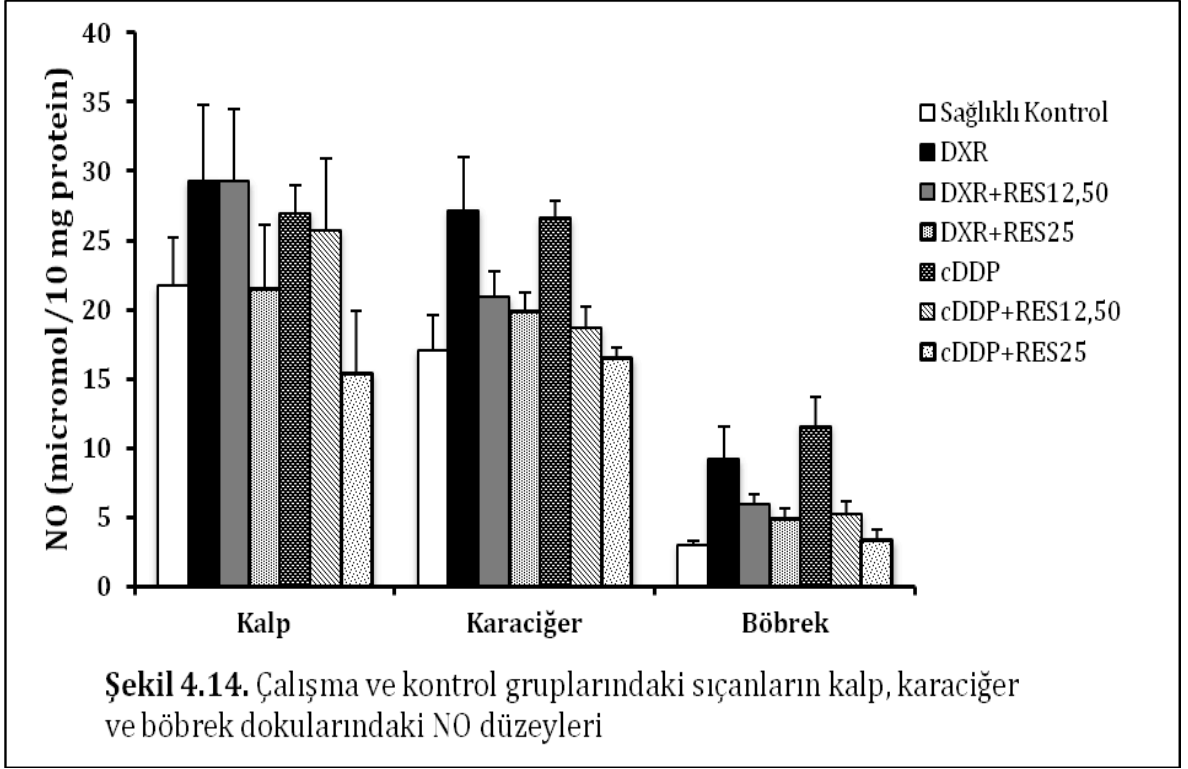


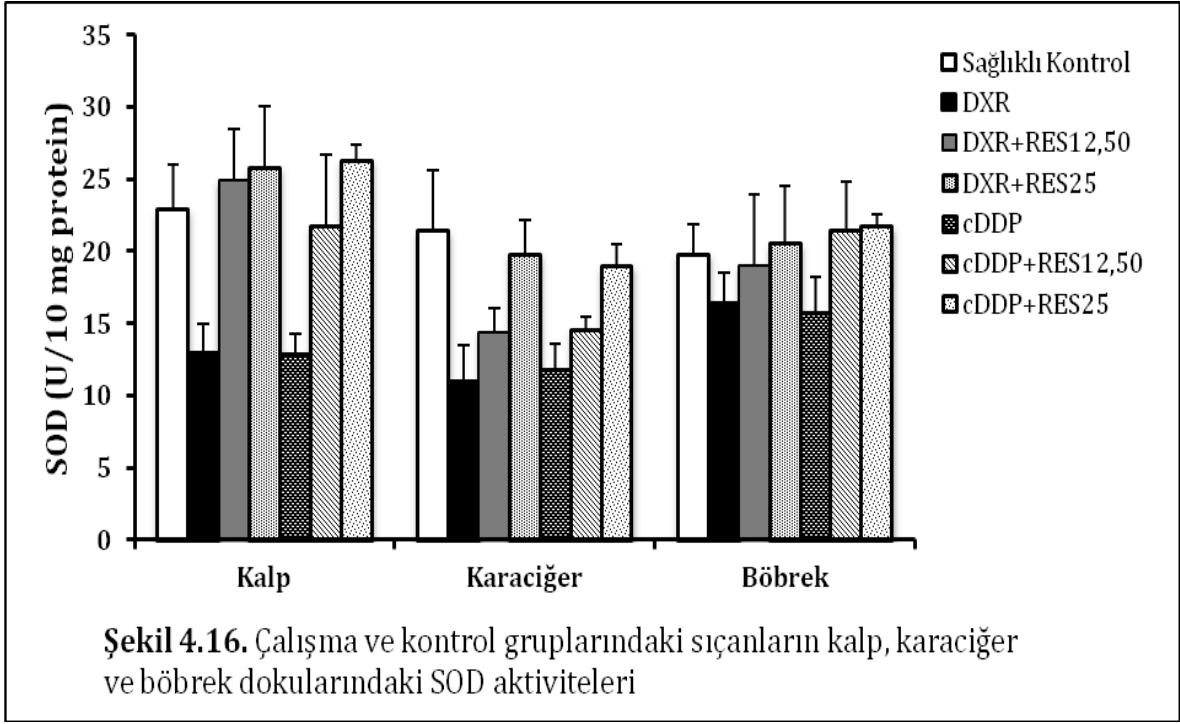
Şekil 4.10. Triradial ve quadriradial figürler



Şekil 4.11. Translokasyon kromozomları







5. TARTIŞMA

Kemoterapötik ilaç olarak kullanılan doksorubisin (DXR) ve sisplatinin (cDDP) kemik iliği hücrelerinde oluşturduğu kromozomal hasarlara karşı bir antioksidant olan resveratrolün in vivo koruyucu etkisi, ilk kez bu araştırmada çalışıldı. Oral veya intravenöz yolla alınan resveratrolün plazma konsantrasyonunun düşük olması ve glukuronid ile sülfat konjugatlarına çok hızlı bir şekilde metabolize olması nedenleriyle biyoyararlılığı düşüktür (Almeida et al., 2009; Kapetanovic et al., 2011; Nunes et al., 2009). Artan ve tekrarlayan dozlarda verildiğinde, resveratrolün biyoyararlılığının arttığını gösteren çalışmalar vardır (Almeida et al., 2009; Nunes et al. 2009). İşaretli resveratrol (¹⁴C-resveratrol) ile yapılan bir çalışmada (Walle et al., 2004), oral olarak verilen 25 mg (110µM) resveratrolün plazma yarılanma ömrünün 9,2 saat, intravenöz yolla 0,2 mg verildiğinde ise plazma yarılanma ömrünün 11,4 saat olduğu tespit edilmiştir. Veriliş şekli hangi yolla olursa olsun yarılanma ömrünün düşük olması ve hızlı metabolize olması, resveratrolün biyoyararlılığını düşürmektedir. Resveratrolde daha iyi faydalanabilmek için yarılanma ömrü ile ilgili bilgilerin yanında hücresel düzeyde etkin olan konsantrasyonlarının da bilinmesi gerekmektedir. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda, resveratrolün 50 mg/kg bw'lik oral dozunun karaciğer ve böbrekte 25-30 µM konsantrasyona ulaştığı ve bu miktarın moleküler hedefler üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Kode et al., 2008; Vitrac et al., 2003). Başka bir çalışmada (Carsten et al., 2008), farelerde radyasyonun indüklediği kromozom anomalilerine karşı 100 mg/kg.bw.'lik resveratrolün koruyucu doz olduğu bulunmuştur.

Resveratrol, yüksek dozlarda toksik etki yapmaktadır. Sıçanlarda, 3000 mg/kg.bw. dozun, vücut ağırlığı ve besin alımında azalma; BUN, kreatinin, alkalın fosfataz, alanin amino transferaz, total bilirubin ve albumin değerlerinde yükselme; hemoglobin, hemotokrit ve alyuvar sayılarında azalma gibi klinik toksisite belirtilerine yol açtığı; böbreklerde lezyon ve nefropatiye sebep olduğu; bununla birlikte günlük 300 mg/kg bw'lik dozun ise hiçbir yan etkiye yol açmadığı tespit edilmiştir (Crowel et al., 2004).

Bizim çalışmamızda, biyoyararlılığının düşük olması ve hızlı metabolize olması nedeniyle; resveratrol, hücresel düzeyde etkin olabilmesi için sık ve tekrarlayan dozlarda intraperitoneal olarak verildi. 12,50 ve 25 mg/kg.bw olmak üzere iki farklı dozda uygulanan resveratrol, DXR veya cDDP uygulamasından yarım saat önce, DXR veya cDDP ile birlikte ve bundan sonraki her altı saatte bir olacak şekilde 24 saat süresince uygulandı

(günlük kümülatif doz sırasıyla 62,5-125 mg/kg.bw). Çalışmamızda, sık ve tekrarlayan dozlarda uygulanan resveratrolün, kemik iliği hücrelerinde DXR veya cDDP'nin neden olduğu kromozom anomalilerini anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü. Çalışmamızda ayrıca, resveratrolün, DXR veya cDDP'nin kalp, karaciğer ve böbrek dokularında neden olduğu azalmış antioksidan kapasiteyi anlamlı olarak yükselttiği tespit edildi.

Resveratrolün, DXR'nin neden olduğu kromozomal hasarlara karşı anti-genotoksik etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. İlk defa bizim çalışmamızda, resveratrolün, DXR üzerinde kromozomal hasarları anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi. Farklı indükleyicilerle kromozom anomalisi oluşturulan modellerle yapılan çalışmalarda, resveratrolün anti-genotoksik etkisi olduğu belirtilmektedir (Carsten et al., 2008). Radyasyon kullanılarak kromozom anomalisi oluşturulan farelerle yapılan bir çalışmada, oral olarak verilen resveratrol (100mg/kg bw), radyasyon uygulamasından iki gün önce başlanarak her 24 saatte bir ve radyasyondan yarım saat önce olacak şekilde uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, resveratrol+radyasyon grubundaki gap, fragment, disentrik ve robertsonian translokasyon anomali değerlerinin radyasyon grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunduğu ($p<0,05$) ve toplam kromozom anomali sayısında 2,1 kat azalma olduğu belirtilmiştir (Carsten et al., 2008).

