

**POLİSİKLIK AROMATİK HİDROKARBON BİLEŞİĞİ
BENZO(A)PİREN'İN NEDEN OLDUĞU PANKREAS
FONKSİYON BOZUKLUĞU ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN
KORUYUCU ETKİSİNİN INS1-E (832/13) BETA HÜCRE
HATTINDA İNCELENMESİ**

Biyokimyager Barış BAYSAL

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sefa ÇELİK**

**Tez No: 2015-029
2015-Afyonkarahisar**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİSİKLİK AROMATİK HİDROKARBON BİLEŞİĞİ
BENZO(A)PİREN'İN NEDEN OLDUĞU PANKREAS FONKSİYON
BOZUKLUĞU ÜZERİNE RESVERATROL'ÜN KORUYUCU
ETKİSİNİN INS1-E (832/13) BETA HÜCRE HATTINDA
İNCELENMESİ**

Biyokimyager Barış Baysal

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Tarafından 14.SAĞ.BİL.11 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2015-029

2015-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY**Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü****Tıbbi Biyokimya Programı****çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından****Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.****Tez Savuma Tarihi: 25/12/2015****Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN****Jüri Başkanı****Prof. Dr. Kamil SEYREK****Üye****Prof. Dr. Sefa ÇELİK****Üye**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Barış Baysal'ın "Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Bileşiği Benzo(a)piren'in Neden Olduğu Pankreas Fonksiyon Bozukluğu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin INS1-E (832/13) Beta Hücre Hattında İncelenmesi" başlıklı tezi 29.12.2015 Cuma günü saat 14:30'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ****Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

Çevresel kirleticilerin insan sağlığı üzerinde sayılamayacak kadar zararlı etkilere neden olduğu bilinmektedir. Gelişen dünya yaşantısı, artan çevre kirliliği insan sağlığında çok ciddi sorunları beraberinde getirmektedir. Bu kirleticilerin neden olduğu sağlık sorunlarını önlemeye ya da tedavi etmeye yönelik çok değişik ajanlar ve uygulama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışma ile çok sayıda biyolojik etkileri ortaya konulmuş olan, başta üzüm olmak üzere pek çok farklı meyve ya da bitkide varolan doğal bir fitoaleksinin olan resveratrolün, çevresel kirleticilerden olan benzo(a)piren'in pankreas beta hücrelerinde neden olduğu zararlı etkilerini düzeltebilme yeteneği araştırılmıştır.

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sefa Çelik yönetiminde hazırlanarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu tez çalışması ile bilimsel bir çalışmayı hazırlama ve yapmamda bana rehberlik eden, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, bilimsel düşünme ve analiz becerimin gelişmesinde önemli bir rol oynayan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Sefa Çelik'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Eğitimimde emeği geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve asistanlara; çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Kimyager Arzu Özyürek'e, Öğretim Görevlisi Serkan Şen'e, Doç. Dr. İbrahim Hakkı Ciğerci'ye, Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmet Doğan'a ve tez çalışmam için maddi destek sağlayan AKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimimi ve çalışmalarımı yürütürken gösterdikleri fedakarlıkları nedeniyle en büyük yaşam destekçilerim olan annem ve babama şükranlarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Biyokimyager Barış BAYSAL

Afyonkarahisar-2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Tablolar	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.2. Pankreas ve Tip 2 Diyabet	2
1.3. Diyabette Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Savunma	2
1.4. Diyabetin Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü	3
1.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi	4
1.6. Tip 2 Diyabet ve ER Stres-Aracılı β -Hücre Apoptozisi	5
1.7. Polisiklik Aromatik Bileşik Benzo(a)Piren	8
1.8. Güçlü Bir Antioksidan Bileşik Resveratrol	8
2. GEREÇ ve YÖNTEM	11
2.1. Hücre Kültürü	11
2.2. Hücre Pasajı	11
2.3. Resveratrol ve Benzo(a)piren Uygulamaları	12
2.4. Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması	12
2.5. Biyokimyasal Analizler	13
2.5.1. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Analizleri..	13
2.5.2. Nitrik Oksit (NO)Analizi	14
2.5.3. Redükte Glutatyon (GSH) Analizi	14
2.5.4. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi	14
2.5.5. İnsülin Sekresyon Ölçümü	15
2.6. Moleküler Analizler	15

2.6.1. RNA İzolasyonu, Komplementari DNA (cDNA) Sentezi ve Real Time- QPCR Analizleri	15
2.7. Comet Assay Yöntemi ile DNA Kırılmalarının Gösterilmesi.....	17
2.8. İstatistiksel Analizler	20
3. BULGULAR	21
3.1. Nitrik Oksit, Toplam Antioksidan Kapasite, Toplam Oksidan Kapasite ve GSH düzeyleri	21
3.2. İnsülin Düzeyleri ve MTT Hücre Canlılık Oranları	25
3.3. Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri	27
3.4. Comet Assay verileri	33
4. TARTIŞMA	34
5. SONUÇ	39
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

AU:	Arbitrary unit
<i>Bcl-2</i> :	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL:	B-cell lymphoma-extra large
B(a)P:	Benzo(a)piren
CHOP:	C/EBP homologous protein
JNK:	c-Jun N-terminal kinaz
DM:	Diabetes mellitus
DMSO:	Dimetilsülfoksit
<i>FOXO1</i> :	Forkhead box protein O1
FCS:	Fötal buzağı serumu
GSH:	Glutasyon
GSHPx:	Glutasyon peroksidaz
<i>GAPDH</i> :	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HO:	Hidroksit radikali
İNS-1:	İnsülin-1 geni
İNS-2:	İnsülin-2 geni
INS-1E:	İnsülinoma-1E hücresi
CAT:	Katalaz
KRBH:	Krebs-Ringer bikarbonat HEPES
OSI:	Oksidatif stres indeksi
PDX-1:	Pankreatik ve duodenal homeobox 1
PERK:	Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz
ROS:	Reaktif oksijen türleri
RES:	Resveratrol
RT-PCR:	Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SIRT1:	Sirtuin-1
SOD:	Süperoksit dismutaz
O ₂ ⁻ :	Süperoksit radikali
TAS:	Total Antioksidan Statü
TOS:	Total Oksidan Statü
P53:	Tümör protein 53
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Comet Assay’de görsel skorlama (Collins ve ark., 1995).....	19
Şekil 3.1. Hücre lizatlarının NO düzeyleri.....	23
Şekil 3.2. Hücre lizatlarının TAS düzeyleri.....	23
Şekil 3.3. Hücre lizatlarının TOS düzeyleri.....	24
Şekil 3.4. Hücre lizatlarının OSI değerleri.....	24
Şekil 3.5. Redükte glutatyon düzeyleri.....	25
Şekil 3.6. İnsülin düzeyleri.....	26
Şekil 3.7. MTT hücre canlılık oranları.....	27
Şekil 3.8. FOXO-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	29
Şekil 3.9. PDX-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	29
Şekil 3.10. SIRT-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	30
Şekil 3.11. İNS-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	30
Şekil 3.12. İNS-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	31
Şekil 3.13. p53 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	31
Şekil 3.14. BCL-XL geninin mRNA ekspresyon düzeyi	32
Şekil 3.15. BCL-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi	32
Şekil. 3.16. Comet skorları.....	33

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları	17
Tablo 3.1. Hücre lizatlarının NO, TAS, TOS, OSİ ve GSH değerleri	22
Tablo 3.2. İnsulin ve MTT değerleri	26
Tablo 3.3. Beta hücre proliferasyonu, apoptozu ve ER stresi ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri (misli değişiklik)	28
Tablo 3.4. Comet skorları	33

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), pankreastan salınan insülin hormonunun tamamen veya kısmi noksanlığına bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize olan ve toplumun ortalama %5-10'unda görülen bir hastalıktır. İnsülin noksanlığının yanı sıra insüline karşı ortaya çıkan direnç hastalığın gelişiminde rol oynamaktadır. Hastalıkta karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmaları etkilenmektedir (Halifeoğlu ve ark., 2005). Kısacası diabetes mellitus, insülin sekresyonunda bozulma veya insülin etkisine direnç veya her iki durumun bir arada bulunması sonucu hiperglisemiyle karakterize bir metabolik hastalıktır (Delibaş ve Kılınç, 2003).

Diyabet, başlıca iki tip olarak ortaya çıkar:

1. Tip-1 diyabet: İnsüline bağımlı diyabet olarak da bilinen türüdür. Bu tip diyabet hastalığı öncelikle 30 yaşından daha küçük kimselerde kendisini göstermektedir. Bağışıklık sisteminin bozulması sonucu, vücut kendi pankreas beta hücrelerinin tümünü yok eder ve insülin sentezi tamamıyla durur. Bu tip hastalarda eğer dışarıdan insülin verilmezse, hasta birkaç hafta veya aydan fazla yaşayamaz (Halifeoğlu ve ark., 2005).

2. Tip-2 diyabet: İnsüline bağımlı olmayan diyabettir. Diyabetin bu tipi insülin etkisinin mutlak veya göreceli olarak azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Tip-2 diyabet, hücre zarındaki insülin reseptörlerinin duyarsızlığı sebebiyle glukozun hücreye alınamaması sonucu oluşur. Diğer bir ifadeyle insülinin yetersizliğine ve/veya insülinin etkilediği reseptörlerin bozukluğuna bağlı gelişmektedir. Özellikle yetişkinlerde görülen tip 2 diyabetin asıl nedeni insülin salgısındaki yetersizlikten çok periferik dokuların insüline karşı oluşturdukları insülin direncidir (Kavak, 2008).

1.2. Pankreas ve Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi haline gelen ve yetişkinler, çocuk ve adolesanlarda insidansı hızla artmakta olan bir hastalıktır (Harris ve ark., 1998; Narayan ve ark., 2000). Tüm dünyadaki diyabetli sayısının 2030'lu yıllarda 300 milyonu geçeceği öngörülmektedir. Ölümlerin nedenleri içerisinde diyabetin yedinci sırada yer almaktadır. Tip 2 diyabetin erken evresinde beta hücreleri normal kan glukoz düzeylerinin devamlılığını sağlamak için aşırı miktarda insulin üretirler. Buna rağmen, mitokondrial fonksiyon bozukluğu ve endoplazmik retikulum stresi nedeniyle beta hücrelerinin bu kompanse etme gayretleri yetersiz kalır ve beta hücre apoptozu gerçekleşir (Prentki ve Nolan, 2006). Sonuç olarak beta hücre kütlelerinde azalma meydana gelir (Butler ve ark., 2003).

Beta hücrelerinin glukoz homeostazisinde merkezi konumda olmaları nedeniyle, tip 2 diyabet gelişimi beta hücre kaybını ve fonksiyon bozulmasını başlatan, kolaylaştıran ya da hızlandıran faktörler tarafından etkilenir.

Longnecker ve Daniels (2001), tip 2 diyabetin etiyolojisinde kimyasal kirleticilerin önemli rol oynayabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Bu hipotezi destekler bir şekilde, epidemiyolojik çalışmalar; yüksek düzeyde arsenik, organoklorin kirleticiler ve hava kirliliğine maruziyet sonucu insülin direnci veya tip 2 diyabet insidansının arttığını ortaya koymuşlardır (Henriksen ve ark., 1997; Bertazzi ve ark., 2001; Steenland ve ark., 2001; Vasiliu ve ark., 2006).

1.3. Diyabette Oksidatif Değişiklikler ve Antioksidan Savunma

Diyabette süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikali, hidroksit radikali (HO^{\cdot}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek düzeyde üretimi ve/veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği nedeniyle oksidatif stres gelişebilir (Kesavulu ve ark., 2001). ROS üretimindeki artış protein glikolizasyonu ve/veya

hiperglisemik ortamda glikozun otooksidasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Serbest radikallerin nötralizasyonundaki yetersizliğin sebebi enzimatik ve enzimatik olmayan radikal yakalayıcıların yetersizliği ile ilişkilidir (Hunt ve ark., 1990).

Diyabette, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'ın mRNA ekspresyon düzeyleri ve aktiviteleri artmaktadır. Bunun temelinde glikozun oto-oksidasyonu ve enzimatik olmayan glikolizasyon olayları sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikallerinin artış göstermesinin yer aldığı düşünülmektedir (Bhor ve ark., 2004).

Hastalıkta plazma glutatyon (GSH) seviyelerinde önemli düşmeler meydana gelir (Ozsoy ve ark., 2004). GSH, kimyasallara karşı savunmada en önemli biyomoleküldür. Glutatyon peroksidaz (GPx) varlığında gerçekleşen hidroperoksitlerin yıkımlanması olayı sırasında oluşan ara ürünlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. GSH ayrıca serbest radikal yakalayıcısı olarak fonksiyon görür ve radikallerin neden olduğu hücre hasarı düzeltme yeteneğine sahiptir (Venkateswaran ve Pari, 2003).

1.4. Diyabetin Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü

Pankreatik beta hücreleri insülin sekresyonu ile ilişkili glukoz homeostazisinde çok önemli bir role sahiptirler. Beta hücrelerinin hem sayısal hem de hacimsel olarak değişimleri dinamik olarak değişik fizyolojik ve patolojik koşulların etkisi altındadır (Bonner-Weir, 2000). Fizyolojik şartlarda yaşam boyunca düşük düzeyde beta hücre ölümleri ile proliferasyonu arasında bir denge mevcuttur. Ancak, beta hücrelerinin aşırı kaybının diyabete ve hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin ortak özelliği olan beta hücre disfonksiyonuna neden olduğu kabul edilir (Eizirik ve Poulsen, 2001; Mathis ve ark., 2001). Tip 1 diyabette, beta hücreleri otoimmün ve yangısel proseslerle seçici olarak yok edilirler ve bu durum insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile sonuçlanır.