Çalışmamızda kullandığımız DXR, DNA hasarlarına ve serbest radikaller üretimine sebep olduğu için sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etkilidir (Dhawan et al., 2003). Antikanser ilaç olarak kullanılan DXR'nin, sağlıklı insan lenfositlerinde ve kemik iliği hücrelerinde klastojenik etkisi olduğu şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Dhawan et al., 2003; Lynch et al., 2003; Takeuchi et al., 2008). DXR'nin, DNA üzerindeki direk etkileri, özellikle, DNA Topoizomerez II (TopoII) inhibisyonu, DNA interkalasyonu ve DNA alkilasyonu mekanizmaları ile olmaktadır (Granados-Principal et al., 2010; Kayaalp, 2000; Müller et al., 1997). DXR, TopoII'nun tirozin kalıntılarına bağlanarak DXR-DNA-topoII kompleksinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu kompleks, TopoII'nun, DNA'da meydana getirdiği geçici kırığın tekrar eski haline dönmesine engel olmakta ve DNA sentezine zarar vermektedir (Bigioni et al., 2001; De Graff et al., 2003; Fortune et al., 2000; Giles et al., 2005; Minotti et al., 2004; Noviello et al., 1994; Sabourin et al., 2000; Walker and Nitiss, 2000). DXR, ayrıca guanin ve sitozin baz çiftleri arasına girerek, interkalasyona ve dolayısıyla DNA hasarlarına neden olmaktadır (Quiles et al., 2002). *In vitro* genotoksisite çalışmalarında, DXR'nin tek ve çift iplik kırılmalarına neden olduğu rapor edilmiştir (Ally et al., 1999; Helbig and Speit, 1995;

Newsome and Littlefield, 1975; Szabova, 1996). İn vivo olarak yapılan çalışmalarda ise, DXR'nin, deney hayvanlarının kemik iliği ve kan lenfosit hücrelerinde, kromatid tip kırılmalara, kompleks exchange anomalilerine, mitotik indekste azalmaya ve anormal metafazda artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Au and Hsu, 1980; Dhawan et al., 2003; Gülkaç et al., 2004; Larramendly et al., 1980; Rosselli et al., 1990; Szabova, 1996; Tavares et al., 1998; Tohamy et al., 2003). DXR, DNA'yı doğrudan etkileyebileceği gibi, serbest radikal oluşumlara yol açarak dolaylı bir şekilde de etkileyebilmektedir. Diğer taraftan, DXR'nin redoks döngüsü reaksiyonları ile ortaya çıkan süperoksit radikalleri, DNA'da ciddi hasarlara neden olabilmektedir (Quiles et al., 2002).

Çalışmamızda, 12,5 ve 25 mg'lık resveratrol dozlarından sadece 25mg'lık dozun, DXR'nin sıçan kemik iliği hücrelerindeki genotoksik etkileri azaltmada anlamlı derecede etkili olduğu görüldü. Elde ettiğimiz bulgulara göre; DXR grubundaki hayvanların kemik iliği hücrelerindeki kromatid tipi kırık, kompleks exchange, triradial ve quadriradial tipteki kromozom anomali değerleri, kontrol gruplarına göre, beklenildiği şekilde anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). DXR+RES12,50 grubu, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, sadece kromatid tip kırık değerlerinin anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p<0,05$); fakat, kompleks exchange, triradial ve quadriradial figür anomalilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). DXR+RES25 grubundaki kromatid kırık ve quadriradial anomali değerleri, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p<0,05$); kompleks exchange ve triradial figür değerleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES25 grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kromatid tipi kırık, kompleks exchange ve triradial figür değerleri anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); quadriradial figür değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Toplam kromozom anomalileri ve anormal metafaz ortalama değerleri açısından bakıldığında, DXR+RES12,5 grubu ile DXR grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); DXR+RES25 grubunda DXR grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). DXR+RES12,50 ve DXR+RES25 gruplarındaki toplam kromozom anomalileri ve anormal metafaz frekansları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). DXR+RES25 grubundaki toplam kromozom anomali ve toplam anormal metafaz değerleri DXR+RES12,5 grubu karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). Elde ettiğimiz sonuçlar, özellikle 25 mg'lık resveratrol uygulamasının, DXR'nin neden olduğu kromatid tipi kırık,

kompleks exchange, quadriradial figürler, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz değerlerini anlamlı düzeyde azalttığı; mitotik indeksi ise anlamlı düzeyde yükselttiği görüldü ($p < 0,05$). Toplam kromozom anomalileri açısından baktığımızda, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, resveratrolün 2,01 kat oranında azalma sağladığı; fakat, bu azalmanın kontrol gruplarındaki değerlere ulaşacak düzeyde olmadığı görüldü.

Çalışmamızda kullandığımız cDDP'nin, normal hücreler üzerinde genotoksik etkisi olduğu daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Antunes et al., 2005; Antunes et al., 2000; Evangelista et al., 2004; Ohe et al., 1990; Nefic, 2001; Saad et al., 2009; Silva et al., 2001). Sisplatin, genotoksik etkisini, DNA'ya direk bağlanarak veya dolaylı yoldan serbest radikal oluşumlarına yol açarak göstermektedir. Sisplatinin reaktif formu, DNA üzerindeki nükleofilik bölgelerle reaksiyona girebilmekte ve bu durum DNA alkilasyonuna yol açmaktadır. DNA alkilasyonu, DNA'da lezyonların oluşmasına, dolayısıyla mutasyonlara ve yapısal kromozom hasarlarına neden olmaktadır (Brabec et al., 1990; Fuertes et al., 2002; Gentile et al., 1998; Jones et al., 1991; Kartalou and Essigmann, 2001; Kliesch and Adler, 1987; Rabik and Dolan, 2007; Sidik, 2003; Vogel et al., 1991). cDDP; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktif oksijen türlerinin oluşumunu indükleyerek de DNA'da mutajenik etki yaratmaktadır (Badary et al., 2005; Baliga et al., 1998; Masuda et al., 1994; Matsushima et al., 1998; Shino et al., 2003).

Resveratrolün, kemoterapötik ajan olarak kullanılan cDDP'nin normal hücrelerde neden olduğu genotoksik etkileri azalttığını gösteren yalnızca bir yayın bulunmaktadır (Attia, 2012). Attia (2012), resveratrolü, erkek swiss albino farelere, 50 mg/kg bw ve 100 mg/kg bw dozlarında, her gün tek doz olacak şekilde, 14 gün boyunca uygulamıştır. Attia'nın çalışmasında, alkalın comet assay kullanılarak, kemik iliği hücrelerindeki DNA tek ve iki iplik kırıkları analiz edildiğinde, resveratrol uygulanan sisplatin gruplarındaki DNA kırıkları frekansının, cDDP grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunduğu belirtilmektedir ($p < 0,01$). Bizim çalışmamız, resveratrolün uygulanması ve kromozom kırıklarının incelenmesi aşamalarındaki yöntemler açısından, Attia'nın uyguladığı yöntemden farklıdır. Bizim çalışmamızda, resveratrolün 24 saatlik periyottaki etkisi araştırıldı ve 5 mg/kg sisplatin uygulamasından 24 saat sonra kemik iliği aspirasyonu yapıldı. Bu uygulamamızın sebebi, Roselli et al. (1990) ve Antunes et al. (2000)'nin belirttiği gibi, en fazla kromozom anomalisi, tek doz sisplatin (5 mg/kg bw)

uygulamasından 24 saat sonra görülmesinden kaynaklanmaktadır.

Bizim çalışmamızda, sisplatin genotoksitesisi üzerine resveratrolün etkisi ile ilgili elde ettiğimiz bulgulara göre; kromatid kırığı, kompleks exchange, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz ortalama değerlerinin gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,001$). cDDP uygulanan hayvanların kemik iliği hücreleri; kontrol, cDDP+RES12,50 ve cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanlarla karşılaştırıldığında; kromatid kırık, kompleks exchange, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz ortalama değerleri beklenildiği şekilde anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$). cDDP+RES12,50 grubundaki kromatid kırıklar ve kompleks exchange değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p < 0,05$); cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, sadece kromatid tip kırık değerleri, anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0,05$). cDDP+RES25 grubundaki hayvanların kromatid tipi kırık değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p < 0,05$); kompleks exchange değerleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). cDDP+RES25 grubundaki hayvanların kromatid kırık ve kompleks exchange değerleri, cDDP grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0,05$).

Çalışmamızda, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz değerleri; cDDP+RES12,50 grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p < 0,05$); cDDP grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0,05$). cDDP+RES25 grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$). cDDP+RES25 grubuna ait toplam anormal metafaz değerleri, cDDP+RES12,5 grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p < 0,05$); toplam kromozom anomalisi değerleri açısından, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). Elde ettiğimiz sonuçlar; resveratrolün cDDP'nin neden olduğu kromatid tipi kırıklar, kompleks exchange anomalileri, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz ortalama değerlerini, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığını göstermiştir ($p < 0,05$). Ayrıca, cDDP'nin neden olduğu mitotik indeksteki azalmanın resveratrol kullanımı ile konsantrasyona bağlı şekilde anlamlı olarak yükseldiği gözlemlendi ($p < 0,05$). Sonuçta toplam kromozom anomalilerinin cDDP grubuyla karşılaştırılmasında; resveratrolün, 3,42 kat oranında azalma sağladığı ve elde edilen değerlerin kontrol gruplarından farklı olmadığı görüldü ($p > 0,05$).

Çalışmamızda; kontrol grubu, sadece RES12,50 ve sadece RES25 verilen gruplarını birbirleri ile karşılaştırdığımızda, toplam kromozom anomalisi ve anormal metafaz ortalama

frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). Bu sonuç, uygulanan resveratrol dozlarının, sağlıklı kemik iliği hücrelerindeki kromozomlarda herhangi bir hasara neden olmadığını göstermektedir. Resveratrolün genotoksik etkisinin olduğunu gösteren bir çalışmada, 1-60 μM konsantrasyonlardaki resveratrolün, L5178Y mouse lenfoma hücreleri ile Chinese hamster V79 hücrelerinde mikronukleus oluşumlarına neden olduğu belirtilmektedir (Schmitt et al., 2002). Yapılan başka bir çalışmada ise, kanser hücre sıralarında, resveratrole gösterilen tepkinin normal hücrelerden farklı olabileceği; örneğin, resveratrolün tümör hücrelerinde pro-apoptotik etki gösterirken normal hücrelerde bu etkiyi göstermediği ifade edilmektedir (Lu et al., 2001). Zaten resveratrolün in vitro mutajenite testinin (Ames) sonucu negatif olarak belirlenmiştir (Matsuoka et al., 2001; Edwards et al., 2011). Ayrıca, resveratrolün klastojenik etkisini araştıran in vivo bir çalışmada, sıçanlarda 2000 mg/kg bw doza kadar negatif sonuç elde edilmiştir (Williams et al., 2009). İn vivo modellerle yapılan başka çalışmalarda da resveratrolün normal hücrelerde genotoksik etkisinin olmadığı açıklanmaktadır (Attia, 2012; Carsten et al., 2008). Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralel bir şekilde, bizim çalışmamızda da 12,5 ve 25 mg/kg bw'lık resveratrol dozlarının sık ve tekrarlayan aralıklarla 24 saatlik periyotta verilmesi sonucunda, sadece resveratrol verilen gruplarda kromozom anomalileri açısından kontrol grubundan farklı bir sonuç alınmamış ve genotoksik bir etki gözlenmemiştir.

Kromozom anomalileri üzerine, resveratrolün etkisinin hangi mekanizmalarla gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda, doksorubisin veya sisplatinin neden olduğu kromozom hasarlarının azalmasında, resveratrolün antioksidant fonksiyonunun katkı sağlamış olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızdan elde ettiğimiz biyokimyasal bulgular da bu görüşümüzü desteklemektedir. Doksorubisin ve sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar, hücrelerdeki oksidatif stresin oluşumuna katkı sağlamakta ve dolayısıyla DNA üzerinde kırılmalara ve oksidatif lezyonların oluşmasına neden olmaktadır. Resveratrol; antioksidant fonksiyonunu, ROT oluşumlarını azaltarak ve antioksidan aktiviteyi artırarak göstermektedir. Resveratrol, OH radikalleri ile oldukça etkin biçimde reaksiyona girdiği için iyi bir radikal süpürücü fonksiyonuna sahiptir (Leonard et al., 2003). Sgambato et al. (2001), 30 ve 90 μM 'lık dozlarında uygulanan resveratrolün oksidatif strese indüklenen sıçan fibroblast kültüründe ortaya çıkan reaktif oksijen birikimlerini %26,4-%57,3 azalttığını tespit etmiştir. DNA'daki oksidatif hasarın

en önemli belirteçlerinden biri, 8-oxo-7,8 dihiro-2-deoksiguanozin (oxo8dG) oluşumlarıdır (Floyd, 1990). Yapılan başka bir çalışmada, potasyum bromür (KBrO₃) ile indüklenen böbrek hücrelerinde ortaya çıkan oxo8dG oluşumlarını, resveratrolün anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (Cadenas and Barja, 1999). TAR (sigara dumanı) ve 1,2 dimetilhidrazin (DMH) gibi başka indükleyici ajanlarla yapılan çalışmalarda da, fragmentasyona indüklenen DNA'da ortaya çıkan kırıkların ve oksidatif stresin azaltılmasında, resveratrol uygulamasının etkili olduğu ve antioksidan enzim düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (Sengottuvelan et al., 2009; Sgambato et al., 2001).

Kemoterapötik ilaçlar lipit peroksidasyonuna ve dolayısıyla MDA düzeyinin artmasına neden olmaktadır. MDA; DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlarının kurulmasına ve özellikle guanin, adenin ve sitozin bazları ile etkileşerek DNA adduktlarının oluşmasına neden olabilmektedir (Marnett, 1999). Resveratrolün artmış MDA düzeyleri ile azalmış GSH düzeyleri ve SOD aktiviteleri üzerinde etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Alturfan et al., 2012; Chander et al., 2005; Rubilio et al., 2008; Sebai et al., 2011). Bizim çalışmamızda da, resveratrolün DXR veya cDDP'nin neden olduğu oksidatif etkilere karşı anti-oksidan etkisi; sıçanın kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA, CD, NO, GSH düzeyleri ve SOD aktivitelerindeki değişimlere bakılarak gösterildi. Bundan sonraki kısımda, biyokimyasal parametrelere ait bulgular değerlendirilmektedir.

Endojen veya eksojen yollarla oluşabilen süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi aktif oksijen türleri ile reaktif nitrojen türlerinin hücre içindeki konsantrasyonlarının artması neticesinde oksidatif stres artmakta ve antioksidan aktivite azalmaktadır. Etkisini enzimatik olarak gösteren süperoksit dismutaz (SOD) ile kofaktör olarak görev yapan glutatyon (GSH), en önemli antioksidan aktivite belirteçlerindedir. Serbest radikallerin indüklediği yağ asidi oksidasyonunun ürünleri olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) ve konjuge dien (CD), lipit peroksidasyon seviyesinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılan parametrelerdir. Nitrik oksit (NO) ise su ve oksijen varlığında kolayca oksitlenebilen bir serbest radikal ve önemli bir oksidatif stres belirteçidir.

Hücre membranının lipit kompozisyonu ve yapısal fonksiyonlarının sağlıklı olması, enzim aktiviteleri açısından gereklidir (Sanderman, 1978; Schmidley, 1990). MDA, reaktif oksijen türlerinin membran lipitleri üzerindeki bir dizi oksidatif reaksiyonları sonucu oluşan bir son üründür. Bu ürün, hücre membranında lipit peroksidasyonuna yol açarak

patolojik durumların oluşmasına neden olabilmektedir (Cesaj et al., 2004). DXR ve cDDP'nin çeşitli dokularda ve hücre kültürlerinde lipit peroksidasyonuna neden olduğu, buna bağlı olarak MDA düzeylerinde yükselme görüldüğü ve dokularda toksik etkileri olduğu şimdiye kadar yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Abdell-Aleem et al., 1997; Amaral et al., 2008; Attia, 2012; El-Habit, 2000; Saad et al., 2009; Silva et al., 2001; Simunek, 2009; Mansour et al., 2002; Wang et al., 2009). İn vitro ve in vivo çalışmalarda, resveratrolün, oksidatif strese indüklenmiş hücrelerde, artmış MDA düzeylerini düşürdüğü belirtilmektedir (Alturfan et al., 2012; Gedik et al., 2008; Kızıltepe et al., 2004; Leonard et al., 2003; Mizutani et al., 2001; Sinha et al., 2002; Tadolini et al., 2000; Zini et al., 1999).

DXR enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla serbest radikal oluşumlarına neden olmaktadır. DXR'nin redoks döngüsü sayesinde süperoksit radikalleri oluşmaktadır. DXR redoks döngüsünde, semikuinon üretimi ile süperoksit radikali ve akabinde hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşmaktadır. DXR'nin indüklediği NAD(P)H oksidaz aktivasyonu ile peroksinitritler oluşmaktadır (Gilleron et al., 2009). DXR'nin indüklediği serbest radikal oluşumları, ferritinden demirin salınımını tetiklemekte ve bu şekilde artan serbest demir, DXR ile bir dizi reaksiyona girerek hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır (Chen et al., 2007). Diğer taraftan, DXR metabolizması sonucu aglikon ve doksorubisinol adı verilen metabolitler de serbest radikal oluşumlarına neden olmaktadır (Chen et al., 2007).

Kalp, karaciğer ve böbrek gibi dokularda toksik etkileri olmakla birlikte; DXR kardiyotoksitesisi, doz sınırlayıcı faktördür (Chen et al., 2007). DXR kardiyotoksitesisinde resveratrolün etkisini gösteren bir çalışmada, farelere, DXR (8 mg/kg bw) üç hafta aralıklarla intraperitoneal olarak, resveratrol ise (15 mg/kg bw) yiyeceklere katılarak 7 hafta boyunca günlük olarak verildiğinde; kalp dokularında artmış MDA düzeyinin %69 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Zhang et al., 2011). Başka bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan DXR (20mg/kg bw) kardiyotoksitesisinde, artmış MDA düzeylerinin, 7 haftalık resveratrol uygulamasının sonucunda düştüğü gözlenmiştir (Tatlidere et al., 2009). Resveratrolün cDDP toksitesisi üzerinde de etkili olduğu ve dokularda artmış MDA düzeylerini düşürdüğü belirtilmektedir (Amaral et al., 2008).

Resveratrolün lipit peroksidasyonu üzerine olan etkisinin hangi mekanizmalarla olduğu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda serbest radikal oluşumlarının, Na-K-ATPase aktivitesini inhibe ederek lipit peroksidasyonu artırdığı (Chong et al., 1985; Simao et al., 2011; Wyse et al., 2000); resveratrol tedavisinin ise ROT oluşumlarını

azaltarak Na-K-ATPase aktivitesindeki inhibisyonu önlediği ve artmış MDA düzeyleri ile lipit peroksidasyon hasarını azalttığı belirtilmektedir (Simao et al., 2011; Tatlıdere et al., 2009).

Bizim çalışmamızda; MDA düzeyleri, sadece DXR ve sadece cDDP uygulanan hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol gruplarına göre beklenildiği şekilde anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda, DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarındaki hayvanların karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA düzeyleri, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarının kalp dokularının MDA düzeyleri ise DXR grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir şekilde düşük bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p>0,05$). Çalışmamızda, cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularının MDA düzeyleri, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyona bağlı bir şekilde anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Çalışmamızda, resveratrolün MDA üzerindeki etkisinin indükleyici ajanlara ve doku tiplerine bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. DXR'nin kalp dokusunda kardiyotoksositeye neden olduğu ve bu olumsuz etkinin ilacın kullanımında doz sınırlayıcı faktör olduğu bilinmektedir (Chen et al., 2007). Çalışmamızda kullandığımız resveratrol dozlarının, DXR'nin indüklediği MDA artışını anlamlı olarak azalttığını; fakat, bu azalmanın normal değerlere ulaşacak şekilde olmadığını gözlemledik. Diğer taraftan, resveratrolün cDDP'nin kalp dokusunda neden olduğu MDA artışını konsantrasyona bağlı bir şekilde anlamlı olarak düşürdüğü, hatta elde edilen sonuçların kontrolden farklı olmadığı gözlemlendi. Karaciğer ve böbrek dokularında ise hem DXR, hem de cDDP'nin indüklediği artmış MDA düzeylerinin, resveratrol kullanımı ile konsantrasyona bağlı bir şekilde anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

CD, lipit peroksidasyonu sırasında oluşan bir ara üründür. Lipit peroksidasyonunun başlangıç aşamasında, lipit radikalleri, lipit radikallerinin oksijen ile reaksiyonu sonucu ise lipit peroksi radikalleri oluşur. Daha sonraki aşamada, moleküller arasında çift bağların kurulmasıyla CD'ler oluşur. Yapılan çalışmalarda, DXR ve cDDP'nin, dokularda CD düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Firdous and Kuttan, 2012; Hrelia et al., 2002;

Naganuma et al., 1988; Olan and Wachowicz, 2004). Kemoterapötik ilaçların dokular üzerindeki kronik toksik etkilerinin yanında, akut toksik etkileri de bulunmaktadır. Örneğin, DXR tedavisinde uygulamadan yaklaşık 1 saat sonra konjuge dien üretimi artmaktadır (Hrelia et al., 2002). Lipit peroksidasyonunu daha erken dönemde tespit etmek için CD düzeylerine bakmak gerekmektedir. Yapılan birkaç çalışmada, resveratrolün, lipit peroksidasyon ara ürünü olan CD düzeyleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, DXR (20mg/kg bw) kardiyotoksitesisi oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 3 veya 5 gün uygulanan resveratrolün (100 ve 200 mg/kg bw), artmış CD düzeylerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Andreadou et al., 2007). cDDP uygulaması ile kan platelet toksitesisi oluşturulan hücre modelinde de, resveratrolün (1-25 µg/ml), artmış CD düzeylerini konsantrasyona bağlı bir şekilde anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Olan and Wachowicz, 2004).

Bizim çalışmamızda da, yukarıdaki bulgulara benzer şekilde, CD düzeyleri, sadece DXR ve sadece cDDP uygulanan hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda, DXR toksitesisinde, uyguladığımız resveratrol dozlarının kalp ve böbrek dokularında, artmış CD düzeyleri üzerinde, DXR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak bir farklılığa yol açmadığı görüldü ($p>0,05$). DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarının karaciğer dokularındaki CD düzeyleri ise DXR grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p>0,05$). Çalışmamızda, cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanların karaciğer ve böbrek dokularındaki CD düzeyleri, cDDP grubuyla karşılaştırdığımızda, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı düzeyde düşük bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Kalp dokusunda ise 25 mg'lık resveratrol dozunun, cDDP'nin indüklediği artmış CD düzeylerini anlamlı düzeyde düşürdüğü gözlemlendi ($p<0,05$).

Reaktif nitrojen türü olan NO, anti-inflamatory fonksiyonu olan bir vazodilatördür. Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türleri NO ile birleşerek, oldukça reaktif peroksinitritlerin oluşmasına ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (Frombaum et al., 2012). DXR ve cDDP'nin kalp ve böbrek dokularında NO düzeylerini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Goormaghtigh et al., 1990; Güleç et al., 2004; Srivastava et al., 1996; Watanabe et al., 2000; Wallace, 2003; van Norren et al., 2009).