Tip 2 diyabette hastalığın ilerlemesinde esas etkili olan faktör, sıklıkla şişmanlık ve fiziksel aktivite azlığı ile ilişkili olan insülin direncidir. Fakat bu durum, sadece beta hücrelerinin artan insülin ihtiyacını karşılayamamaları sonucu oluşur. Her iki durumda da, beta hücre ölümünün esas yolu apoptozis olarak telakki edilir. Ölüm reseptörlerinin bağlanması ve DNA hasarı apoptozisin başlatıcıları olarak kabul edilirler ve mitokondrial membran permabilitesini ve kaspazların aktivasyonunu indüklerler. Beta hücrelerinde gelişen apoptozis, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, membran geçiş özelliği olan değişik maddeler, büyüme faktörlerinin yetersizliği, metabolik ve sinyal yollarındaki aksaklıklar gibi değişik uyaranlara bağlı olarak ortaya çıkar. Beta hücre apoptozunda etkili olan çok sayıda ve çeşitte potansiyel uyarıcı vardır. Ölüm reseptörleri olan Fas ligand ve Fas reseptörü, perforinler, sitokinler (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) (Eizirik ve Poulsen, 2001; Mathis ve ark., 2001), reaktif oksijen türleri (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) (Kaneto ve ark., 1999), reaktif azot türleri (nitrik oksit, peroksinitrit) (Oyadomari ve ark., 2001), alkilleştirici ajanlar (streptozotosin, metil metan sülfonat) (Saini ve ark., 1996), seramid (Unger, 2002); büyüme faktörlerinin yetersizliği (Withers ve ark., 1999) bunlardan bazılarıdır.

1.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi

Beta hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri, ağır insülin sekresyonu yüküne bağlı olarak yüksek derecede gelişmiş ER gücüne sahip olmalarıdır. ER çok sayıda önemli fonksiyona sahiptir. Bunlar; translasyon sonrası modifikasyon, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve sunulmaları, ayrıca hücrel kalsiyum deposu olmasıdır. ER'un bu fonksiyonları hücrenin yaşamsal sürekliliği için esansiyeldir ve fonksiyonundaki herhangi bir düzensizlik ya da aksaklık hücrel hasara neden olur ve apoptozis ile sonuçlanır. Değişik koşullar ER fonksiyonunu bozar ve bu koşul ya da olayların hepsi "ER stresi" olarak ifade edilir. Bu stresler içerisinde protein

glikolizasyonunun inhibisyonu, disülfit bağlarının oluşumunda yetersizlik, ER lümeninden kalsiyum boşalması, ER'dan golgiye protein transportunda aksaklık ve bozuk katlanmış proteinlerin eksprese edilmesi gibi olayları sıralamak mümkündür. ER, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine cevap olarak gelişen sinyal yolları ile regüle edilir. ER stres koşullarında hücre yaşamının devamlılığı ya da adaptasyonu için hücreler ER stresine karşı koruyucu bir mekanizmaya sahiptirler ve bu mekanizma ER stresi cevabı olarak adlandırılır (Mori, 2000). En az 4 belirgin fonksiyonel cevap tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi, protein katlama aktivitesini artırmak ve protein kümeleşmelerini engellemek için ER şaperon proteinlerini kodlayan genlerin uyarılmasını içermektedir. İkincisi, yeni protein sentezi yükünün azaltılması ve katlanmamış proteinlerin birikiminin engellenmesine yönelik translasyonel zayıflatma mekanizmasıdır. Üçüncüsü, ER'da hatalı katlanmış olan proteinlerin yıkılmasındır ki bu ER-ilişkili yıkılma (ERAD) olarak adlandırılır. Dördüncü ve son cevap, ER'un fonksiyonlarının tamamıyla yok olması sonucu gelişen apoptozistir.

1.6. Tip 2 Diyabet ve ER Stres-Aracılı β -Hücre Apoptozisi

Diyabet hastalığının en yaygın formu tip 2 diyabettir ve genelde erişkinlerde obezite ile ilişkili olarak ortaya çıkar. Hastalık insülin sekresyonunda (β -hücre fonksiyon yetersizliği) ve insüline duyarlılıkta azalma (insülin direnci) durumlarının kombinasyonu ile karakterizedir. Normal beta hücre fonksiyonuna sahip bireyler, obezite gibi koşullarda insülin sentezini artırarak insülin direncine adapte olabilirler. İnsülin direncini kırmak amacıyla artan ihtiyaca cevap vermek üzere sürekli insülin sentezi beta hücrelerinde ilerleyen bir yetmezliğe ve sonunda hiperglisemiye neden olur. Obez insanların yaklaşık %10-15'inde diyabet gelişmektedir (DeFronzo ve Ferrannini, 1991). Bu yüzden, tip 2 diyabetin patogeneğinde beta hücre fonksiyon bozukluğu kilit faktördür. İnsülin sekresyonundaki yetersizliğe ilave olarak, beta hücre kütleindeki azalma da fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. Aslında çok sayıda çalışma, tip 2 diyabetik hastalarda muhtemelen β -hücrelerinin apoptotik ölümünden kaynaklı β -hücre kütleinde azalma olduğunu göstermektedir (Stefan ve ark., 1982).

İnsülinin aşırı sekresyonu, diyabet öncesi evrede ya da tip 2 diyabetin erken diyabetik fazında sıklıkla görülür. İnsülin direnci ve uzun süreli sülfonilüre tedavisi sonucu insülin sekresyonuna duyulan ihtiyacın artması β -hücrelerinde aşırı yüklenmeye ve sonuçta insülin sekresyonunda azalmaya neden olabilir. Sülfonilüre grubu ilaçlar oral hipoglisemik ajanlardır ve β -hücrelerini insülin sekresyonu yapmak üzere uyarırlar. Bu koşullar altında gelişen β -hücre fonksiyon bozukluğu “pankreatik β -hücre yoğunluğu” olarak ifade edilir. İlişkili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. ER stresine duyarlılık hücreden hücreye farklılık gösterir. β -hücreleri belkide ER stresine en duyarlı hücrelerdir (Oyadomari ve ark., 2002). ER stresini ileten (düzenleyen) proteinler olan Ire1 α ve PERK pankreatik β -hücrelerinde yüksek oranda sentezlenirler. Bu muhtemelen β -hücrelerinin yüksek düzeyde protein sentezi ile donatılmış olması ile ilişkilidir. ER stres iletici bu proteinlerin yüksek düzeyde sentez edilmeleri, β -hücrelerinde sentezlenen proteinlerin sıkı bir şekilde kalite kontrollerinin yapılabilmesi için gerekli olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, ER’deki protein trafiğindeki aksaklık hücrenin ölümüne neden olabilir. β -hücreleri ER stres aracılı apoptozise yüksek derecede duyarlıdırlar. Spontan olarak hiperglisemi tablosu gösteren mutant Akita farelerinde insülitis ya da obezite olmadan β -hücre kütlelerinde azalma geliştiği tespit edilmiştir (Yoshioka ve ark., 1997). Devamlı olarak gerçekleşen hiperglisemi tablosuna CHOP’un uyarılması ve β -hücre apoptozisinin eşlik ettiği rapor edilmiştir (Oyadomari ve ark., 2002). Sürekli hiperglisemi gösteren Akita farelerinde diyabet gelişmesi durumunda, ER şaperon Bip ve ER stres ilişkili apoptozis faktörü CHOP’un mRNA sentezleri pankreasda uyarılır. Mutant insülinin aşırı eksprese edildiği fare MIN6 β -hücrelerinde CHOP ekspresyonu uyarılır ve apoptozis gelişir. Bununla birlikte CHOP geni susturulmuş

olan homozigot Akita farelerinde, diyabetin oluşumu engellenememektedir. Bu nedenle, CHOP'un dışında JNK ve kaspaz-12 gibi diğer yolların da apoptoziste etkili olabileceği söylenebilir.

Son yapılan çalışmalar, PERK'den yoksun fareler ve eIF2- α fosforilasyon bölgesinde mutasyon oluşturulan farelerde, β -hücrelerinin ER stresine daha duyarlı olduklarını göstermiştir. PERK noksan fareler yaşamlarının 4. haftasında belirgin bir hiperglisemi gösterirler ve doğum sonrası dönemde β -hücrelerinde artan bir apoptozis oranına sahiptirler. Bu farelerin pankreas langerhans adacıklarının elektron mikroskop görüntülerine bakıldığında beta hücrelerinin endoplazmik retikulumlarının genişlediği, sekretör granüllerin büyüklüğünde ve sayısında azalma olduğu görülmüştür. Benzer değişiklikler Akita farelerin adacıklarında da görülmüştür. PERK yolağı, fizyolojik koşullarda yeni protein sentezinin ER katlama kapasitesini aşmaması yönünde bir sigorta ya da garantör görevi görür. β -hücreleri translasyonel zayıflatmanın yokluğuna oldukça duyarlı hücrelerdir ki bunun devamında apoptozisle sonuçlanan bir ER stresine maruz kalırlar. Oysaki diğer hücreler bu koşullara kolaylıkla adapte olabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedendir ki; PERK yolağı β -hücrelerinde protein sentezinin fizyolojik yükünde esansiyel bir yoldur (Wang ve ark., 1999).

Tüm bu bilgilerden hareketle, β -hücrelerinde ER, diyabetin gelişimini modifiye edebilme potansiyeli taşımaktadır. Protein sentezine duyulan ihtiyaç ile ER'un protein katlama kapasitesi arasındaki dengesizlik ER stresini tetikleyebilir. Tip 2 diyabette, ER'da düşük düzeyde ve uzun süreli olarak devam eden protein yanlış katlanmalarının β -hücre kayıplarına neden olabileceği söylenebilir. β -hücrelerine aşırı yüklenilmesi kronik ER stresine neden olabilir. β -hücrelerinde ER stresi aracılı apoptozis üzerine yapılacak çalışmalar diyabetin patogenezinde yeni mekanizmaların aydınlatılmasına ve tedavi hedeflerinin iyi belirlenmesine ışık tutacaktır.

1.7. Polisiklik Aromatik Bileşik Benzo(a)Piren

Benzo(a)piren (B(a)P), $C_{20}H_{12}$, beş halkalı bir polisiklik aromatik hidrokarbondur. Mutajenik ve yüksek derecede etkili bir kanserojendir. Benzo(a)pirenler olarak adlandırılan bir polisiklik aromatik bileşikler sınıfına dahildir. Bu bileşiklerin ortak özelliği bir piren molekülü ile kaynaşmış bir benzen halkası içermeleridir. Benzo[a]piren'in kömür katranının bir bileşeni olduğu 1933'te bulunmuştur. Bu bileşik kömürün 300-600°C'da kısmî yanmasından kaynaklanır. Benzo(a)piren'in kaynakları arasında kömür katranı, otomobil egzoz dumanları (özellikle dizel motorlarının), organik malzemenin yanmasından kaynaklanan her türlü duman ve ızgarada pişirilmiş yiyecekler yer alır. Pişmiş ette 4 ng/g, kızarmış tavukta da 5.5 ng/g'a varan miktarlarda ve kömür ateşinde çok pişmiş et örneklerinde 62 ng/g benzo(a)piren bulunmuştur. 1970'lerden beri benzo(a)piren ile kanser türleri arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda araştırma yapılmıştır. Son yıllarda benzoapirenin oluşturduğu kanserojenik etkinin mekanizması büyük ölçüde aydınlatılmıştır. Benzo(a)piren, sitokrom P4501A1 (CYP1A1)-bağımlı bir monooksijenaz tarafından elektrofilik metabolitlerine dönüştürülür. Benzoapirenin bir metaboliti olan BaP-8-diol-9,10-epoksit adlı bileşik hücrelerde DNA ile reaksiyon vererek DNA hasarı oluşturan, DNA ileri ürünlerini oluşturmaktadır. Bu ürünlerin konsantrasyonları 4 μ M ve üzeri olursa bir tümör baskılayıcı gen olan p53 geninde mutasyonlar gelişerek, apoptoza direnç geliştirmekte ve böylelikle kanser ilerlemektedir (Gelboin, 1980).

1.8. Güçlü Bir Antioksidan Bileşik Resveratrol

Resveratrol, başta üzüm olmak üzere pek çok farklı bitki veya meyvede var olan doğal bir fitoaleksindir. Resveratrol özellikle kırmızı üzümde, yer fıstığında ve ananasta yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Güçlü antioksidan özelliği sayesinde reaktif oksijen türevlerini temizlediği, DNA hasarına engel olduğu ve hücre membranında lipid peroksidasyonunu önlediği ifade edilmektedir. Resveratrolün kanserle bağlantılı süreçlerde etkili olduğunu gösteren birçok

araştırmanın bulguları (Chen ve ark., 2010; Bae ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2011) kanser tedavisinde nasıl kullanılabileceği konusunda daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

Resveratrol AMP-aktive protein kinazı ve sirtuin-1 (SIRT1)'i aktive etmektedir (Vetterli ve ark., 2011). SIRT1, çok değişik fizyolojik olayda önemli bir rol üstlenmektedir. Bu olaylar içerisinde hücre siklusu regülasyonu, gen baskılama, metabolizma ve inflamasyon sayılabilir (Picard ve ark., 2004). SIRT1'in karaciğerde STAT3 ve karaciğer X reseptör faktörleri aracılığıyla lipid ve glukoz homeostazisini regüle ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar SIRT1'in insülin sekresyonunda ve beta hücre fonksiyonunun devamlılığında pozitif regülatör olarak rol oynadığını ortaya koymuştur (Bordone ve ark., 2006; Ramsey ve ark., 2008). Resveratrol'un, SIRT1 analogu olarak, palmitat aracılı baskılanmış insülin sekresyonunu düzeltici etki gösterdiği rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2012).

Sunulan bu çalışmada INS1-E (832/13) pankreas hücre hattında; yanmış gıdalarda, tütün dumanında, egzoz gazında, kömür katranında bol miktarda bulunan bir kimyasal olan benzo(a)pirenin oluşturduğu hücre hasarı ve hücre fonksiyon bozukluğu üzerine resveratrolün tedavi edici etkinliği ortaya konulacaktır. Bu amaçla hücre kültürü ortamında yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen hücrelerde, hücre lizatlarında ve medium örneklerinde pankreas hücre fonksiyonu ile ilişkili olarak belirlenen ölçümler yapılacaktır.