Oksidatif stres, İNOS aktivasyonunu indüklemekte ve dolayısıyla NO salınımını artırmaktadır. DXR'nin dokularda yol açtığı toksik etkilerden biri, iyon kanallarını etkileyerek hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırmasıdır (Wallace, 2003; Goormaghtigh et al., 1990; van Norren et al., 2009). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması, yapısal NOS'u aktif hale getirerek, NO konsantrasyonunun aşırı artışına neden olmaktadır. Resveratrolün, anti-inflamasyon ve anti-oksidadant fonksiyonları sayesinde, oksidatif stresin neden olduğu NO artışı önlenmektedir. Yapılan bir çalışmada, DXR'nin (20mg/kg bw) sıçan torasik aortunda neden olduğu artmış eNOS ve iNOS ekspresyonlarını resveratrolün (10 mg/kg bw) inhibe ettiği ve buna bağlı NO artışını önlediği gösterilmiştir (Olukman, 2009). Başka bir çalışmada, DXR (20 mg/kg bw) uygulaması ile karaciğer ve böbrek dokularında iNOS ve eNOS ekspresyonlarının anlamlı düzeyde yükseldiği ve dolayısıyla NO miktarının arttığı, resveratrolün (20 mg/kg bw) ise bunlar üzerinde azaltıcı etkide bulunduğu gösterilmiştir (Öktem et al., 2010; Tsai et al., 1999). Diğer in vivo çalışmalarda da, oksidatif strese indüklenmiş farklı dokularda ortaya çıkan artmış NO düzeylerinin resveratrol tarafından düşürüldüğü gösterilmiştir (Sebai et al., 2011; Simao et al., 2011). Resveratrolün NFκB'nin transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek iNOS aktivasyonunu önlediği ve bu sayede NO salınımını azaltabileceği belirtilmektedir (Tsai et al., 1999).

Bizim çalışmamızda, NO düzeyleri, sadece DXR ve sadece cDDP uygulanan hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında kontrol gruplarına göre beklenildiği şekilde anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda, DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarındaki hayvanların karaciğer ve böbrek dokularındaki NO düzeylerinin, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Kalp dokusu ile ilgili bulgularımıza göre ise sadece DXR+RES25 kombinasyon grubundaki NO düzeylerinin, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,05$). Çalışmamızda, cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanların karaciğer ve böbrek dokularındaki NO düzeylerinin, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ($p<0,05$) ve kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Kalp dokusu ile ilgili bulgularımıza göre ise sadece cDDP+RES25 kombinasyon grubundaki NO düzeylerinin, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,05$). Daha önceden yapılan çalışmalarda, kalp dokusunun, antioksidan aktivitesinin düşük, NOS enzim seviyesinin ise yüksek olduğu ifade edilmektedir (Green

and Leeuwenburgh, 2002; Jung and Reszka, 2001). Çalışmamızda, kalp dokusunda oluşturulan DXR ve cDDP toksisitesine bağlı artmış NO düzeyleri üzerinde 25 mg'lık resveratrol dozunun etkili olduğu görüldü. 12,5 mg'lık resveratrol dozunun NO düzeyleri üzerinde etkili olamaması, kalp dokusundaki hassasiyet ile açıklanabilir.

GSH, bir hücrenin redoks durumunu ifade eden başlıca moleküldür. Okside (GSSG) ve redükte (GSH) formdaki glutatyonun hücre içindeki oranının sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Oksidatif stresin, GSSG lehine olan artışında hücre içinde pek çok enzimin hasar görmesi kaçınılmazdır. Enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla, DXR'nin indüklediği serbest radikal oluşumlar, oksidatif strese ve GSH düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (Horenstein et al., 2000; Jung and Reszka, 2001; Öktem, 2002; Quiles et al., 2002). cDDP toksisitesi sonucunda da birçok dokuda GSH düzeyleri azalmaktadır (Ajith et al., 2007; Güleç et al., 2004; Mansour et al., 2002; Olas and Wachowicz, 1998; Olas and Zbikowska, 1999; Saad et al., 2009; Shemida et al., 2005). cDDP, serbest radikal oluşumları artırarak (Amaral et al., 2008) ve GSH-platinum konjugatını oluşturarak, GSH düzeylerinin azalmasına neden olmaktadır (Eastmen, 1987; Ishikawa and Osman, 1993). H₂O₂, akrilamid, lipopolisakarit (LPS), siklosporin, pyragallol ve sigara dumanı gibi maddelerle oluşturulan oksidatif stresin GSH düzeylerini düşürdüğü; fakat, farklı yöntem ve dozlarda uygulanan resveratrolün, düşmüş GSH düzeylerini anlamlı olarak yükselttiği in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Almeida et al., 2008; Alturfan et al., 2012; Chander et al., 2005; Sebai et al., 2011; Upadhyay et al., 2008). DXR (20mg/kg bw) kardiyotoksitesini oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 7 haftalık resveratrol uygulamasının, kalp dokusunda azalmış GSH düzeylerini artırdığı gözlemlendi (Tatlidere et al., 2009). Resveratrolün, cDDP toksisitesi üzerine olan etkisi üzerine yapılan bir çalışmada da, resveratrol uygulamasının trombositler, lenfositler, kemik iliği ve böbrek dokularındaki azalmış GSH düzeylerini anlamlı olarak yükselttiği belirtilmiştir (Amaral, 2008; Attia, 2012; Olas et al., 2005; Wang et al., 2009).

Resveratrolün, GSH üzerindeki etkisinin hangi mekanizmalarla olduğu tam olarak bilinmemektedir. Redox duyarlı transkripsiyon faktörü Nrf2'nin, GSH düzeylerini kontrol eden GCL (Glutamat sistein ligaz) geni gibi, faz-II genlerinin transkripsiyonal regülasyonunda önemli rolü olduğu belirtilmektedir (Rahman et al. 2000). Transkripsiyon faktörü olan Nrf2'nin, hücrelerde, normalde stoplazmada bulunduğu ve Keap1 tarafından inaktive edildiği; fakat, resveratrolün Nrf2'nin nükleer translokasyonunu artırdığı

belirtilmektedir (Liu et al., 2011). Yapılan bir çalışmada, sigara dumanı ile oksidatif strese indüklenen insan akciğer alveolar epitelial hücrelerinde (A549), resveratrolün (10 μ M) Nrf2'nin nüklear translokasyonunu artırdığı ve dolayısıyla düşmüş GSH düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (Kode et al. 2008). UV ile oksidatif strese indüklenen HaCaT (insan keratinosit hücreleri) hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada, resveratrolün, Nrf-2 proteininin nüklear translokasyonunu artırdığı ve bunun da anti-oksidadant enzimlerin aktivasyonunun yükselmesine neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, resveratrolün, Keap1 proteininin yıkımını indükleyerek, Nrf2-Keap1 kompleksinin ayrılmasına neden olduğu; fakat bunun hangi mekanizma ile yapıldığının araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (Liu et al., 2011).

Bizim çalışmamızda, GSH düzeyleri, sadece DXR ve sadece cDDP uygulanan hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında, anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda, DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarının karaciğer ve böbrek dokularındaki GSH düzeyleri, DXR grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); DXR+RES25 grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Kalp dokusunda ise, DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarındaki GSH düzeyleri, DXR grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında, anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p>0,05$). Doksorubisinin glutatyon peroksidazı inhibe etmesi ve kalp dokusunun diğer organlardan daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olması gibi etkenler, bu dokunun oksidatif strese olan hassasiyetini artırmış olabilir (Jung and Reszka, 2001). Çalışmamızda, cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanların karaciğer dokusu GSH düzeyleri, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarının kalp ve böbrek dokuları GSH düzeyleri, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$).

En önemli intrasellüler antioksidan enzimlerden biri olan SOD, süperoksidinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlamakta ve lipit peroksidasyonunu engellemektedir. Çok yüksek miktarlarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde, SOD aktivitesi düşmektedir. Artmış serbest radikallerin etkisizleştirilmesi

sırasında, SOD enziminin fazla kullanılıyor olması ve katalaz enziminin inaktivasyonu ile ortaya çıkan hidrojen peroksidin SOD aktivasyonunu inhibe etmesi gibi durumlar, enzimin aktivitesini düşürebilmektedir (Hassan and Fridovich, 1978). İn vivo ve in vitro çalışmalarda; siklosporin, LPS, glutamat gibi indükleyici ajanlarla oksidatif stres oluşturulan modellerde, resveratrolün karaciğer, kalp, böbrek dokularında ve hücre kültürlerinde ortaya çıkan azalmış SOD aktivitelerini yükselttiği belirtilmektedir (Chander et al., 2005; Fukui et al., 2010; Rubilio et al., 2008; Sebai et al., 2011). DXR (20mg/kg bw) kardiyotoksitesi oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 7 haftalık resveratrol uygulamasının kalp dokusunda azalmış SOD aktivite düzeylerini artırdığı belirtilmektedir (Tatlidere et al., 2009). Sisplatin tedavisinde de yüksek oranda ROT oluşumu nedeniyle SOD aktivitesi azalmaktadır (Ajith et al., 2007; Güleç et al., 2004; Mansour et al., 2002; Olas et al., 2005; Olas and Wachowicz, 2004; Saad et al., 2009; Shemidia et al., 2005). Yapılan çalışmalarda, resveratrolün trombosit ve lenfositlerde, cDDP'nin neden olduğu düşük SOD düzeylerinin yükselmesini sağladığı rapor edilmiştir (Olas et al., 2005; Wang et al., 2009).

Bizim çalışmamızda, SOD aktiviteleri, sadece DXR ve sadece cDDP uygulanan hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, beklenildiği gibi anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,05$). Çalışmamızda, DXR+RES12,5 ve DXR+RES25 gruplarındaki hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokuları SOD aktiviteleri, DXR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,05$); kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Çalışmamızda, cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarındaki hayvanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki SOD aktivitelerinin, cDDP grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı şekilde yükseldiği gözlemlendi ($p<0,05$). cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 gruplarındaki kalp dokusu SOD aktiviteleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Karaciğer dokusu SOD aktiviteleri açısından bakıldığında, cDDP+RES12,5 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p<0,05$); fakat, cDDP+RES25 ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). cDDP+RES12,5 ve cDDP+RES25 grupları ile kontrol grubu arasında böbrek dokuları SOD aktivitelerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Kanser olgularını tedavi etmek için kullanılan kemoterapötik ilaçlardan DXR ve cDDP'nin normal hücrelerde neden olduğu toksik etkiler, bu ilaçların kullanımını

sınırlamaktadır. DXR ve cDDP'nin indüklediği reaktif oksijen ve nitrojen radikal oluşumlarının aşırı artışı, intraselüler antioksidan etkinliğin azalmasına neden olmakta ve bu durum, DNA dahil önemli birçok hücresel yapılarda harabiyete ve hasara yol açmaktadır. Bizim çalışmamızda, DXR ve cDDP uygulamasının, sıçanların kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA, CD ve NO düzeylerinde artışa; GSH ve SOD düzeylerinde azalmaya ve dolayısıyla oksidan-antioksidan dengesinin oksidan tarafa doğru bozulmasına neden oldukları görüldü. ROT hasarı, iki temel mekanizma ile önlenabilir. Bunlardan biri ROT oluşumlarını azaltmak, ikincisi de antioksidan aktiviteyi yükseltmektir. Aşırı artış gösteren serbest radikallerin varlığında, enzimatik antioksidanların yapısal ve konformasyonel değişikliğe uğraması ve enzimatik olmayan antioksidanların fazlaca tüketilerek azalması, antioksidan etkinliğin zayıflamasına neden olmaktadır (Olinski et al., 2002). Çalışmamızda, resveratrolün, DXR ve cDDP'nin neden olduğu oksidatif etkileri azalttığı ve hücresel antioksidan etkinliği artırdığı gözlemlendi. Polifenolik bir bileşik olan resveratrolün, oldukça yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğu ve özellikle 4. ve 5. pozisyonlardaki hidroksil gruplarının, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ gibi serbest radikalleri süpürücü fonksiyonu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Fauconneau et al. 1997; Teissedre et al. 1996; Leonard et al. 1997; Brito et al. 2006). Bunun yanında, resveratrolün, spesifik radikallerden en çok OH radikali ile reaksiyona girdiği belirtilmektedir (Leonard et al., 2003).

Bizim çalışmamızda, 25 mg/kg bw'lik resveratrol dozunun, sıçanların kemik iliği hücrelerinde, DXR'nin neden olduğu kromozom hasarlarında 2,01 katı oranında, cDDP'nin neden olduğu kromozom hasarlarında ise 3,42 katı oranında azalma sağladığı görüldü. Ayrıca resveratrolün; kalp, karaciğer ve böbrek dokularında artmış MDA, CD ve NO düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ($p<0,05$); düşmüş GSH düzeyleri ile SOD aktivitelerini ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselttiği ($p<0,05$) gözlemlendi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu bulgular ışığında; resveratrolün, DXR ve cDDP'nin doğrudan veya dolaylı yollarla neden olduğu artmış kromozom hasarlarının azalmasında ve dokulardaki azalmış antioksidan aktivitenin yükselmesinde, anti-genotoksik ve anti-oksidatif fonksiyonlarının önemli derecede katkı sağlamış olabileceğini söyleyebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, doksorubisin (DXR) ve sisplatinin (cDDP) indüklediği kromozomal ve biyokimyasal değişimlere karşı resveratrolün (RES) koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bir antioksidan olan resveratrolün, sisplatin veya doksorubisin ile indüklenen klastojenisite üzerine koruyucu etkisinin tespit edilmesi ve kemoterapötik ilaçlarla birlikte adjuvant bir terapinin gerekliliğinin tartışılması açısından, bu çalışma önem arz etmektedir. Bizim çalışmamız, resveratrolün uygulanması ve yöntem açısından daha önce yapılan çalışmalardan farklıdır. Tek doz DXR ve cDDP uygulaması sonrasında kromozomal hasar ve oksidatif stres 24 saat sonra en yüksek seviyede görülmektedir. Resveratrolün yarı ömrü 24 saatten çok daha kısa olduğundan, DXR ve cDDP'nin klastojenik ve oksidatif stresine karşı korumada tek doz resveratrol uygulaması onun antioksidan etkisinin zayıflamasına neden olmaktadır. Bu çalışmada bu olumsuzluğa karşı tekrarlayan resveratrol dozlarıyla koruma etkisinin güçlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada, resveratrolün 25 mg'lık dozunun, 12,5 mg'lık doza göre hücreleri DXR'nin oluşturduğu kromozom hasarlarına karşı daha iyi koruduğu görüldü. cDDP'nin oluşturduğu kromozom hasarlarını ise, resveratrolün 12,5 ve 25 mg'lık dozlarının konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Diğer taraftan; bu çalışmanın biyokimyasal verileri, bu alanda daha önce elde edilmiş bulguları doğrular mahiyettedir. Resveratrolün, kalp, karaciğer ve böbrek dokularında, DXR ve cDDP'nin indüklediği artmış MDA, CD, ve NO düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ve azalmış GSH düzeyleri ile SOD aktivitelerini ise önemli ölçüde arttırdığı bu çalışmamızda da görüldü.

Bu çalışmamızda, resveratrolün DXR ve cDDP'nin neden olduğu kromozom hasarlarının azaltılmasında önemli derecede etkileri tespit edilmekle birlikte; antineoplastik ajanlarla birlikte resveratrol tedavisinin uygulanıp uygulanmayacağı konusu daha geniş çaplı araştırmalar ile ortaya konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Aleem, S., Elmerzabani, MM., Sayed-Ahmed MM., Tylor, DA., Lowe JE. (1997). Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J.Mol. Cell Cardiol.* 29: 789-797.
- Adler, ID., El-Tarras, A. (1989). Clastogenic effects of *cis*-diamminedichloroplatinum: I. Induction of chromosomal aberrations in somatic and germinal cells of mice. *Mutat. Res.* 211: 131-137.
- Aftab, N., Likhitwitayawuid, K., Vieira, A. (2010). Comparative antioksidant activities and synergism of resveratrol and oxyresveratrol. *Natural Product Res.* 24 (18): 1726-1733
- Aggarwal, BB., Bhardwaj, A., Aggarwal, RS., Seram, NP., Shishodia, S., Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Res.* 24: 2783-2840
- Ahmad, N., Adhami, VM., Afaq, F., Feyes, DK., Mukhtar, H. (2001). Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin. Cancer Res.* 7: 1466-73.
- Ajith, TA., Usha, S., Nivitha, V. (2007). Ascorbic acid and a-tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice. *Clin. Chim. Acta.* 375: 82-86.
- Alturfan, AA., Beceren, AT., Şehirli, AÖ., Demiralp, E. Şener, G., Omurtag, GZ. (2012). Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol. Biol. Rep.* 39(4): 4589-4596.
- Almeida, LM., Pineiro, CC., Leite, MC., Brolese, G., Leal, RB., Gottfried, C., Goncalves, CA. (2008). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem. Res.* 33: 8-15
- Almeida, L., Silva, MV., Falcao, A., Soares, E., Costa, R., Loureiro, AI., Lopes, CF., Rocha, JF., Nunes, T., Wright, L., Silva, PS. (2009). Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 7-15.
- Alkhalaf, M. (2007). Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacology*, 80: 134-143
- Aly, MS., Othman, OE. and El Nahas, SM. (1999). Specific numerical chromosomal aberrations induced by adriamycin. *Environ. Mol. Mutagen.* 33: 161-6.
- Amaral, CLD., Francescato, HDC., Coimbra, TM., Costa, RS., Darin, JDC., Antunes, LMG., Bianchi, MLP. (2008). Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.* 82: 363-370
- Ames, BN. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Rad. Res. Commun.* 7: 121-128.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, EK., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E., Kremastinos, DT. (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42: 549-558.
- Antunes, LMG., Takahashi, CS. (1998) Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat. Res.* 419: 137-143

- Antunes, LMG., Pascoal, LM., Bianchi, MLP., Dias, FL. (2005). Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 585: 113-119.
- Antunes, LMG., Arauj, MCP., Darin, JDC., Bianchi, MLP. (2000). Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat. Res.* 465: 131-137.
- Appeldoorn, MM., Venema, DP., Peters, THF., Koenen, ME., Arts, ICW., Vincken, JP., Gruppen, H., Keijer, J., Hollman, PCH. (2009). Some Phenolic Compounds Increase The Nitric Oxide Level In Endothelial Cells In Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7693–7699.
- Athar, M., Back, JH., Tang, X., Kim, KH., Kopelovich, L., Bickers, DR., Kim, AL. (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 224 (3): 274-283.
- Attia, SM. (2012). Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Res.* 741: 22-31
- Au, WW. and Hsu, TC. (1980). The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat. Res.* 79: 351-61.
- Aziz, MH., Reagan-Shaw, S., Wu, J., Longley, BJ., Ahmad, N. (2005). Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J.* 19: 1193–5. 986
- Aziz, MH., Kumar, R., Ahmad, N. (2003). Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms. *Int. J. Oncol.* 23: 17–28.
- Badary, OA., Abdel-Maksoud, S., Ahmed, WA. (2005). Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 76: 2125-2135
- Baliga, R., Zhang, Z., Baliga, M., Ueda, N., Shah, S. (1998). In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 53: 394–401.
- Baur, JA. and Sinclair, DA. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: in vivo evidence. *Nat. Res. Drug Discov.* 5: 493-506
- Banerjee, S., Bueso-Ramos, C., Aggarwal, BB. (2002). Suppression of 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res.* 62 (17): 4945–4954.
- BC Cancer Agency Cancer Drug Manual. BCCA. (2006). Doxorubicin. *Vancouver: BC Cancer Agency.* http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/75DDE6E8-46D9-4244AD6D693B9DAD9F43/56256/Doxorubicin_monograph_1March2012.pdf (Ulaşım 25.05.2012)
- Benitez, DA., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, PM. and Castellon, EA. (2007). Mechanisms involved in resveratrol induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J. Androl.* 28: 282–293.
- Beuge, JA., Aust, SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302- 310
- Bhat, KP. and Pezzuto, JM. (2001). Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res.* 61(16): 6137-6144.
- Bigioni, M., Salvatore, C., Bullo, A., Bellarosa, D., Iafrate, E., Animati, F., Capranico, G., Goso, C., Maggi, CA., Pratesi, G., Zunino, F. and Manzini, SA. (2001). Comparative study of cellular and molecular

pharmacology of doxorubicin and MEN 10755, a disaccharide analogue. *Biochem Pharmacol.* 62: 63-73.

Blasko, M., Kvietikova, I., Pleskova, I., Chalupa, I., Kuliffay, P., Siracky, J. (1987). Cytogenetic changes of human peripheral blood lymphocytes in vitro after exposure to cis-DDP (cis-diamminedichloroplatinum II) and oxo-Pt (cis-diamminedichloro-trans-dihydroxyplatinum IV). *Neoplasma*, 34: 235-238

Bodo, J., Chovancova, J., Hunakova, L., Sedlak, J. (2005). Enhanced sensitivity of human ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780/CP to the combination of cisplatin and synthetic isothiocyanate ethyl 4-isothiocyanatobutanoate. *Neoplasma*, 52: 510-516.

Boocock, DJ., Faust, GE., Patel, KR., Schinas, AM., Brown, VA., Ducharme, MP., Booth, TD., Crowell, JA., Perloff, M., Gescher, AJ., Steward, WP., Brenner, DE. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 1246-1252.

Brabc, V., Kleinwachter, V., Butour, JL., Johnson, NP. (1990). Biophysical studies of the modifications of DNA by antitumor platinum coordination complexes. *Biophys. Chem.* 35: 129-141

Brabec, V., Kasparova, T. (2005). Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat.* 8: 131-146.

Brito, PM., Mariano, A., Almeida, LM., Dinis, TC. (2006). Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: a role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 164: 157-166

Brown, GC., Borutaite, V. (2001). Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*, 52: 189-195.

Burcham, PC. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*. 13: 287-305.

Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, ME., Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3337-3340

Cadenas, S., Barja, G. (1999). Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1531-1537.

Calamini, B., Ratia, K., Malkowski, M.G., Cuende, M., Pezzuto, JM., Santarsiero, BD., Mesecar, AD. (2010). Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem. J.* 429: 273-282

Carbo, N., Costelli, P., Baccino, FM., Lopez-Soriano, FJ., Argiles, JM. (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun.* 254: 739-43.