Çevresel kirleticilerden olan benzo(a)piren, pankreas beta hücre hasarına neden olabileceği; bu hasarını, bilinen genel etkisi olan kendi metabolitinin DNA'ya bağlanması sonucu oluşturabileceği gibi; beta hücrelerinde insülin sekresyonu ve hücre fonksiyonunda önemli bir faktör olan SIRT-1'in ekspresyonunu baskılayarak yapabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Resveratrol'un hem antioksidan etkinliği hem de SIRT-1 üzerine olan pozitif modulator rolü nedeniyle, benzo(a)piren'in neden olabileceği beta hücre hasarını önleyebileceği de düşünülmektedir.

Çalışmadan elde edilecek sonuçlar, kimyasal kirleticilerin ne düzeyde pankreas hücre hasarına ya da fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği yönündeki mevcut literatüre önemli katkı sağlayabilecektir. Son yıllarda yapılan değişik çalışmalarla tip 2 diyabetin etiyolojik faktörleri arasında çevresel kirleticilerin önemli yeri olduğu ve göz ardı edilmemesi gerektiği rapor edilmiştir. Genetik ve obezitenin ön plana çıktığı tip 2 diyabette, ikincil derecede önemli olabilecek bir faktör olarak çevresel kirleticiler ve etkilerine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, alınması gereken tedbirler ya da etkilerini azaltmaya yönelik uygulamaların gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu kapsamda, yapılacak olan bu çalışmadan elde edilecek olan sonuçlar öncelikli olarak çevresel kirletici olan benzo(a)pirenin pankreas hücresinde neden olabileceği hücresel hasarın moleküler düzeyde incelenmesini sağlayacak, muhtemel bir mekanizma olan SIRT-1 aracılı yolun kullanıp kullanmadığını ortaya koyacaktır. Devamında ise resveratrol'ün, bu hasar ya da fonksiyon bozukluğuna karşı koruyucu etkinliği belirlenecektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre kültürü

Pankreas beta hücreleri ile ilgili in vitro çalışmalarda değişik mutant hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında MIN6 (fare), INS-1 (rat), HIT-T15 (hamster), BRIN-BD11 (rat) gibi beta hücre hatları sayılabilir. Bu çalışmada rat INS-1 beta hücre kültürü kullanıldı (INS-1E). Bu hücreler klonal insülin üreten insülinoma hücreleridir ve yüksek glukoza hassastırlar.

Hücre kültürü flasklarında süspansiyon ortamında hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması basamakları aşağıda verilmiştir.

2.2. Hücre pasajı

Hücreler %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal buzağı serumu (FCS) ve 5 mM glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 1 mM sodyum piruvat, 50 mikromM 2-merkaptotanol ve 10 mM HEPES içeren RPMI 1640 besi yerinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildi. Hücreleri çoğaltmak amacıyla yaklaşık cm karede 4x10⁴ hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm²'lik flasklara 3x10⁶ hücre 20 ml besi yeri içeren kültür kabına (150-mm flask) konarak 4-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon steril kapaklı tüplere aktararak 400xg ve 25°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre tortusu elde edildi. Pelet üzerine tüp hacminin yaklaşık 1/3'ü kadar taze besi yeri sıvısı konarak pipet ile karıştırıldı ve buradan alınan 20µl hücre süspansiyonu ile 90 µl tampon (1xPBS + %1 FCS) ve 100 µl tripan mavisi eppendorf içinde karıştırıldı. Mikroskopik incelemede karışımda beyaz renkte canlı hücreler ile mavi renkte ölü hücrelerin mililitredeki sayısı hemositometre üzerinde belirlendi. Sayımı yapılan hücrelerden yapılacak

pasajlamalarda yeni kültür kaplarına 10^5 hücre/ml olacak şekilde hücreler dağıtıldı ve yeterli miktarda medium eklenerek inkubasyona kaldırıldı.

2.3. Resveratrol ve Benzo(a)piren uygulamaları

Çalışma için yeterli sayıya ulaşan hücre kültür kapları (her grupta 3 adet) 4 grup oluşturulacak şekilde ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu (KONT), ikinci grup resveratrol (RES) verilen grup, üçüncü grup benzo(a)piren grubu (B(a)P) ve dördüncü grup ise resveratrol ve benzo(a)piren verilen grup (RES+B(a)P) olarak belirlendi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, DMSO içerisinde hazırlanan resveratrol ($10 \mu\text{M}$) yeterli miktarda mediumla birlikte hücrelere uygulandı ve 48 saat süreyle, 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi (Kode et al., 2008). Bu ilk inkübasyondan sonra kültür kabındaki medium çekildi ve yine DMSO içerisinde hazırlanan Benzo(a)piren ($20 \mu\text{M}$) hücrelere uygulandı ve aynı koşullarda 24 saat süreyle inkübe edildi (Tampioa, 2008). İnkübasyonlar sonrasında elde edilen hücrelerden hazırlanan lizatlarda ve medyum örneklerinde aşağıda detaylı olarak açıklanan metodlar kullanılarak ilgili parametrelerin analizleri yapıldı.

2.4. Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması

İnkübasyonlar sonrası hücreleri yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1ml %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif çırpma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C , 400 xg devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu eklendi. Lizis tampon şu karışımdan oluşmuştur: %1 Triton X-100 (v/v), 50 mM HEPES bafır pH 7.2, 10 mM EDTA, 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, %8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, PMSF, leupeptin, NaF). Deterjanda çözünmeyen proteinler 12000xg, 4°C 'de 10 dakika süreyle santrifüj ile

uzaklaştırılarak supernatant elde edildi. Supernatanların içerdiği protein düzeyleri standart olarak sığır serum albumini kullanarak Bradford metodu ile ölçüldü (Bradford, 1976). Çalışmalarda gruplarda aynı pasajdan elde edilecek hücreler kullanıldı, araştırmanın her aşamasında sterilizasyona azami özen gösterildi. Her bir ölçümün üçlü olarak yapıldığı 3 bağımsız deneyden (n=9) elde edilen veriler uygun istatistik metod ile analiz edildi.

2.5. Biyokimyasal analizler

Hücre lizatlarında analizi yapılan biyokimyasal parametreler değerlendirilirken total protein miktarlarına bölünerek elde edilen veriler istatistik hesaplamalarda kullanıldı.

2.5.1. Total Antioksidan Statü (TAS) ve Total Oksidan Statü (TOS) Analizleri

Bir ortamdaki antioksidan kapasiteyi ölçmeye yönelik olan metotlar genelde, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilmekte, ölçülen TAS düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak okunmaktadır. TAS ölçümleri Erel'in (2004) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede 660 nm'de kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi. TOS ölçümleri de yine Erel'in (2005) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point 530 nm'de okuma yapılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/mg prot}$ olarak ifade edildi.

Ayrıca TAS ve TOS ölçümleri yapıldıktan sonra, oksidan ve antioksidan dengeye ilişkin daha net yorum yapabilmemize olanak veren oksidatif stres indeksi (OSI) de hesaplandı. OSI hesaplaması aşağıda belirtilen formüle göre yapıldı.

$$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol/L}) / (\text{TAS}, (\text{mmolTroloxEquiv/L}) \times 100)]$$

2.5.2. Nitrik oksit (NO) analizi

Hücre lizatlarının NO düzeyleri Griess yöntemi (Green ve ark., 1982) kullanılarak belirlendi. Tetrametoksipropan ve N-butanol standart kalibrasyonun hazırlanması için kullanıldı.

2.5.3. Redükte glutatyon (GSH) tayini

Hücre lizatlarında SH (sülfhidril) taşıyan bütün proteinler, presipitasyon (çöktürücü) çözeltisi ile çöktürülüp, süzülerek ayrıldı. GSH, elde edilen berrak sıvıda SH gruplarının DTNB (5,5'-2-dithiobis nitrobenzoik asit) ile tepkimesi sonucu oluşan sarı rengin 412 nm dalga boyunda absorbanansı ile ölçüldü (Buetler ve ark., 1963) .

2.5.4. MTT Hücre Viabilite ölçüm testi

2×10^4 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 μ l alındı ve 96 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerinin her kuyucuğuna aktarılarak 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda inkübe edildi. Uygun düzeyde zemini kapladıktan sonra resveratrol ve benzo(a)piren uygulamaları belirtilen dozlarda ve sürelerle yapıldı. İnkübasyonlar sonunda her bir kuyucuğa 20 μ l MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi ve hücreler 37°C 'de 2 saat daha inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 200 μ l DMSO eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Renk değişimi, mikropleyt okuyucuda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Herhangi bir şey uygulanmayan kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi ve deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi (Denizot ve Lang, 1986).

2.5.5. İnsülin Sekresyon Ölçümü

Uygun koşullarda inkubasyonla çoğaltılan ve pasajlamaları yapılan hücreler, glukoz içermeyen Krebs-Ringer bikarbonat HEPES (KRBH) tamponu (135 mM NaCl, 3,6 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂ ve 10 mM HEPES, pH:7,4 BSA (0,1%) ile 2 kez yıkandıktan sonra 37 °C de 30 dk süreyle aynı mediumda inkübe edildi. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı. İnkubasyon pleytin buz üzerine konması ile durduruldu. Süpernetant sekrete edilen insülin düzeyinin ölçümü için toplandı. Hücrelere uygulanan asit-etanol ile hücresel insülin ölçümü için ekstraksiyon yapıldı. İnsülin ölçümleri spesifik ELISA kitleri kullanılarak fotometrik yöntemle gerçekleştirildi.

2.6. Moleküler Analizler

2.6.1. RNA izolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Real Time-QPCR Analizleri

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılacak olan gen ekspresyonu analizlerinde kullanılacak olan total RNA, hazır ticari kit kullanılarak hücrelerden izole edildi. RNA izolasyonu sırasında kullanılacak bütün malzemeler RNAase free bir ortam oluşturabilmek adına uygun çözeltilerle (RNA away) önceden temizlenerek hazır hale getirildi. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı mikroyet spektrofotometre ile ölçülerek elde edilen optik dansitelerinden hareketle (OD_{260/280}) belirlendi. OD_{260/280} oranı 1.7-2.1 aralığında

olan RNA'lar cDNA sentezinde kullanıldı. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

Her bir örnekten total RNA izolasyonu spin kolon yöntemi ile yapıldı (Norgen Biotek Corp., Ontario, Kanada). PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait total RNA'dan 0,1-5 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Bunun için ticari cDNA sentez kiti kullanıldı (Thermo Scientific, Lithuania). Elde edilen her bir numuneye ait cDNA'dan 1,5 µl kullanılarak üzerine 12,5 µl Sybr Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklendi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, literatürdeki çalışmalar referans alınarak veya primer 3 programı kullanılarak belirlenen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edildi ve reaksiyonda yaklaşık 100 ng düzeyinde kullanıldı (Tablo 2.1). Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. PCR analizleri ile;

- Beta hücre proliferasyonu ile ilişki FOXO-1 ve PDX-1,
- Beta hücre fonksiyonları ile ilgili olarak SIRT-1, İnsulin-1 ve İnsulin-2,
- Apoptoz ile ilgili olarak p53, Bcl-2 ve Bcl-XL'in mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

Tablo 2.1. Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları.

Gen	Primer Dizisi	PCR Programı	Döngü
p53	F-5'CGGAGGTTCGTGAGACGCTG'3 R-5'CACATGTACTTGTAGTGGATGGTGG'3	94°-1 dk/59°- 1dk/72°-1dk	40
Bcl-2	F-5'CAGCTGCACCTGACGCCCTT'3 R-5'CCCAGCCTCCGTTATTCTGGA'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
Fox01	F-5'GTGAACACCATGCCTCACAC'3 R-5'CACAGTCCAAGCGCTCAATA'3	95°-15 s/60°-1 dk/72°-1 dk	40
PDX-1	F-5'GGCTTAACCTAAACGCCACA'3 R-5'GGGACCGCTCAAGTTTGTA'3	94°-1dk/59°-1 dk/72°-1 dk	30
Bcl-xL	F-5'GAACTCTTTCGGGATGGGGTA'3 R-5'CAGAACTACACCAGCCACAGTC'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35
İnsulin-1	F-5'CCTGCTCGTCCTCTGGGAGCCCAAG'3 R-5'CTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGATCC'3	94°-1dk/68°- 1dk/72°-1dk	35
İnsulin-2	F-5' CCTGCTCATCCTCTGGGAGCCCCGC'3 R-5'CTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGGTCA'3	94°-1dk/70°- 1dk/72°-1dk	40
SIRT-1	F-5'AGGGAACCTCTGCCTCATCTAC'3 R-5'GGCATACTCGCCACCTAACCT'3	94°-1dk/60°- 1dk/72°-1dk	35
GAPDH	F-5'GTCGTGGAGTCTACTGGCGTC'3 R-5'GATGACCCTTTTGGCACCACC'3	94°-1dk/54°- 1dk/72°-1dk	35

2.7. Comet Assay Yöntemi ile DNA kırılmalarının gösterilmesi

Apoptozis belirleme yöntemlerini desteklemek adına DNA hasar tespitinde kullanılan Comet Assay'den faydalanıldı. Choucroun ve ark. (2001), Fas antijeni eksprese eden Jurkat hücreleri ile yaptıkları çalışmada; Fas antikoru ile uyarılmış apoptozisin olabildiğince erken dönemde comet görüntüleri kullanılarak tespit edilebileceğini ve comet görüntülerinin apoptotik risk mevcut olduğu durumlarda genotoksisite indikatörü olarak kullanılamayacağını göstermişlerdir.