Carsten, R.E., Bachand, A.M., Bailey, S.M., Ullrich, R.L. (2008). Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 169: 633-638

Caruso, F., Tanski, J., Villegas-Estrada, A., Rossi, M. (2004). Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7279-7285

Cecchinato, V., Chiamonte, R., Nizzardo, M., Cristofaro, B., Basile, A., Sherbet, GV. (2007). Resveratrol induced apoptosis in human T cell acute lymphoblastic leukemia MOLT-4 cells. *Biochem Pharmacol.* 74: 1568-1574.

Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., De Castro, J., Espinosa, E., Redondo, A., Sereno, M., Garcia Cabezas, MA., Vara, JA., Dominguez-Caceres, A., Perona, R., Gonzalez-Baron, M. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. *Cancer Causes and Control*; 15 (7): 707-719.

- Chamber, BA., Ryan, DP., Paz-Anes, L., Garcia-Carbonero, R., Calabresi, P. (2001). Antineoplastic agents. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10. ed.: JG. Harman, LE. Limbird, AG. Gilman. The McGraw-Hill Companies. New York, 1425-1431.
- Chander, V., Tirkey, N., Chopra, K. (2005). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. *Toxicology*, 210: 55–64
- Cheeseman, KH., Slater, TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49(3): 481-493
- Chen, X., Xun, K., Chen, L., Wang, Y. (2009). TNF- α , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem. Funct.* 27: 407-416.
- Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, DA., Clair, DK. (2007). Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol. Interv.* 7: 147-156
- Chong, PLG, Fortes, PAG., Jameson, DM. (1985). Mechanisms of inhibition of (Na⁺/K⁺)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol Chem.* 260: 14480–90
- Cortas, NK., Wakid, NW. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin. Chem.* 36: 1440-1043.
- Crowell, JA., Korytko, PJ., Morrissey, RL., Booth, TD., Levine, BS. (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol. Sci.* 82: 614–619.
- Csaki, C., Mobasheri, A., Shakibaei, M. (2009). Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res. Ther.* 11: R165
- Csaki, C., Keshishzadeh, N., Fischer, K., Shakibaei, M. (2008). Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 75: 677–687.
- Czepulkowski, B. (2001). Types of abnormalities observed in chromosomes. In. *Analyses Chromosomes*, ed. Czepulkowski, B. 69-90. Oxford: BIOS Scientific; New York: Springer-Verlag. ISBN:1859961886 (pbk.)0387916091
- Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997). Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 3(4): 92-95
- De Graff, WG., Myers, LS., Jr Mitchell, JB. and Hahn, SM. (2003). Protection against Adriamycin cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase II activity by 3,4-dihydroxybenzoic acid. *Int J Oncol.* 23: 159-63.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N. and Solary, E. (2003). Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J. Biol Chem.* 278: 41482–90.
- Delmas, D., Passilly-Degrace, P., Jannin, B., Cherkaoui Malki, M. and Latruffe, N. (2002). Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells. *Int J. Mol. Med.* 10: 193–9.
- Dhawan, A., Kayani, MA., Parry, JM., Parry, E. and Anderson, D. (2003). Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 18: 487-90.
- Ding, XZ., Adrian, TE. (2002). Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic

cancer cells. *Pancreas*. 25: 71–76.

Draczyska, LB., Chen, YM., Sun, AY. (1998). Oxidized lipoproteins activate NF- κ B binding activity and apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport*. 16: 527-532.

Durak, I., Kaçmaz, M., Çimen, MY., Büyükkoçak, U., Öztürk, HS. (2001). Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. *Int. J. Cardiol*. 77(23): 293-297.

Eastman, A. (1987). Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem. Biol. Interact*. 61: 241-248

Edelweiss, MI., Trachtenberg, A., Pinheiro, EX., da-Silva, J., Riegel, M., Lizardo-Daudt, HM., Mattevi, MS. (1995). Clastogenic effect of cisplatin on Wistar rat bone marrow cells. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 28: 679–683.

Edwards, JA., Beck, M., Riegger, C., Bausch, J. (2011). Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida. *Ann. N.Y.Acad. Sci*. 1215: 131-137

El-Habit, OHM., Sayed-Ahmet, MM., Gabry, M.S., Khalil, MFK., and Osman, AMM. (2000). Modulation of induced cardiocytotoxicity and genotoxicity of doxorubicin in rat by L-carnitine. *J. Egyptian Nat. Cancer Inst*. 12(4): 267-274

Ellman, GL. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archs. Biochem. Biophys*. 82: 70-77

Esterbauer, H., Schaur, RJ., Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal, malonaldehyde. *Free Rad. Biol. Med*. 11: 81-128

Estrela, JM., Ortega, A., Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 43: 143–181.

Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H. M., Talpaz, M. and Aggarwal, B. B. (2003). Resveratrol blocks interleukin-1 β induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 102: 987–95.

Evangelista, CMW., Antunes, LMG., Francescato, HDC., Bianchi, MLP. (2004). Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. 42: 1291–1297

Fang, Y., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872–879.

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

Ferrieres, J. (2004). The French Paradox: Lessons for other countries. *Heart*, 90: 107-111

Ferry-Dumazet, H., Garnier, O., Mamani-Matsuda, M., Vercauteren, J., Belloc, F., Billiard, C., Dupouy, M., Thiolat, D., Kolb, J.B. and Mossalayi, M.D. (2002). Resveratrol inhibits the growth and induces apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. *Carcinogenesis*, 23: 1327-1333.

Filomeni, G., Rosilio, G., Ciriolo, MR. (2002). Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol*. 64: 1057–1064.

Firdous, AP. and Kuttan, R. (2012). Amelioration of cisplatin-induced toxicity in mice by carotenoid meso-zeaxanthin. *Human & experimental toxicology*.

<http://het.sagepub.com/content/early/2012/01/09/0960327111431707>

- Floyd, RA. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11: 1447–1450.
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C., Guittet, O. (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* 421: 277-279
- Ford, CE., Hamerton, JL. (1956). A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 3: 247–51.
- Fortune JM and Osheroff N. (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol.* 64: 221-253.
- Frankel, E.N., Waterhouse, AL., Kinsella, JE. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 341: 1103–1104.
- Frombaum, M., Clanche, SL., Bonnefont-Rousselot, D., Borderie, D., (2012). Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie.* 94: 269-276
- Fuertes, MA., Castilla, J., Alonso, C., Perez, JM. (2002). Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2: 539–551.
- Fuggetta, M.P., Lanzilli, G., Tricarico, M., Cottarelli, A., Falchetti, R., Ravagnan, G., Bonmassar, E. (2006). Effect of resveratrol on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells in vitro. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 25: 189–193.
- Fukui, M., Choi, H.J., Zhu, BT. (2010). Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radical Biology & Medicine*, 49: 800–813
- Gao, X., Xu, Y X., Janakiraman, N., Chapman, RA. and Gautam, SC. (2001). Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1299–308.
- Gedik, E., Girgin, S., Öztürk, H., Obay, B.D., Öztürk, H., Büyükkbayram, H. (2008). Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/ reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.* 14: 7101–7106.
- Gentile, JM., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, GJ., Ferguson, LR. (1998). Effects of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents. *Mutation Res.* 402: 289-298
- Giles, GI. and Sharma, RP. (2005). Topoisomerase enzymes as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Med. Chem.* 1(4): 383-94.
- Giles, GI. (2006). The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. *Curr. Pharm. Des.* 12: 4427–4443.
- Gilleron, M., Marechal, X., Montaigne, D., Franczak, J., Neviere, R., Lancel, S., 2009. NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 727–731.
- Goodmagtigh, E., Huart, P., Praet, M., Bresseur, R. (1990). Structure of the Adriamycin-Cardiolipin Complex. Role in Mitochondrial Toxicity. *Biophys. Chem.* 35: 247-257.
- Goswami, SK., Das, DK. (2009). Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters.* 284: 1–6
- Granados-Principal, S., Quiles, JL., Ramirez-Tortosa, CL., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, MC. (2010). New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1425- 1438

- Green, PS. and Leeuwenburgh, C. (2002). Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1588 (1): 94-101.
- Grozdanovic, Z., Briining, G., Baumgarten, H. (1994). Nitric Oxide: A novel autonomic neurotransmitter. *Acta. Anat.* 150: 16-24.
- Gupta, PK. ed. (2007). *Cytogenetics*, 61-109. Rajsons Printers, New Delhi, India. ISBN: 81-7133-737-6.
- Güleç, M., Yılmaz, H.R., Iraz, M., Ağlamış, S., Söğüt, S. (2004). The Effects Of Gıngko Biloba Extract On Plasma Glutathion Peroxidase, Superoxide Dismutase, Adenosine Deaminase And Nitric Oxide Levels In Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* 24: 585-591
- Gülkaç, MD., Akpınar, G., Üstün, H. and Ozon, Kanlı A. (2004). Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. *Mutagenesis*. 19: 231-6.
- Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schroder, G., Stocker, R. (1990) Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* 15: 325-335.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed.; Oxford University Press: New York, USA. 10-121.
- Hassan, HM., and Fridovich, I. (1978). Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in E.coli. *J. Biol. Chem.* 253: 8143-8148
- Helbig, R. and Speit, G. (1995). The pattern of adriamycin-induced mutations in V-E5 Chinese hamster cells with chromosomal instability. *Mutat Res.* 348: 1-6.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501
- Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Ushida, K., Nikaido, O., Osawa, T. (1997). 8 Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol.* 89: 10405-9.
- Hebbar, V., Shen, G., Hu, R., Kim, BR., Chen, C., Korytko, PJ., Crowell, JA., Levine, BS., Kong, AN. (2005) Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sciences.* 76: 2299-2314.
- Holmes-McNary, M., Baldwin Jr., AS. (2000). Chemopreventive properties of *trans*-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IκB kinase. *Cancer Res.* 60: 3477-3483
- Horn, TL., Cwik, MJ., Morrissey, RL., Kapetanovic, I., Crowell, JA., Booth, TD., McCormick, DL. (2007). Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53+ (p53 knockout) mice. *Food Chem. Toxicol.* 45: 55-63.
- Hoshino, J., Park, EJ., Kondratyuk TP., Marler, L., Pezzuto, JM., van Bremen, RB., Mo, S., Li, Y., Cushman, M. (2010). Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J. Med. Chem.* 53: 5033-5043
- Hortobagyi, GN. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 54 (4): 1-7.
- Holian, O., Wahid, S., Atten, MJ., Attar, BM. (2002). Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 282: G809-G816.
- Hrelia, S., Fiorentini, D., Maraldi, T., Angeloni, C., Bordoni, A., Biagi, PL., Hakim, P. (2002). Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1567: 150-156
- Horenstein, MS., Heide RSV. and L'Ecuyer, TJ. (2000). Molecular basis of anthracycline-induced

cardiotoxicity and its prevention. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71: 436-444.

Hsieh, TC., Wang, Z., Hamby, CV., Wu, JM. (2005). Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 223–230.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/doksorubisin>, 2012

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Sisplatin>, 2012

Ishikawa, T. and Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diaminedichloroplatinum (II) and ATP-dependent efflux from leukemia cells: molecular characterization of glutathione platinum complex and its biological significance. *J. Biol. Chem.* 268: 20116-20125

Jang, JH., Surh, YJ. (2001) Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutation Res.* 496: 181-190

Jeong, WS., Kim, IW., Hu, R., Kong, AN. (2004). Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. *Pharm Res.* 21: 649–60.

Jessup, W. (1996). Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr. Opin. Lipidol.* 7 (5): 274-280.

Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AL, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA. (2005). Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol. Cancer Ther*; 4: 554–561

Jo, H., Zhang, R., Zhang, H., McKinsey, TA., Shao, J., Beauchamp, RD., Ballard, DW. and Liang, P. (2000). NF-kappa B is required for H-ras oncogene induced abnormal cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene.* 19: 841–9.

Jones, JC., Zhen, W., Reed, E., Parker, RJ., Sancar, A., Bohr, VA. (1991). Gene-specific formation and repair of cisplatin intrastrand adducts and interstrand cross-links in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 266: 7101-7107

Johnson, F., Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.* 26: 340-52.

Jung, K. and Reszka, R. (2001). Mitochondria as subcellular targets of clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49: 87-105.

Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P-M., Castanas, E. (2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr. Cancer.* 37: 223–233.

Kapetanovic, I.M., Muzzio, M., Huang, Z., Thompson, T., McCormick, D. (2011) Pharmacokinetics oral bioavailability and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterestilbene in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68: 593-601

Kartalou, M. and Essigmann, JM. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Res.* 478: 1-21

Kayaalp, OS. (2000). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel tedavi yönünden tbbi Farmakoloji* içinde. 10. Baskı. Hacettepe Taş Yayınları, 2002. ISBN: 978-975-9534-16-5

Keizer, HG., Pinedo, HM., Schuurhuis, GJ. and Joenje, H. (1990). Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmac. Ther.* 47: 219-231.

Kim, YA., Lee, WH., Choi, TH., Rhee, SH., Park, KY., Choi, YH. (2003). Involvement of

p21/WAF1/WAF1/CIP1, pRB, Bax and NFκB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol.* 23: 1143–9.

Kim, AL., Zhu, Y., Zhu, H., Han, L., Kopelovich, L., Bickers, DR., Athar, M. (2006). Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp. Dermatol.* 15: 538–546.

Kim, YA., Choi, BT., Lee, YT., Park, DI., Rhee, SH., Park, KY. and Choi, YH. (2004). Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol. Rep.* 11: 441–6.

Kim, YA., Rhee, SH., Park, KY. and Choi, YH. (2003). Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J. Med. Food.* 6: 273–80.

Kızıltepe, U., Turan, N.N., Han, U., Ulus, A.T., Akar, F. (2004). Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J. Vasc. Surg.* 40(1): 138–45.

Kliesh, U., Adler, ID. (1987). Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2-nitropropane and cis-platin. *Mutat. Res.* 192: 181–184.

Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Yang, SR., Megson, IL., Rahman, I. (2008). Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 294: L478–L488

Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, AS. (2006). Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther.* 5: 621–9.

Kumar, A., Kaundal, RK., Iyer, S., Sharma, SS. (2007). Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 80: 1236–1244.

Kumar, S. (2011). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research.* 2 (1): 129-135

Kuo, PL., Chiang, LC., Lin, CC. (2002). Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci.* 72: 23–34.

Kwon, NS., Stuehr, DS., Nathan, CF. (1991). Inhibition of tumor cells ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 442-448

Lancaster, JR., Hibbs, Jb.JR. (1990). EPR demonstration iron nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1223-1227

Langcake, P., Pryce, R.J. (1977). A new class of phytoalexins from grapes. *Experientia.* 33, 151-152.

Langcake, P., Pryce, R.J. (1976). The production of Resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86

Larramendy, ML., Dulout, FN., Bianchi, NO. and Olivero, OA. (1980). In vivo dose-response relationship in bone-marrow cells of mice treated with adriamycin. *Mutat Res.* 79: 133-40.

Leonard, SS., Xia, C., Jiang, BH., Stinefelt, B., Klandorf, H., Haris, GK., Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 309: 1017– 1026

Leonard, SS., Harris, GK., Shi, XL. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Rad. Biol. Med.* 37: 1921–1942.

Li, X., Lewis, MT., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, CK., Wu, MF., Hilsenbeck, SG., Pavlick,

A., Zhang, X., Chamness, GC., Wong, H., Rosen, J., Chang, JC., 2008. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 100: 672–679.

Li, Y., Cao, Z., Zhu, H. (2006). Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol. Res.* 53: 6-15

Li, Y., Liu, J., Liu, X., Xing, K., Wang, Y., Li, F. (2006). Resveratrol– induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9. *Appl Biochem Biotechnol.* 135: 181–92.

Liang, YC., Tsai, SH., Chen, L., Lin-Shiau, SY., Lin, JK. (2003). Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*; 65: 1053–1060

Lin, J., Tsai, S. (1999). Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China B* 23: 99–106.

Lin, MT., Yen, ML., Lin, CY., Kuo, ML. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol*; 64: 1029–1036

Liu, Y., Chan, F., Sun, H., Yan, J., Fan, D., Zhao, D. An, J., Zhou, D. (2011). Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *European Journal of Pharmacology* 650: 130–137

Liu, ZG., Hsu, H., Goeddel, DV., Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87: 565–76.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews.* 4(8): 118-126

Lowenstein, C., Dinerman, J., Snyder, S. (1994). Nitric Oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 120: 227- 237.

Lown, JW. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent development. *Pharmac. Ther.* 60: 185-214.

Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

Luna, C., Li, G., Liton, P., Qiu, J., Epstein, D., Challa, P., Gonzales, P. (2009). Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular cells. *Food and Chemical Toxicology* 47: 198-204

Lynch, A., Harvey, J., Aylott, M., Nicholas, E., Burman, M., Siddiqui, A., Walker, S. and Rees, R. (2003). Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis*; 18(4): 345-353

Mahyar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P., Roemer, K. (2001). Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and preceded by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int. J. Cancer.* 94: 615–622.

Manna, SK., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, BB. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.* 164 (12): 6509–6519.

Mansour, MA., Mostafa, AM., Nagi, MN., Khattab, MM., Al-Shabanah, OA. (2002). Protective effect of

- aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 2: 123–128.
- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen* 424: 83-95
- Martin, AR., Villegas, I., Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, CA. (2006). The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br. J. Pharmacol.* 147: 873–885
- Martinez, J. and Moreno, J.J. (2000). Effect Of Resveratrol, A Natural Polyphenolic Compound, On Reactive Oxygen Species And Prostaglandin Production. *Biochemical Pharmacology*, 59: 865–870
- Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U. (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 1175–1180.
- Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. (1998). The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med.* 131: 518–26.
- Matsuoka, A., Furuta, A., Masayasu, O., Fukuhara, K., Miyata, N. (2001). Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res.* 494 (1-2): 107-113.
- Mendonça, LM., Dos Santos, GC., Antonucci, GA., Dos Santos, A.C., Bianchi Mde, L., Antunes, LM. (2009). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. *Mutat Res.* 675: 29-34.
- Meyer, M., Schreck, R., Baeuerle, PA. (1993). H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-κB and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12: 2005–2015
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251: 3–7
- Mikulski, D., Gorniak, R., Molski, M. (2010). A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. *Eur. J. Med. Chem.* 45: 1015-1027
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56: 185-229.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., Yamori, Y. (2001). Protective effective of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 28: 55–9
- Mohanakumar, KP., Thomas, B., Sharma, SM., Muralikrishnan, D., Chowdhury, R., Chiueh, CC. (2002). Nitric oxide: An antioxidant and neuroprotector. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 962: 389-401
- Müller, I., Jenner, A., Bruchelt, G., Niethammer D. and Halliwell, B. (1997). Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin-apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 230: 254-257.
- Naganuma, A., Satoh, M., and Imura, N. (1988). Specific reduction of toxic side effects of Adriamycin by induction of metallothionein in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 406–411.
- Narayanan, BA., Narayanan, NK., Re, GG. and Nixon, DW. (2003). Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53- mediated molecular targets. *Int J Cancer.* 104: 204–12.
- Ndiaye, M., Kumar, R., Ahmad, N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here?(2011). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1215: 144-149

NIEHS (2002) National Institute of Environmental Health Sciences. trans-Resveratrol: CAS No.501-36-0. Review of Toxicological Literature under Contract No. NOI-ES- 65402, Integrated Laboratory Systems, P.O. Box 13501, Research Triangle Park, North Carolina. pp. 1-64. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ChemBackground/ExSumPdf/Resveratrol.pdf> (Ulaşım 26 Nisan 2012)

Nefic, H., (2001). Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocytes cultures. *Mutation Res.* 498: 89–98.

Newsome YL and Littlefield LG J. (1975). Adriamycin-induced chromosome aberrations in human fibroblasts. *J Natl Cancer Inst.* 55: 1061-1064.

Noviello E, Aluigi MG, Cimoli G, Rovini E, Mazzoni A, Parodi S, De Sessa F and Russo P. (1994). Sister-chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by topoisomerase II-targeted drugs in sensitive (A2780) and resistant (A2780-DX3) human ovarian cancer cells: correlations with the formation of DNA double-strand breaks. *Mutat Res.* 311: 21-29.

Nunes, T., Almeida, L., Rocha, JF., Falcao, A., Fernandes-Lopes, C., Loureiro, AI., Wright, L., Silva, MV., Silva, PS. (2009). Pharmacokinetics of trans-resveratrol following repeated administration in healthy elderly and young subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 49 (12): 1477–1482.

Nyska, A., Kohen, R. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantifications. *Toxicol Pathol.* 30: 620-650

Quiles, JL., Huertas, JR., Battino, M., Mataix, J. and Ramírez-Tortosa, MC. (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180: 79-95.

Quiles, JL., Ochoa, JJ., Huertas, JR., Lopez-Frias, M., Mataix, J. (2006). Olive oil and mitochondrial oxidative stress: studies on adriamycin toxicity, physical exercise and ageing. In: Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, M.C., Yaqoob, P. (Eds.). *Olive Oil and Health*. CABI Publishing, Oxford, 119–151.

Queiroz, AN., Gomes, BA. Q., Moraes, JWM., Borges, RS. (2009). A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 1644-1649.

Ohe, T., Tsuda, S., Sakata, Y., Taniwaki, M., Misawa, S., Abe, T., (1990). cis-Diamminedichloroplatinum (II)-induced sister-chromatid exchanges and chromosome aberration formation in cultured human lymphocytes and their inhibition by sodium thiosulfate. *Mutation Res.* 244: 279–285.

Öktem, G., Uysal, A., Oral, O., Sezer, ED., Olukman, M., Erol, A., Akgur, SA., Bilir, A. (2010). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 64: 471-479

Öktem, G., (2002). MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında Doksorubisin ve dositakselin sitotoksitesini ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu üzerine etkileri. Ege Üniversitesi. Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı. Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi.

Olas, B., Wachowicz, B. (2004). Resveratrol reduces oxidative stress induced by platinum compounds in blood platelets. *Gen. Physiol Biophys.* 23: 315-326.

Olas, B., Wachowicz, B. (1998). Inhibitory effects of cisplatin and its conjugate with glutathione on blood platelet activation. *Platelets.* 9: 69–72.

Olas, B., Wachowicz, B. (1998). Modulation of cisplatin toxicity in blood platelets by glutathione depletion. *Anticancer Drugs.* 9: 473–478.

Olas, B., Zbikowska, H.M. (1999). Changes of glutathione S-transferase (GST) activity in blood platelets induced by cisplatin. *Biomed Lett.* 59: 93–99.