INS-1E (832/13) hücre kültürü izolatları soğuk PBS tamponu ile artık materyallerin uzaklaştırılması için yıkandı. Daha sonra hücre çekirdeklerinin elde edilmesi için homojenat; 700×g'de 10 dakika ve 0°C'de santrifüj edildi. Daha sonra çökelti homojenizasyon tampon çözeltisinde, 1 g/ml olacak şekilde süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanan numuneler analiz edilinceye kadar -80°C'de muhafaza edilebildi (Sasaki ve ark., 1997).

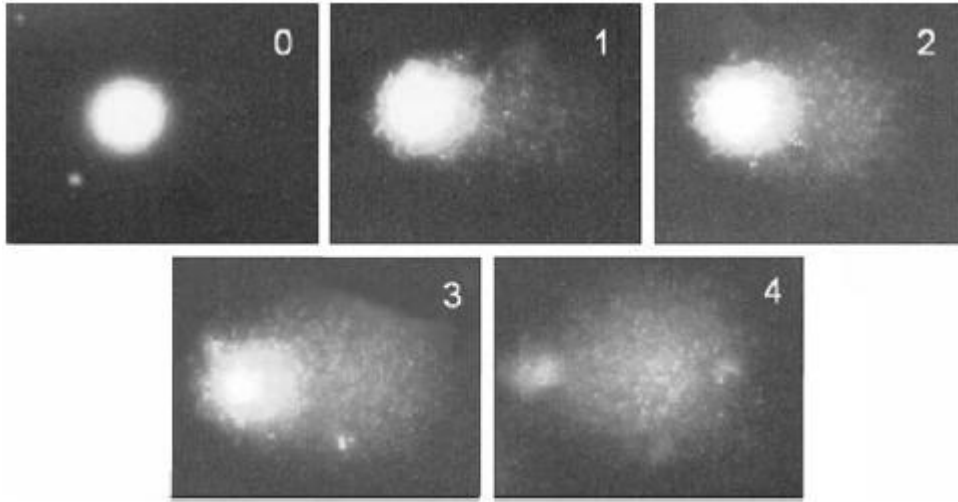
a. Slaytların hazırlanması: PBS içerisinde hazırlanan %1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) jel solüsyonundan 80 µl alındı ve buzlu lam üzerine damlatıldıktan sonra lam üzeri lamel ile kapatıldı. 2-4 C'de 5 dk bekletildikten sonra lameller kaldırılarak birinci agaroz tabakası hazırlanmış oldu. Hazırlanan lamalar nemli kutularda 2. ve 3. agaroz katları dökülene kadar saklanabildi. PBS ile 10^6 hücre/mm³ olacak şekilde süspansiyon edilmiş hücrelerden 10 µl alınarak ve 80 µl %0.5'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) ile karıştırılarak (45°C), hızlı bir şekilde, üstündeki lameli alınmış olan birinci agaroz tabakası üzerine yayıldı. 2-4°C'de 5 dk bekletilerek slaytın donması sağlandı ve son olarak da 75 µl LMA (%2) agaroz solüsyonu 3. tabakayı oluşturacak şekilde 2. tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytın hazırlanması tamamlanmış oldu.

b. Lizis: Hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içerisinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla, slaytlar buz soğukluğunda tutulan lizis solüsyonu (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Trizma, %1 sarkosil, %10 DMSO, %1 Triton X-100, pH:10) içerisine konuldu ve 1 gece, karanlıkta, 4°C'de (buzdolabında) bekletildi.

c. DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez: Elektroforez işlemi öncesinde DNA zincirinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM Na₂EDTA, pH:13) 10 dakika boyunca ve 2-5 °C'de, karanlıkta bekletildi. Elektroforez işlemi aynı tampon içerisinde, 5-25 °C'lik loş bir ortamda 15 dakika boyunca, 25 V (0.96 V/cm) ve yaklaşık olarak 250 mA akım koşullarında yapıldı.

d. Nötralizasyon ve boyama işlemleri: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, alkali tampon çözeltisinin slaytlardan uzaklaştırılması için slaytların her biri 5 ml 0.4 M Tris HCl (pH:7.5) ile 3 dk yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slaytlar 20 µg/ml'lik 50 µl ethidium bromide (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) ile boyandı ve 4 saat içinde değerlendirme yapıldı.

e. Değerlendirme: Ethidium bromide ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirildi. Değerlendirme işlemi görsel skorlama şeklinde yarı kantitatif olarak yapıldı. Kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görüntüsünün tespiti hasarsız hücrelerin varlığı anlamına geliyordu. Bu görünüm non-migration (göç yok) olarak değerlendirildi. Eğer DNA hasarı oluşmuş ise fragmentlerin ya da zincir kırılmalarının miktarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak düzensiz kenarlı bir görünüm elde edildi. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama oldu. Bu görünüme stretch ya da low migration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (Comet, high migration) şeklini aldılar. Son aşama ise apoptozistir. Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri puanlandırıldı. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırıldı (Şekil 2.1) ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak ifade edildi.



Şekil 2.1. Comet Assay'de görsel skorlama (Collins ve ark., 1995).

2.8.İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen sonuçlar SPSS 20.0 (2011) istatistik paket programında Kruskal-Wallis Testi uygulanarak analiz edildi. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Iman-Conover testi uygulandı ve veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. Nitrik Oksit, Toplam Antioksidan Kapasite, Toplam Oksidan Kapasite ve GSH düzeyleri

Hücre lizatlarında yapılan nitrik oksit, TAS, TOS, GSH ölçüm sonuçları Tablo 3.1’de verilmiştir. Hücre lizatlarında analizi yapılan parametreler değerlendirilirken sonuçlar total protein miktarlarına bölünmüş ve sonrasında istatistik hesaplamalarda kullanılmıştır.

Bu verilere göre; hücre lizatlarında NO konsantrasyonu B(a)P grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiki anlamlı olmayacak düzeyde yükselme göstermiştir. B(a)P+RES grubunda meydana gelen artışın ise B(a)P grubuna göre istatistik önemli düzeyde olduğu görülmüştür. Resveratrol ve B(a)P maruziyetine bırakılan hücrelerde, NO düzeylerinin daha da yükseldiği görülmektedir. Aynı şekilde sadece resveratrol uygulanan hücrelerde de kontrol hücrelere göre NO düzeylerinin artış gösterdiği; sonuç olarak resveratrolün genel anlamda hücre içi NO düzeylerini artırıcı bir etki sergilediği görülmektedir (Şekil 3.1).

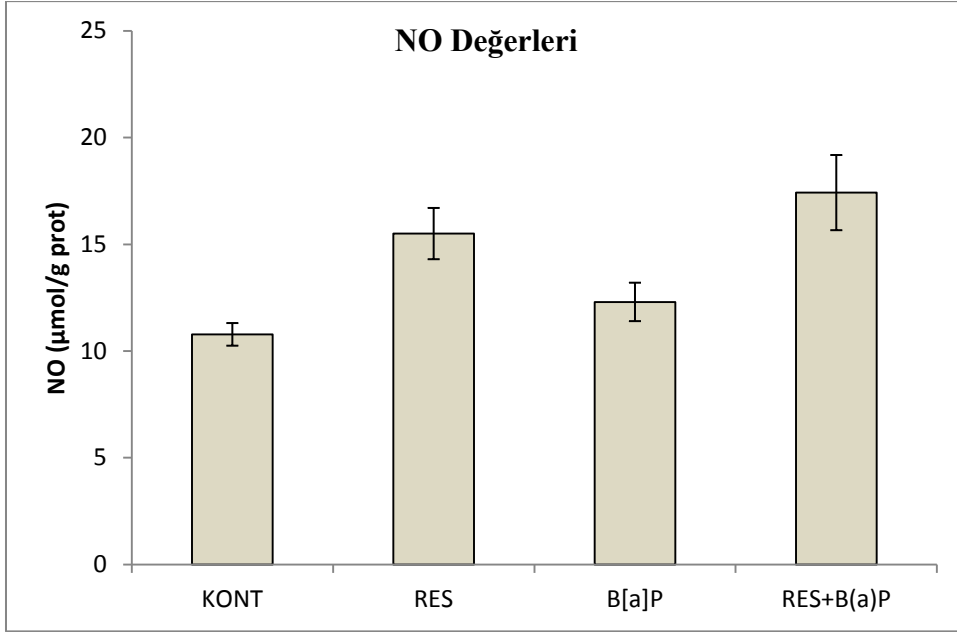
TAS düzeylerine bakıldığında resveratrolün TAS’yü artırdığı, B(a)P’nin ise azalttığı tespit edilmiştir. TAS düzeylerinin özellikle RES+B(a)P grubu hücrelerde, B(a)P grubu hücrelere göre çok önemli düzeyde olacak şekilde artış gösterdiği görülmüştür. Resveratrolün TAS'yü desteklediği, B(a)P'ne karşı gelişen antioksidan savunmayı önemli düzeyde artırdığı görülmektedir (Şekil 3.2).

Enteresan bir şekilde, TAS düzeylerinde meydana gelen değişikliğe paralel şekilde, TOS düzeylerinin de resveratrol uygulamalarından aynı yönde etkilendiği; hem tek başına uygulandığı hücrelerde hem de sonrasında B(a)P uygulandığı hücrelerde TOS düzeylerini önemli miktarlarda artırdığı görülmüştür. B(a)P ise TOS düzeyini kontrol grubuna göre önemli düşürmüştü, fakat bu düşüş istatistik düzeyde önemli bulunmamıştır (Şekil 3.3).

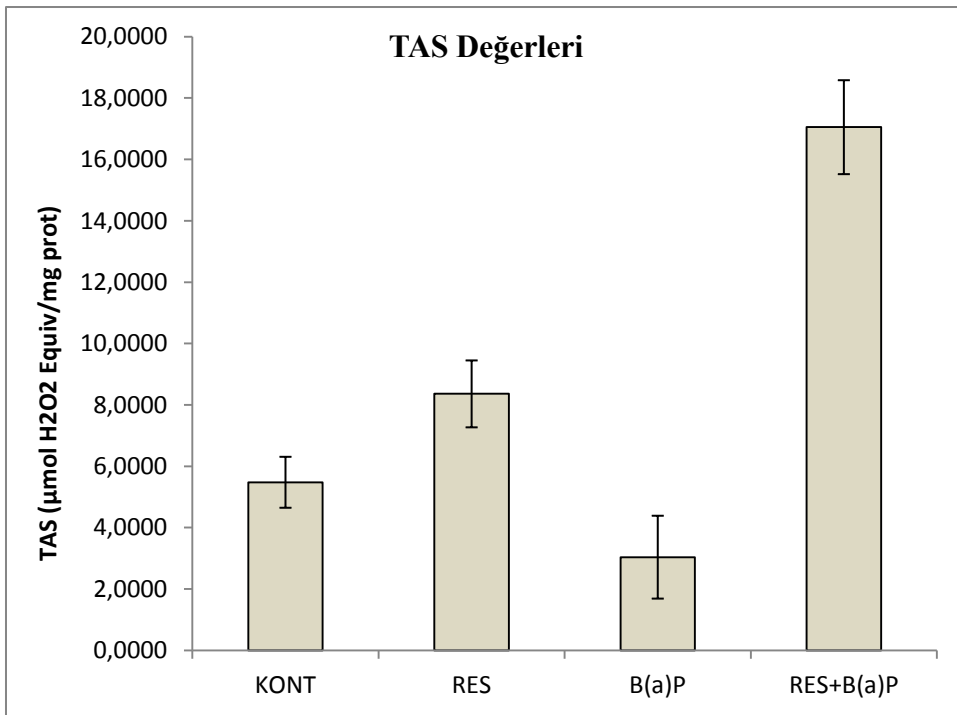
Tablo 3.1. Hücre Lizatlarının NO, TAS, TOS, OSİ ve GSH değerleri.

Grup	NO ($\mu\text{mol/g prot}$)	TAS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/mg prot)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/mg prot)	OSİ	GSH ($\mu\text{mol/mg prot}$)
KONT	10,78 \pm 0,53 ^a	5,48 \pm 0,83 ^a	1,26 \pm 0,11 ^a	23,39 \pm 3,27 ^a	5,80 \pm 0,63 ^a
RES	15,50 \pm 1,20 ^{bc}	8,36 \pm 1,09 ^b	2,85 \pm 0,40 ^b	34,40 \pm 6,23 ^b	9,57 \pm 0,99 ^b
B(a)P	12,30 \pm 0,90 ^a	3,04 \pm 1,35 ^a	1,09 \pm 0,36 ^a	13,60 \pm 3,30 ^c	3,77 \pm 0,28 ^c
RES+B(a)P	17,42 \pm 1,76 ^c	17,05 \pm 1,53 ^c	2,88 \pm 0,46 ^c	16,95 \pm 2,01 ^c	5,64 \pm 1,50 ^a

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri içeren ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır ($p \leq 0,05$).



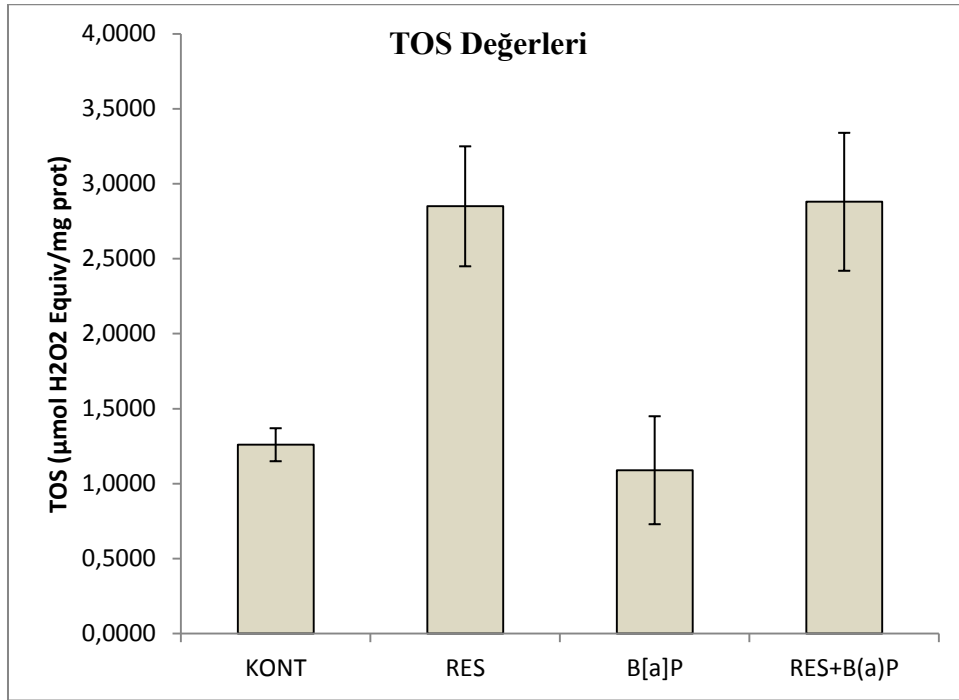
Şekil 3.1. Hücre lizatlarının NO düzeyleri.



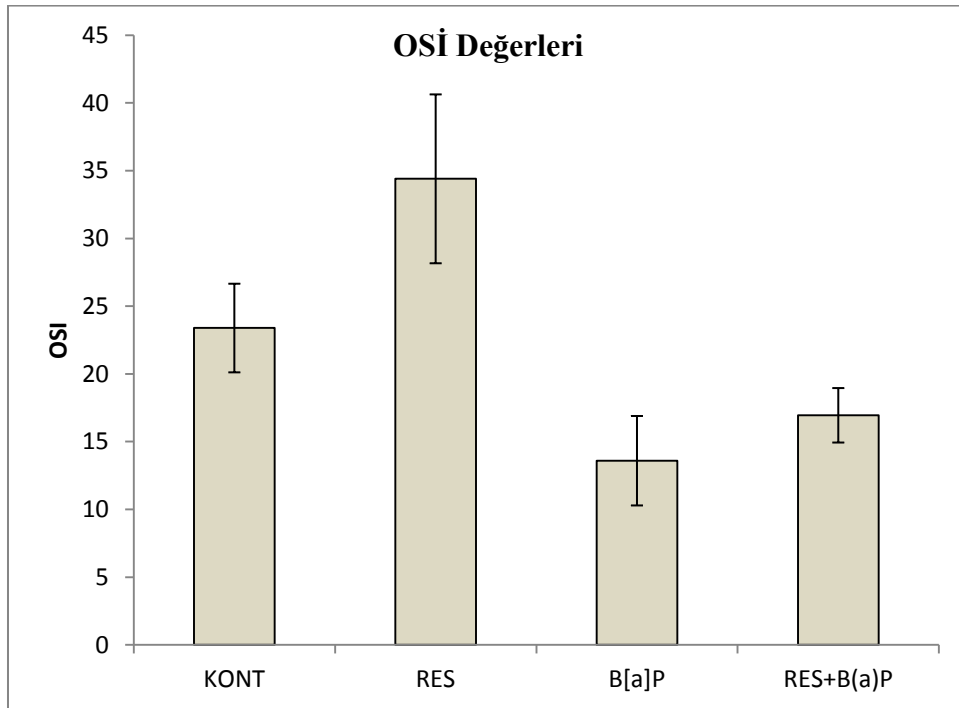
Şekil 3.2. Hücre lizatlarının TAS düzeyleri.

TAS ve TOS düzeylerinden hareketle elde edilen oksidatif stres indeksi (OSI) değerlerine bakıldığında, resveratrol grubunda kontrol grubuna göre artış B(a)P verilen grupta ise kontrol grubuna göre azalış olduğu; resveratrol sonrasında B(a)P

verilen grupta (RES+B(a)P) grupta B(a)P grubuna göre yükseldiği fakat bu yükselişin istatistik anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.4).

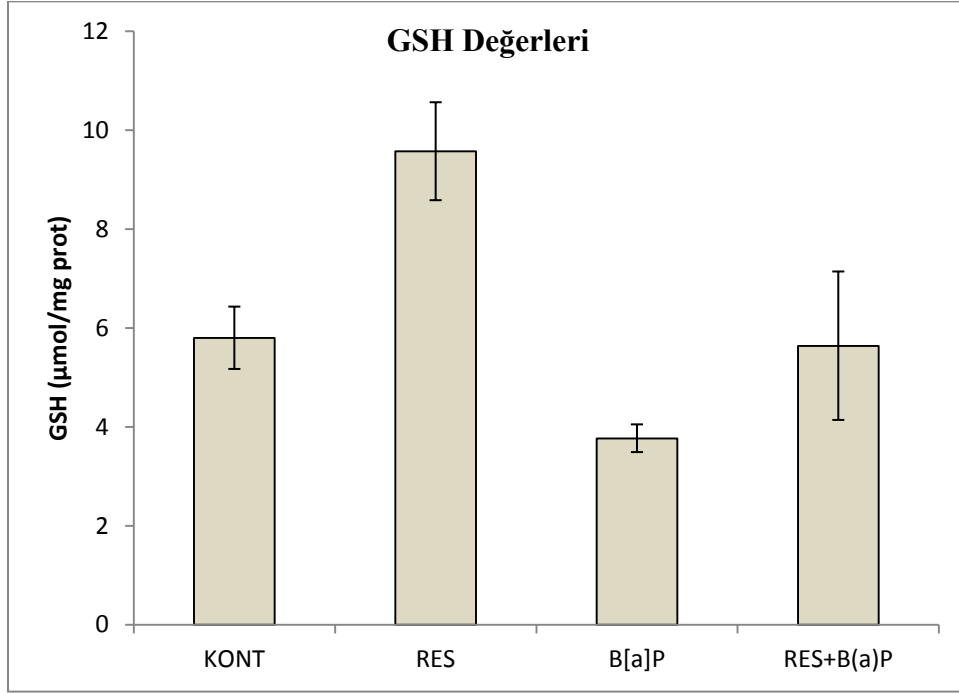


Şekil 3.3. Hücre lizatlarının TOS düzeyleri.



Şekil 3.4. Hücre lizatlarının OSİ değerleri.

Redükte glutatyon (GSH) düzeyleri resveratrolün etkisiyle RES grubunda kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermiş, ayrıca RES+B(a)P grubunda B(a)P grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Redükte glutatyon düzeyleri.

3.2. İnsülin Düzeyleri ve MTT Hücre Canlılık Oranları

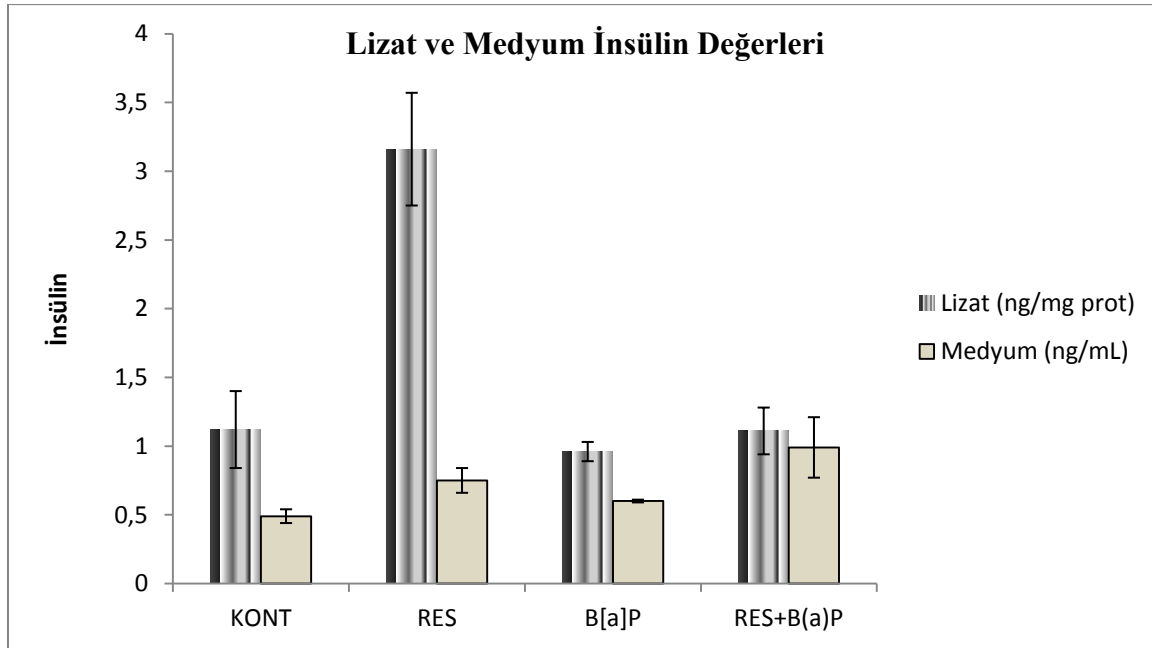
Beta hücre insülin düzeyleri ölçüm sonuçlarında, genel anlamda resveratrol uygulamasının insülin düzeyini artırdığı söylenebilir. Bu artış RES grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde iken, RES+B(a)P grubunda ise B(a)P grubuna göre lizat düzeylerinde istatistik önemli olmayacak düzeyde yüksek iken; medyum düzeylerinde istatistik anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 3.2; Şekil 3.6).

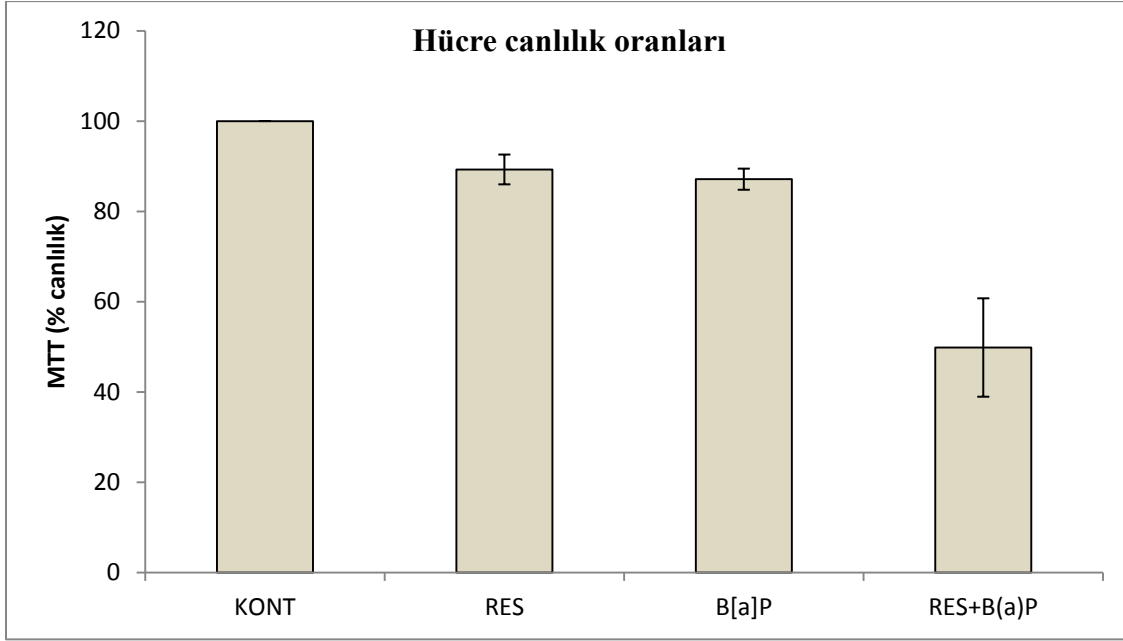
MTT hücre canlılık testi sonuçları; RES ve B(a)P gruplarında KONT grubuna göre canlılık oranlarının azaldığını; RES+B(a)P grubunda ise bu azalışın daha şiddetli olduğunu göstermektedir (Tablo 3.2, Şekil 3.7).

Tablo 3.2. İnsulin ve MTT değerleri.

Grup	İnsulin		MTT (% canlılık)
	Lizat (ng/mg prot)	Medyum (ng/ml)	
KONT	1,12±0,28 ^a	0,49±0,05 ^a	100±0,00 ^a
RES	3,16±0,41 ^b	0,75±0,09 ^{bc}	89,28±3,30 ^b
B(a)P	0,96±0,07 ^a	0,60±0,01 ^b	87,12±2,34 ^b
RES+B(a)P	1,11±0,17 ^a	0,99±0,22 ^c	49,84±10,9 ^c

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı üstlü ifadeleri içeren ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

**Şekil 3.6.** İnsülin düzeyleri.



Şekil 3.7. MTT hücre canlılık oranları.

3.3. Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmada ekspresyon düzeyleri incelenen genlere ait veriler Tablo 3.3'te verilmiştir. Hücre proliferasyonu ile ilişkili genlerden olan FoxO1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinin hem B(a)P hem de RES grubunda KONT grubuna göre 1,23 ve 1,43 misli yüksek olduğu görülmektedir. RES+B(a)P grubunda ise B(a)P grubuna göre 1,23 misli artış olduğu bulunmuştur (Şekil 3.8). Bir diğer gen olan PDX'e bakıldığında ise; RES ve B(a)P+RES gruplarında sırasıyla karşılaştırıldıkları KONT ve B(a)P gruplarına göre baskılandığı görülmektedir. Resveratrol uygulaması ile bu genin mRNA ekspresyon düzeyleri her iki grupta da baskılanmıştır (Şekil 3.9).

Pankreas beta hücrelerinde glukoz aracılı insülin sentezinde etkili olan ve ayrıca insülin duyarlı doku hücrelerinin insülin duyarlılığını artıran SIRT-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri resveratrol uygulanan tüm hücrelerde artış göstermiştir. Bu artış; sadece resveratrol verilen RES grubunda kontrole göre 1,43 misli iken, RES+B(a)P grubunda B(a)P grubuna göre 1,72 misli düzeyde olmuştur (Şekil 3.10).