Olas, B., Wachowicz, B., Majsterek, I., Blasiak, J. (2005). Resveratrol may reduce oxidative stress

induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anti-Cancer Drugs*.16(6): 659-665

Olinski, R., Gackowski, D., Forsinski, M. (2002). Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Rad. Biol. and Med.* 33: 192-200

Olukman, M., Can, C., Erol, A., Öktem, G., Oral, O., Çınar, M.G. (2009). Reversal of doxorubicin-induced vascular dysfunction by resveratrol in rat thoracic aorta: Is there a possible role of nitric oxide synthase inhibition. *Anadolu Kardiyol. Derg.* 9: 260-6

Osanto, S., Thijssen, JCP., Woldering, WM., van Rijn, JLS., Natarajan, AT., Bates, AD. (1991). Increased frequency of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes up to nine years following curative chemotherapy of patients with testicular carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 71-78.

Pace-Asciak, C., Hahn, S., Diamandis, Soleas, G., Goldberg, D. (1995). The Red Wine Phenolics Trans Resveratrol And Quercetin Block Human Platelet Aggregation And Eicosanoid Synthesis: Implications For Protection Against Coronary Heart Disease. *Clin. Chim. Acta.* 235: 207-219

Pazdur, R. Coia, L., Hoskins, WJ., Wagman, L.D. eds. (2007) *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. Medical, Surgical & Radiation Oncology.* 10th Edition. Publisher: F.A. Davis Company.

Preston, RJ., Dean, BJ., Galloway, S., Holden, H., McFee, AF., Shelby, MD. (1987). Mammalian in vivo cytogenetic assays: analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutat. Res.* 189: 157-165

Rabik, CA., Dolan, ME. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* 33: 9-23

Rahman, I. and MacNee, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16: 534-554.

Renaug, S., deLorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339 (8808): 1523-1526

Rosenberg, B. (1985). Fundamental studies with cisplatin, *Cancer* 55: 2303-2315

Rosselli, F., Zaccaro, L., Venturi, M. and Rossi, AM. (1990). Persistence of drug-induced chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of the rat. *Mutat. Res.* 232: 107-114.

Rubilio, JA., Mithieux, G., Vega, FV (2008). Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology* 591: 66-72

Rubilio, JA., Vega, VF.(2008). Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomed. Pharmacother.* 62 (9): 606-612.

Saad, AA., Youssef, MI., El-Shennawy, LK. (2009). Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: The protective effect of grape seed proanthocyanidin extract. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1499-1506

Sabourin, M. and Osheroff, N. (2000). Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. *Nucleic Acids Res.* 28: 1947- 54.

Sandermann, H. (1978). Regulation of membrane enzyme by lipids. *Biochim Biophys Acta.* 515: 209-37.

Saran, M., Michel, C., Bors, W. (1990). Reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res.* 10: 221-226.

- Savage, J.R.K. (1975). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* 13: 103–122.
- Sebai, H., Sani, M., Aouani, E., Ghanem-Boughanmi, N. (2011). Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug and Chemical Toxicology.* 34(2): 146–150
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. (2010). Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research.* 3(1): 91-100
- Sengottuvelan, M., Deeptha, K., Nalini, N. (2009). Resveratrol ameliorates DNA damage, prooxidant and antioxidant imbalance in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 181: 193–201.
- Schmidley, J.W. (1990). Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke,* 21: 1086–90.
- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M., Stoper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol *Toxicology Letters,* 136: 133-142
- Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P., Baeuerle, P.A. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcriptional factor NF- κ B. *Chem. Biol.,* 2: 13–22.
- Shemida, Y., Hirotsu, Y., Akimoto, Y.S., Ahindou, K., Ijiri, Y., Nishihori, T., Tanaka, K., (2005). Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull.,* 28: 1635–1638.
- Shih, A., Zhang, S., Cao, H.J., Boswell, S., Wu, Y.H., Tang, H.Y. (2004). Inhibitory effect of epidermal growth factor on resveratrol-induced apoptosis in prostate cancer cells is mediated by protein kinase C- α . *Mol. Cancer Ther.* 3: 1355–64.
- Shino, Y., Itoh, Y., Kubota, T. (2003). Role of poly(ADP-ribose)-polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic. Biol. Med,* 35: 966-977
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9697–9701.
- Silva, C.L.R., Antunes, L.N.M.G., Bianchi, M.D.L.P. (2001). Antioxidant Action Of Bixin Against Cisplatin-Induced Chromosome Aberrations And Lipid Peroxidation In Rats. *Pharmacological Research.* 43(6): 561-566
- Simao, F., Matte, A., Matte, C., Soares, F.M.S., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., Salbego, C.G. (2011). Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na⁺K⁺-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry,* 22: 921–928
- Simunek, T., Stirba, M., Popelova, O., Adamcova, M., Hrdina, R., Gers, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports,* 61: 154-171
- Sinha, K., Chaudhary, G., Gupta, Y.K. (2002). Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 71: 655–65.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I., Cittadini, A. (2001). Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research,* 496: 171–180
- Srivastava, R.C., Farookh, A., Ahmad, N., Misra, M., Hasan, S.K., Husain, M.M. (1996). Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. *Biometals,* 9(2): 139-42.

- Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, UM., Albini, A., Prosperi, E. and Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J. Biol. Chem.* 276: 22586–94.
- Sun, Y., Oberley, LW., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.*, 34: 497-500.
- Szabova, E. (1996). Comparison of the in vitro effect of adriablastina on induction of SCEs in V79 cells and human peripheral blood lymphocytes. *Neoplasma*, 43: 407-409.
- Szekeres, T., Saiko, F., Fritzer-Szekeres, M., Djavan, B., Jager, W. (2011). Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215: 89-95
- Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F., Cabrini, L. (2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res.*, 33: 104–14
- Tatlıdere, E., Şehirli, Ö., Ögünç, A.V., Çetinel, Ş., Yeğen, B.Ç., Yarat, A., Süleymanoğlu, S., Şener, G. (2009). Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Free Radical Research*, 43(3): 195-205
- Takeuchi, P.L., Antunes, L.M.G., Takahashi, C.S. (2008). Modulation of doxorubicin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells by vitamin B6. *Arch. Toxicol.* 82: 869–873
- Tang, J-J., Fan, G-J., Dai, F., Ding, D-J., Wang, Q., Lu, D-L., Li, R-R., Li, X-Z., Hu, L-M., Jin, X-L., Zhou, B. (2011). Finding more active antioxidants and cancer chemoprevention agents by elongating the conjugated links of resveratrol. *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (10): 1447-1457
- Tavares, DC., Cecchi, AO., Antunes, LM. and Takahashi, CS. (1998). Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. *Teratog Carcinog Mutagen*, 18: 153-61.
- Teissedre, PL., Frankel, EN., Waterhouse, AL., Peleg, H., German, JB. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric.* 70: 55–61
- Tohamy, AA., El-Ghor, AA., El-Nahas, SM. and Noshay, MM. (2003). Beta-glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutat. Res.* 541: 45-53.
- Townsend, DM., Tew, KD. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369–7375.
- Townsend, DM., Tew, KD., Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother* 57: 145–155.
- Tsai, SH., Lin-Shiau, SY., Lin, JK. (1999). Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF-κB in macrophages by resveratrol. *Br. J. Pharmacol.* 126: 673–680
- Turner, ND., Bradby, LA., Ford, J., Lupton, JR. (2002). Opportunities for nutritional amelioration of radiation induced cellular damage. *Nutr.* 18: 904 -912
- Upadhyay, G., Singh, KA., Kumar, A., Prakash, O., Singh, MP. (2008). Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*, 596: 146–152
- Walker JV and Nitiss JL. (2002). DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest.*

20(4): 570-89.

Wallace, KB. (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, 93: 105-115.

Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, MH., Oatis, Jr., JE., Walle, UK. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 32: 1377–1382.

Wang, J., He, D., Zhang, Q., Han, Y., Jin, S., Qi, F. (2009). Resveratrol protects against Cisplatin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. *Cancer Biother Radiopharm.* 24(6): 675-80

Wang, CY., Mayo, MW. and Baldwin, AS., Jr. (1996). TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, 274: 784–7.

Watanabe, KI., Hess A., Bloch W., Michel, O. (2000). Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs*, 11: 401-6.

Weijl, NI., Cleton, FJ., Osanto, S. (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity, *Cancer Treat. Rev.*, 23: 209–240.

Wyse, ATS., Streck, EL., Worm, P., Wajner, M., Ritter, F., Netto, CA. (2000). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.*, 25: 971–975.

Williams, LD., Burdock, GA., Edwards, JA., Beck, M., Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem. Toxicol.* 47 (9): 2170-2182

Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A., Stein, J. (2001). Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr.* 131: 2197–203.

Valko, M., Rhodes, CJ., Moncol, J. (2006). Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160: 1-40

Van Norren, K., van Helvoort, A., Argiles, JM., van Tuijl, S., Arts, K., Gorselink, M., Laviano, A., Kegler, D., Haagsman, HP., van der Beek, EM. (2009). Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue. *Brit. J. Cancer*, 100: 311-314

Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J., Merillon, JM. (2003). Disruption of ¹⁴C trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 72 (20): 2219-2233

Vogel, R., Laschinski, G., Speilman, H., Ehrlich, W., Drevenstedt, B., Klosa, J., Kröger, H. (1991). In vitro studies on genotoxicity and cytotoxicity of the anticancer drugs cisplatin and cofplaton, a caffeine-8-ether plus cisplatin compound. *Mutation Research.* 264: 225-230

Yamanishi, Y., Boyle, DL., Rosengren, S., Green, DR., Zvaifler, NJ., Firestein, GS. (2002). Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 10025–30.

Yen, GC., Chen, YC., Chang, WT., Hsu, CL. (2011). Effects Of Polyphenolic Compounds On Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Induced Changes Of Adipokines And Oxidative Stress In 3t3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 59: 546–551

Zelko, I., Mariani, T., Folz, R. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 337-49.

Zhang, C., Feng, Y., Qu, S., Wei, X., Zhu, H., Luo, Q., Liu, M., Chen, G., Xiao, X. (2011). Resveratrol attenuates doxorubicin induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of

p53. *Cardiovascular Research*, 90: 538–545

Zhang, S., Cao, HJ., Davis, FB., Tang, HY., Davis, PJ., Lin, HY. (2004). Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells. *Br. J. Cancer*, 91: 178–85.

Zhao, XY., Li, GY., Liu, Y., Chai, LM., Chen, JX., Zhang, Y., Du, ZM., Lu, YJ., Yang, BF. (2008). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 154: 105–113

Zini, R., Morin, C., Berteli, A., Berteli, AA., Tillement, J.P. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25: 87–97.

ÖZGEÇMİŞ

GÜNSEL BİNGÖL

Akçakoca Üniversite Evleri, Defne Apt. Daire 31 İzmit / KOCAELİ

E-mail: gbingol@gmail.com

Kişisel Bilgiler:

Uyruğu	TC
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara, 28 Temmuz 1972
Medeni Durumu	Evli

İş Deneyimi:

Araştırma Görevlisi, Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bursa, 01 Haziran 2001-01 Haziran 2003,

Öğretim Görevlisi, Kocaeli Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kocaeli, 06 Haziran 2003- Devam etmekte,

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans, 1997-1999 Fairleigh Dickinson Üniversitesi Genel Biyoloji Bölümü, New Jersey,

Lisans, 1990-1994 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,

Lise, 1985-1989 Ankara Çankaya Lisesi

Yabancı dili: İngilizce

Burslar:

Milli Eğitim Bakanlığı Yurtdışı Öğrenim Bursu (1996-2001)

Projeler:

Tez Projesi: KOU BAP, Proje No: 2010/103.