Tablo 3.3. Beta hücre proliferasyonu, apoptozu ve ER stresi ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri (misli değışiklik).

Gen	mRNA ekspresyon düzeyi		
	B(a)P *	RES *	RES+B(a)P **
FOXO-1	+1,23	+1,43	+1,23
PDX-1	+1,70	-1,43	-2,33
SIRT-1	-1,20	+1,43	+1,72
İNS-1	-1,70	+3,03	+2,03
İNS-2	-2,17	+2,17	+1,63
p53	-1,40	+2,07	+1,60
BCL2	-1,15	+1,77	+1,20
BCL-XL	+2,23	+1,25	-1,57

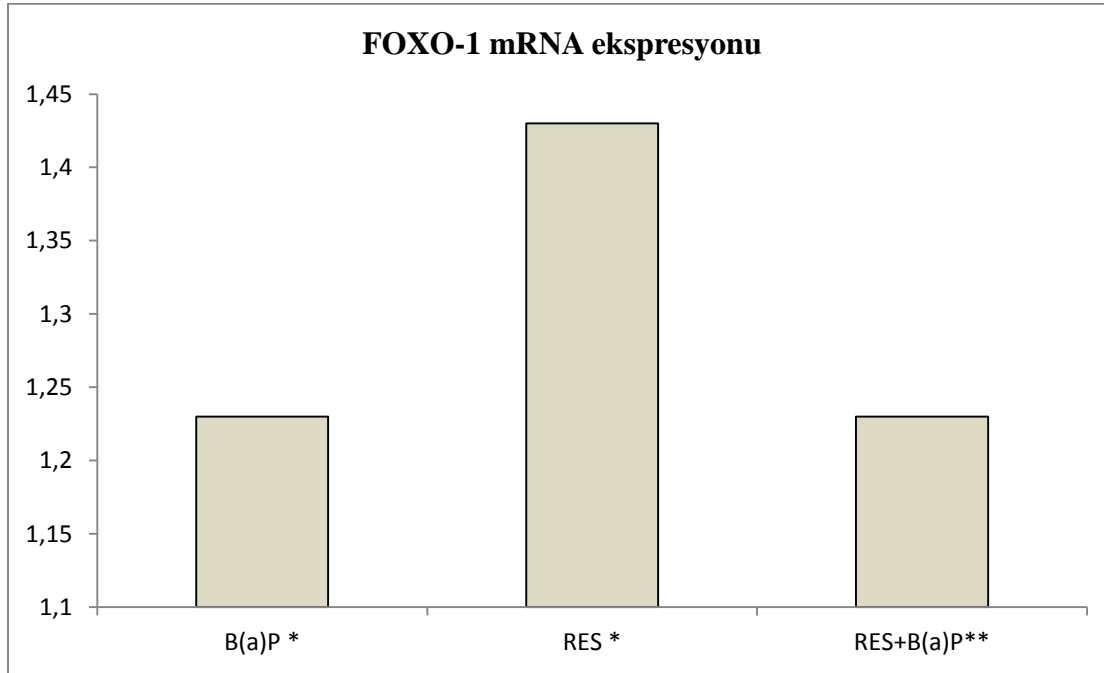
(*): Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır, (**): B(a)P grubu ile karşılaştırılmıştır.
(+): Misli artış, (-): Misli azalış.

Fare ve ratlarda insülin hormonu 2 gen tarafından kodlanır. Bunlardan biri ins-1, diğeri ise ins-2 genidir. İns-1 geni mRNA ekspresyonu B(a)P grubunda KONT grubuna göre 1,70 misli baskılanırken, ins-2 ise 2,17 misli baskılanmıştır. B(a)P'nin insülin genlerini kontrole göre önemli oranlarda baskıladığı görülmüştür. Diğertaraftan resveratrol; hem tek başına resveratrol verilen RES grubu hücrelerde hem de RES+B(a)P grubu hücrelerde insülin genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini yükseltmiştir (Şekil 3.11 ve 3.12).

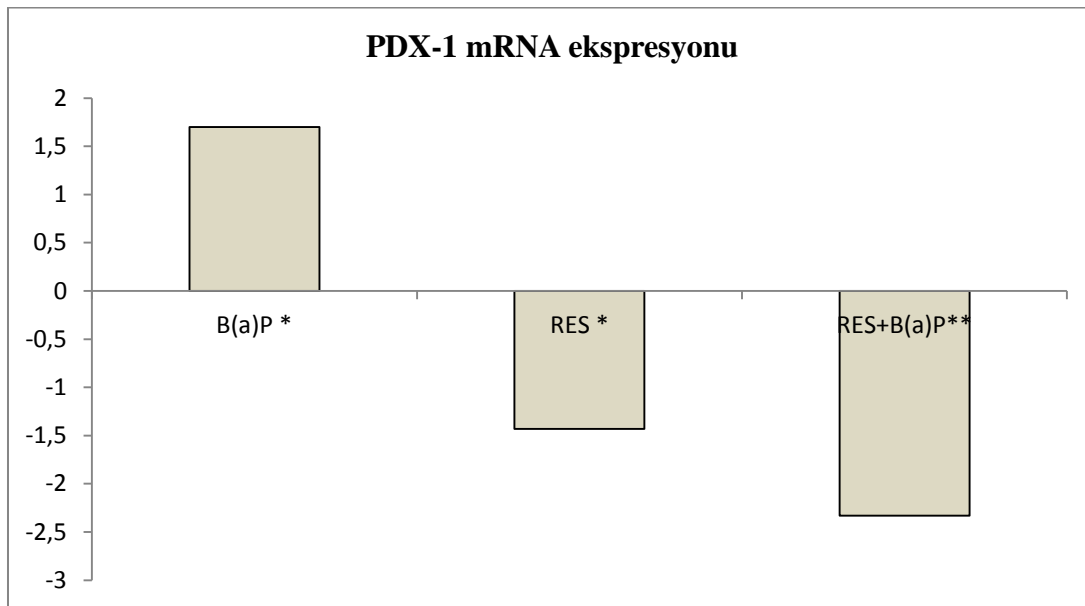
Proapoptotik genlerden olan p53 geni mRNA ekspresyon düzeyi B(a)P tarafından 1,40 misli baskılanırken, resveratrol etkisiyle RES grubunda KONT grubuna göre 2,07 misli, B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre ise 1,60 misli uyarılmıştır (Şekil 3.13).

Antiapoptotik gen olan Bcl-xL'ye bakıldığında ise B(a)P grubunda KONT grubuna göre 2,23 misli uyarıldığı; RES+B(a)P grubunda B(a)P grubuna göre 1,57 misli baskılandığı; ancak sadece resveratrol verilen RES grubunda ise baskılanmayıp, aksine 1,15 misli uyarıldığı görülmüştür (Şekil 3.14). Apoptotik bir gen olan Bcl-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri B(a)P grubunda KONT grubuna göre 1,15 misli baskılanırken; RES ve RES+B(a)P

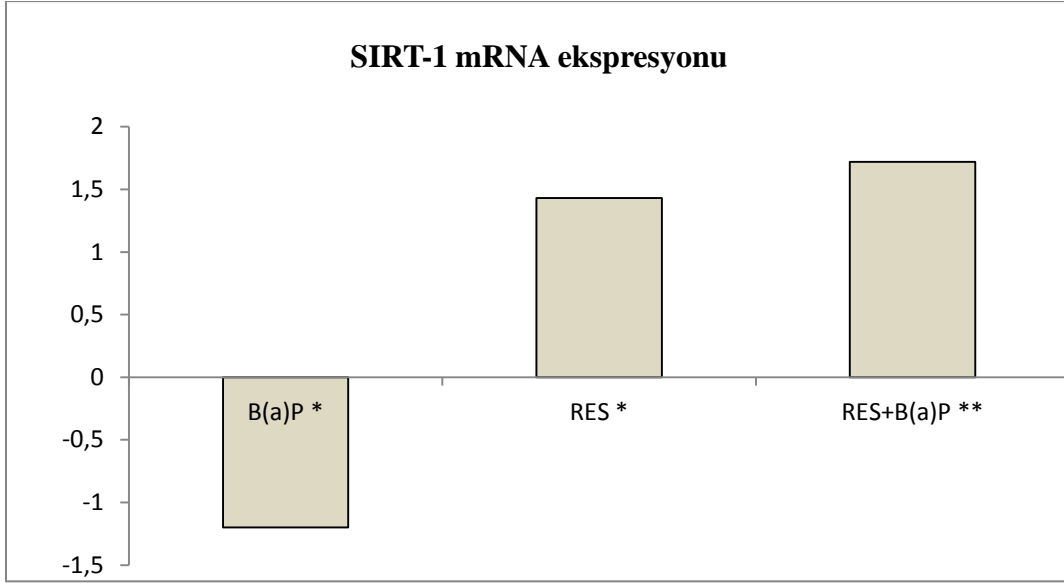
gruplarında resveratrolün etkisiyle sırasıyla 1,77 ve 1,20 misli artışlar göstermiştir (Şekil 3.15).



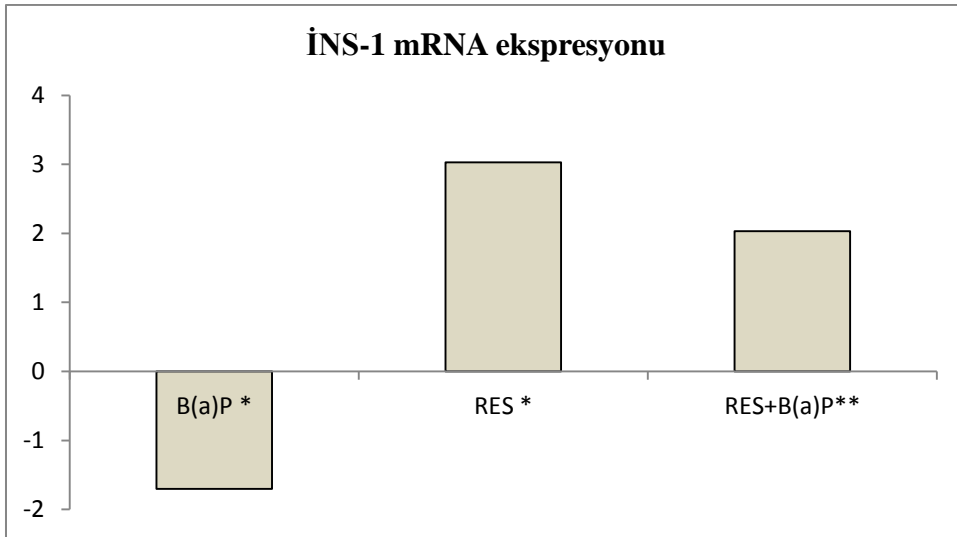
Şekil 3.8. FOXO-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



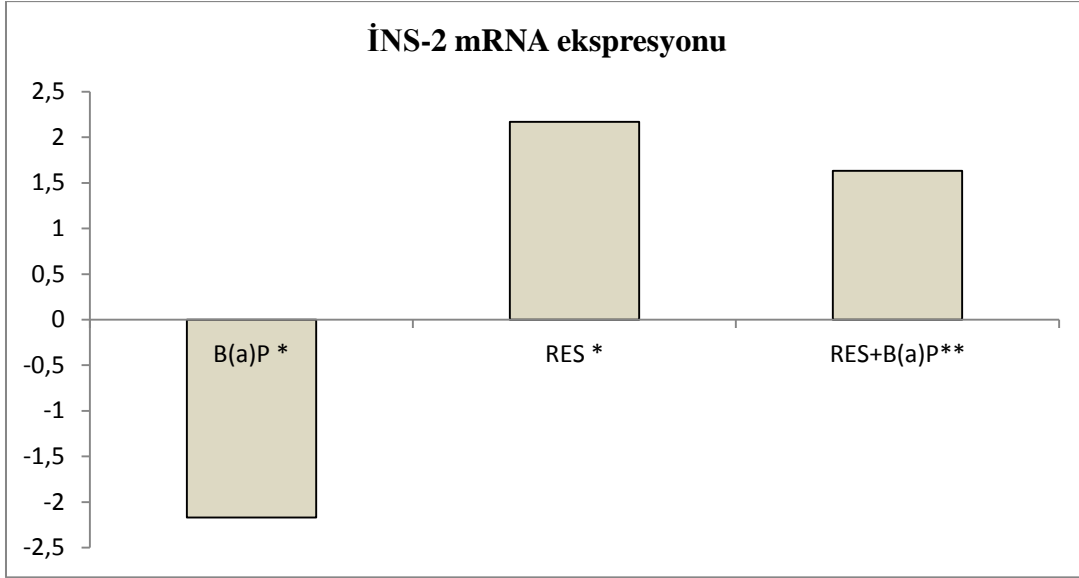
Şekil 3.9. PDX-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



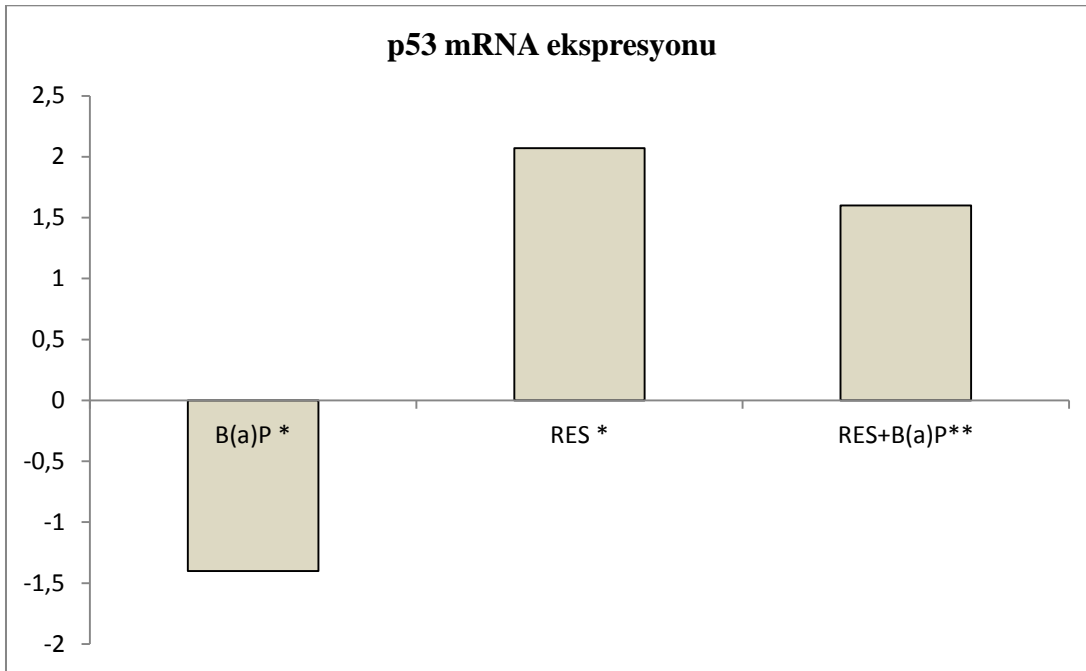
Şekil 3.10. SIRT-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



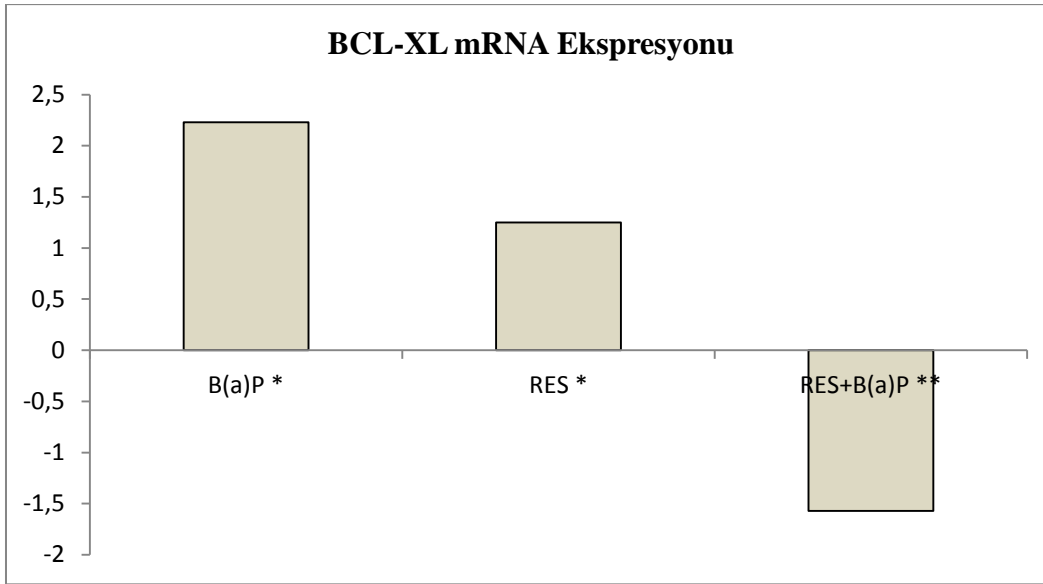
Şekil 3.11. İNS-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



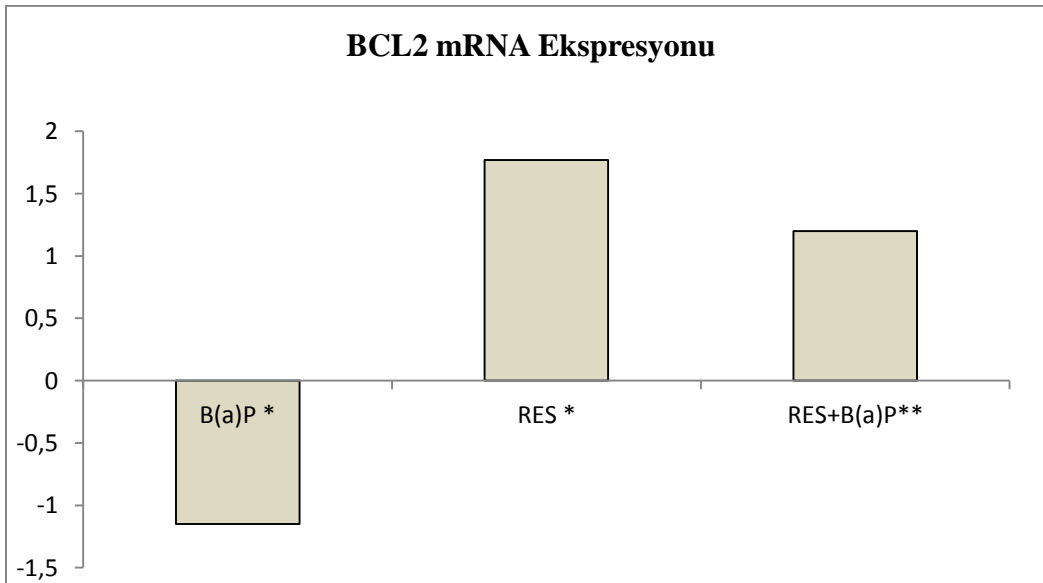
Şekil 3.12. İNS-2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



Şekil 3.13. p53 geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



Şekil 3.14. BCL-XL geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.



Şekil 3.15. BCL-XL geninin mRNA ekspresyon düzeyi. *: Kontrol grubuna göre karşılaştırma, **: B(a)P grubuna göre karşılaştırma.

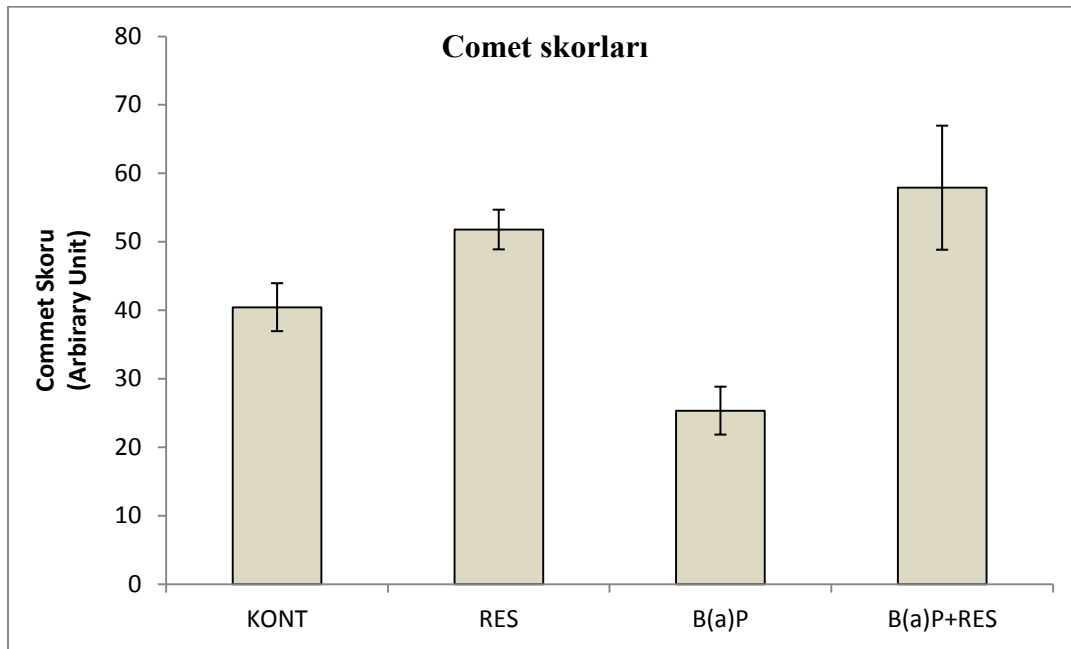
3.4. Comet Assay Verileri

DNA hasarını belirlemek için yapılan bu yöntemde, floresan mikroskopta her lamda rastgele seçilmiş 100 hücre incelenir ve görsel skorlama yapılır. DNA hasar düzeyini belirlemek için her bir hücreye (kuyruk göçü, kuyruk momentini, kuyruk yoğunluğu ve baş çapı gibi parametreler yönünden) verilen 0 ile 400 arbitrary unit (AU) arasında değişen skorlar ile değerlendirme yapıldı. Bu değerlendirmeler sonucunda en yüksek DNA hasarına sahip grubun B(a)P+RES grubu olduğu; en düşük DNA hasarının ise B(a)P grubunda olduğu belirlendi (Tablo 3.4 ve Şekil 3.16).

Tablo 3.4. Comet skorları.

Grup	KONT	RES	B(a)P	B(a)P+RES
Comet Skoru (AU)	40,44±3,5 ^a	51,78±2,9 ^a	25,33±3,5 ^b	57,89±9,06 ^a

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı üstlü ifadeleri içeren ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).



Şekil. 3.16. Comet skorları.

4.TARTIŞMA

Benzo(a)piren molekülü hava kirleticilerin başlıcalarından olup birçok yanma reaksiyonuna müteakip oluştuğu bilinmektedir (Tafeeva ve ark. 2015). Hava kirliliğinin ise tip 2 diyabet ile yakından ilgili olduğu yapılan son çalışmalarda ortaya çıkarılmış durumdadır (Esposito ve ark. 2015). Bu bağlamda benzo(a)piren molekülünün INS-1E (832/13) pankreas beta hücrelerine uygulanması sonucunda ilgili hücrelerde oksidatif stres, antioksidan savunma ve insülin sentezi üzerine etkileri ile; hücre proliferasyonu ve apoptozla ilişkili olarak, sorumlu genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine ve DNA kırılmalarına olan etkilerini ve güçlü bir antioksidan, antikanserojen ajan olan resveratrolün koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

Benzo(a)piren metabolizması kanser oluşumunda etkili olan çok sayıda reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı miktarda üretilmesine neden olmaktadır. Bu ROS'lerinden bazılarının hücre içinde çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri için ikincil haberci olarak rol oynayarak tümör gelişimi prosesinde etkili oldukları bilinmektedir (Sunderasan ve ark., 1995). Reaktif oksijen türlerinin, direkt olarak membran lipidleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlattığı rapor edilmektedir (Rajendran ve ark., 2008).

Glutasyon'un yapısındaki tiyol grupları aracılığıyla intrasellüler alanda redoks potansiyeli yüksek bir bölge sağlayarak hücreleri oksidatif hasarlara karşı koruduğu bilinmektedir (Aksoy, 2002; Memişoğulları, 2005). Literatürde benzo(a)piren uygulamalarında GSH'ın kontrol gruplarına nazaran istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük çıktığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2015a). Çalışmamızda da benzer şekilde, kontrol grubuna nazaran Benzo(a)piren uygulanan grupta GSH miktarında azalma gözlenmiştir. Bu durum, artan lipid peroksidasyonuna bağlı olarak üretilen peroksit radikallerinin detoksifiye edilmesi sürecinde GSH'ın aşırı miktarda kullanılmasıyla açıklanabilir. Keza, çalışmamızda benzo(a)pirenin beta hücrelerinde toplam antioksidan kapasiteyi önemli düzeyde düşürdüğünün tespit edilmiş olması bu durumu desteklemektedir.

Resveratrolün oksidatif hasara karşı koruyuculuğunun incelendiği çalışmalar ele alındığında GSH düzeylerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Sakr ve ark., 2015). Çalışmamızda da literatür verilerine paralel olacak şekilde resveratrol uygulaması sonunca INS1E(832/13) beta hücrelerinde kontrol grubuna göre; resveratrol sonrasında benzo(a)piren uygulanan grupta (B(a)P+RES) da B(a)P grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde GSH artışları tespit edilmiştir. İlaveten resveratrol'ün antioksidan enzimler olan SOD ve glutatyon peroksidaz gibi etki gösterdiği rapor edilmiştir (Spanier ve ark., 2009). Resveratrolün bu etkisi hücre membranlarını oksidatif hasara karşı koruyabilme yeteneği ile açıklanabilir (Vardi ve ark., 2009).

Güçlü antioksidan özelliği ile biyolojik etkileri ön plana çıkan resveratrolün lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı zararlı etkileri önlediği bilinmektedir (Frankel ve ark., 1993; Wang ve ark., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda resveratrolün NO sentezini uyardığı ve iNOS ekspresyonunu artırdığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir (Giovannini ve ark., 2001; Naderali ve ark., 2000). Bu etkilerine ilaveten resveratrolün, NO'e benzer şekilde inflamasyonu ve trombosit agregasyonunu önleyici ve ayrıca damar genişletici etkilere de sahip olduğu görülmüştür (Ray ve ark., 1999; Naderali ve ark., 2000). Ayrıca kan NO düzeylerini doza bağımlı olarak artırdığı rapor edilmiştir (Hung ve ark., 2000). Bu çalışmada da, literatüre uyumlu bir şekilde beta hücrelerinin NO düzeylerinin hem RES grubunda KONT grubuna göre hem de B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre önemli düzeyde arttığı görülmüş, bu etkinin literatürde de belirtildiği üzere iNOS aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan değişik çalışmalarda resveratrolün diyabetten korunmada ve hastalığın değişik komplikasyonlarını hafifletmede etkili olduğu rapor edilmektedir. Deneysel diyabet oluşturulan ratlarda resveratrolün metabolik değerleri düzelttiği, kan glukoz ve trigliserit düzeyini azalttığı; insülineminin etkisini azalttığı tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2004; Cai ve ark., 2005). Bu bildirimlerle uyumlu olacak şekilde, bu çalışmada da resveratrol verilen RES grubunda KONT grubuna göre istatistik anlamlı düzeyde; B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre ise istatistik anlamlı olmasa da yüksek insülin düzeylerine rastlanmıştır. Bu sonuçlar, literatürde resveratrolün beta hücrelerinde insülin sentezi ve/veya sekresyonu üzerine olumlu etkilediği yönündeki bilimsel verileri destekleyici sonuçlardır.

Kong ve ark. (2015) sekiz hafta boyunca yüksek yağlı diyetle besledikleri ratlarda kontrol grubuna nazaran daha düşük bir insülin sekresyonu ve glisemik kontrol bozukluğuna rastlamışlardır. Tedavi ajanı olarak kullandıkları resveratrolün sekiz haftalık kullanımı sonucu glisemik kontrolün yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda düzeldiği ve insülin seviyesinin normaleştiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, önceki çalışmadakine benzer şekilde, resveratrolün SIRT1 geninin ekspresyon düzeyini artırmak yoluyla bu etkiyi göstermiş olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, söz konusu literatür verilerini destekler niteliktedir.

Zucker diyabetik ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, SIRT-1 gen aktivatörlerinin glukoz homeostazisinde önemli rol oynadığı, yağ, kas ve karaciğer dokularında insülin duyarlılığını olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, SIRT-1 aktivasyonunun yaşlılığa bağlı gelişen hastalık durumlarının tedavisinde ve tip 2 diabetes mellitus için yeni tedavi yaklaşımlarında umut vaat ettiği ifade edilmiştir (Moynihan ve ark., 2005).

Liu ve ark. (2015b), insan umbilikal veni endotelial hücre hatları olan EA.hy926 hücrelerinde yaptıkları çalışmada resveratrolün SIRT1 geni mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna nazaran 1.6 misli artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar resveratrolün anti-inflamatuvar etkinliğini SIRT1 ve AMPK (AMP Activated Kinase) aracılığıyla gerçekleştirmekte olduğu yorumunu yapmışlardır. Çalışmamızda da buna paralel olarak resveratrol uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran mRNA ekspresyon düzeyinde 1,43 misli; B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre ise 1.72 misli artış olduğu saptanmıştır. Bu bakımdan ilgili literatür bilgisinin ışığında resveratrolün antioksidan bir gösterge olan GSH artışına neden olmasının moleküler mekanizmasının altında yatan temel faktörün, SIRT1 geninin mRNA ekspresyon düzeyini artırmasının olabileceği düşünülebilir.

Sin ve ark. (2015), ratlara resveratrolü SIRT1 inhibitörü olan sirtinol ile beraber ve sirtinolsüz olarak verdiklerinde çarpıcı bir biçimde resveratrolün apoptotik etkinliğinin artırıldığını tespit etmiştir. Yine aynı makalede p53 protein miktarındaki artış üzerine; sirtinol ile beraber resveratrol uygulamanın sirtinolsüz olarak uygulanmasından daha yüksek bir etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda resveratrolün benzo(a)pirenin oluşturduğu

tüm olumsuzlukların bertarafında kullanılabilirliğindeki etkinlik artırılmak istenirse resveratrolün sirtinol ile kombine kullanımının tercih edilmesi yerinde olacaktır. Çalışmamızda resveratrol yalnız başına kullanılmış olsa da p53 geninin ekspresyon düzeyini literatürle uyumlu olacak şekilde KONT grubuna göre 2,07 misli; B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre ise 1,60 misli artırmıştır.

Yapılan bir çalışmada, B(a)P'nin ratların beyin korteks ve hipokampusunda apoptoz indeksini kontrol ratlara göre artırdığı; Bcl-2 gen ekspresyonunu önemli düzeyde baskıladığı rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2011). Bu çalışmada da, literatürle uyumlu bir şekilde B(a)P verilen grupta Bcl-2 gen ekspresyonu 1,15 misli baskılanmıştır.

He ve ark. (2015), fare osteoblast hücreleri olan MC3T3-E1 hücre hatlarında H₂O₂'in indüklediği apoptozisin etkilerini gidermeye yönelik SIRT1 aktivatörü resveratrolü uygulamışlardır. H₂O₂ uygulanması sonucunda SIRT1 ve Bcl2 genleri inhibe edilirken; p53, bax ve caspase 9 genlerinin ise stimüle edildiği tespit edilmiştir. H₂O₂'in bu etkilerine karşı resveratrol'ün hem SIRT1 hem de Bcl2 genlerinin aktivitesini uyardığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde resveratrol uygulanması sonucunda kontrol grubuna nazaran Bcl2 gen ekspresyon düzeylerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artış benzo(a)pirenin neden olduğu Bcl2 gen ekspresyon düzeyindeki azalışın bertarafında da etkili olmuştur. Apoptotik bir gen olan Bcl-XL geninin mRNA ekspresyon düzeyinin Bcl-2 ekspresyonu ile zıt yönde olması ve resveratrol tedavisi uygulanan B(a)P+RES grubunda da 1,57 misli baskılanmış olması, benzo(a)piren ve resveratrolün literatürde belirtilen etkileri ile uyumlu olacak şekilde bu çalışmada da benzer etkileri gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Lee ve ark.'nın (2013), farelerde carboxymethyllysine (CML) ile indüklenmiş pankreas hasarı üzerine krasula bitkilerinden bir bitki olan *Graptopetalum paraguayense*'nin %95'lik etanol ekstratlarının (GPE) koruyuculuğu üzerine yapmış oldukları bir çalışmada; pankreatik peroxisome proliferator activated-receptor- γ (PPAR γ) geninin upregülasyonu aracılığıyla PDX-1 geninin aktivitesinin artırıldığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda resveratrol uygulaması ile PDX-1 geninde kontrol grubuna nazaran 1.43 misli; BaP+RES grubunda ise B(a)P grubuna göre 2,33 misli azalış olduğu tespit edilmiştir. Ancak ilginç bir biçimde FoXO1 genin de resveratrol verilen gruplarda 1.43 ve 1,23 misli artışlar tespit

edilmiştir. Hücre proliferasyonunun anlaşılabilirliği açısından ele alınan bu iki genin birbirleriyle çelişen sonuçlarına rağmen İnsülin 1 ve İnsülin 2 genlerinde B(a)P+RES grubunda resveratrol uygulanması sonucunda B(a)P grubuna göre sırasıyla 2,03 ve 1,63 misli artışlar tespit edilmiştir. Gen düzeyindeki bu artışlar insülin hormon sekresyonu düzeylerine de yansımış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Jing ve ark. (2015), muhteviyatında bol miktarda resveratrol bulunduğunu bildirdikleri Japon Madımağı (*Polygonum cuspidatum*) bitkisinin gastrik kanserlerin tedavisinde geleneksel Çin Tıbbı'nda kullanıldığını belirtmektedirler. Araştırmacılar gastrik kanser hücre hatları olan MGC803 hücre hatlarına resveratrol uygulanması sonucunda MTT hücre canlılık testi ile resveratrolün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde tümöral hücrelerin sayısını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde, resveratrol ve sonrasında benzo(a)piren uygulanan grupta (BaP+RES) sadece benzo(a)piren (BaP) uygulanan gruba nazaran istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde MTT verilerinde azalmalar tespit edilmiştir ki bunun da literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Resveratrolün, değişik kanser hücrelerinde DNA kırılmaları ve hücre canlılığı üzerine yapılan bir çalışmada, 5-50 µmol/L dozlarının DNA hasarında artışlara neden olduğunu ve hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir (Tyagi ve ark., 2011). Bu çalışmada da, DNA kırılmalarının değerlendirilmesine kullanılan önemli bir test olan comet skorlarına bakıldığında, resveratrol verilen B(a)P+RES grubunda B(a)P grubuna göre DNA kırılmalarının literatürle uyumlu bir şekilde istatistik anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ

Mutajen ve yüksek derecede kanserojen olan polisiklik aromatik bileşik benzo(a)piren; kömür katranında, otomobil egzozlarının dumanlarında, organik besin ya da maddelerin yanmasından kaynaklanan dumanlarda ve ızgarası yapılmış yiyeceklerde bol miktarda bulunan toksik bir maddedir. İlk defa 20. yüzyılda, yapılan değişik deneysel çalışmalarda, kötü huylu deri tümörlerinin oluşumunda benzo(a)pirenin etkinliği ortaya konulmuştur.

Sigara içenlerde meydana gelen akciğer kanserinin oluşumunda en önemli faktörlerden birinin de benzo(a)pirenin olması, bu toksik maddenin insan sağlığı açısından ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır ki; 1970'li yıllardan beri yapılan çok sayıda araştırmada bu etki bilimsel verilerle ortaya konulmuştur.

Benzo(a)piren'in neden olduğu zararlı etkileri önlemeye yönelik tasarlanmış ve yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genel olarak, tedavi edici ajanların, bu toksik maddenin kanser oluşum mekanizmasındaki etkilerini (hücre proliferasyonu, antikanserojenik gen olan p53 geni mutasyonları, oksidatif hasar vs.) önleme yeteneklerini ortaya koymaya yönelik çalışmalardır. Bu tedavi edici ajanlar içerisinde resveratrolün de önemli bir yer tuttuğu görülmektedir. Benzo(a)piren'in kanserojenik, toksik ya da oksidatif hasar oluşturucu etkilerini önlemede resveratrolün etkinliğini incelemeye yönelik yapılan çok sayıda çalışmaya bakıldığında, çoğunluğunun akciğer kanseri odaklı olduğu, bunun dışında; deri, ovaryum, kolon, retina, karaciğer ve özafagus gibi organ ya da doku üzerine yapılan araştırmaların da yapıldığı görülmektedir. Benzo(a)piren'in pankreas üzerine etkilerini ortaya koymaya ve bu zararlı etkilerini önlemeye yönelik çalışmaların daha sınırlı olduğu literatür taramada anlaşılmıştır.

Bu tez çalışması ile ilk defa pankreatik beta hücrelerinde benzo(a)piren'in etkileri ve resveratrolün bu zararlı etkileri önleme gücünün varlığı incelenmiştir.

Günümüz dünyasının en önemli sorunlarından olan çevresel kirleticilerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin inanılmaz boyutlara ulaştığı bir gerçektir. Yapılan çok sayıda çalışma ile bu kirleticilerin diabetes mellitusun oluşumunda da etkili olduğu ortaya konulmuştur. Çevresel kirleticilerin özellikle Tip 2 diyabet hastalığının oluşumunda önemli bir faktör olduğu bilimsel olarak tespit edilmiştir. Fakat bu kirleticilerin doğrudan pankreas beta hücrelerinin fonksiyonları üzerine etkilerine yönelik bilimsel veriler sınırlı düzeydedir. Bu nedenle, çevresel kirleticiler içerisinde önemli bir yer tutan benzo(a)pirenin pankreas beta hücre fonksiyonu üzerindeki zararlı etkilerinin ve resveratrolün koruyucu yeteneğinin ortaya konulması amacıyla planlanan ve yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçların konu ile ilgili literatüre önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada, benzo(a)piren'in pankreas beta hücrelerinde neden olduğu antioksidan savunma ve oksidatif değişiklikler üzerine resveratrolün etkisine bakıldığında; genel anlamda B(a)P+RES grubunda hem NO düzeylerinin hem de oksidatif stres indeksinin yükselmiş olduğu görülmektedir. NO ile ilgili olarak ortaya çelişkili bilimsel veriler NO'in doku hasarında zararlı mı yoksa koruyucu bir etkiye mi sahip olduğu yönünde tartışmalara neden olmaktadır. NO'in fizyolojik düzeylerde, hidrojen peroksit ve süperoksit radikali gibi reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını önleyebildiği bilinmektedir. Buna ilaveten NO'in hidrojen peroksit, alkil hidroperoksitler ve ksantin oksidaz aracılı hücre ölümüne karşı koruyucu role sahip olduğu da bilimsel olarak kanıtlanmıştır. NO'in lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisine benzer şekilde, metal/peroksit esaslı oksidatif reaksiyonları hafifletmesi şeklindeki etki mekanizmasının memeli hücrelerinde oksidatif hasarı sınırlayabileceği yönünde bilimsel açıklamalar da dikkate alındığında, bu çalışmada resveratrolün, pankreas beta hücrelerinin maruz kaldığı B(a)P toksisitesinde koruyucu rol oynadığı düşünülebilir. Keza, NO'in bu kimyasal ve biyokimyasal özelliklerine ilaveten; lökosit adhezyonundaki etkisinde olduğu gibi, oksidatif değişiklikleri ya da oksidatif hasarı sınırlandıran hücresel ve fizyolojik prosesleri modüle edebileceği yönünde bilimsel açıklamalar ve bu çalışmadan elde edilen sonuçlar NO'in çok yönlü biyolojik özelliklerini ve oksidatif strese karşı faydalı yönünün olabileceğini göstermektedir.

Çevresel kirleticilerin tip 2 diyabet prevalansının artışında önemli oldukları son bilimsel verilerle ortaya konulmuştur. Bu etkilerini pankreas beta hücrelerinin fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri ile gerçekleştirmektedirler. Bu olumsuz etkileri insülin sekresyonunda azalma şeklinde ortaya çıkmaktadır ki bu etki daha çok uzun süreli maruziyet sonucunda görülür. Bu çalışmada beta hücrelerinin hücre içi insülin seviyeleri B(a)P

grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Bu sonuç, çevresel kirleticilerden olan B(a)P'nin pankreas beta hücre fonksiyonunu bozduğunu göstermektedir.

Resveratrol uygulaması sonucunda hem hücre içinde hem de medyumda insülin konsantrasyonunda meydana gelen artışlar, resveratrolün pankreas beta hücrelerini B(a)P toksikasyonuna karşı koruyucu ya da toksikasyonda tedavi edici etkisini göstermektedir. Bu etkisini, değişik çalışmalarla da ortaya konulan SIRT-1 gen ekspresyonunu uyarması ile meydana getirdiği düşünülmektedir.

Hücre proliferasyonu ilişkili genlerden olan Foxo-1 ve PDX-1 genleri resveratrol tedavisinden farklı şekillerde etkilenmişlerdir. Foxo-1 geninin inaktivasyonu, Pdx-1 geninin aktivasyonu ve hücre proliferasyonu anlamına gelmektedir. Bu çalışmada tam tersi olacak şekilde gerçekleşen, Foxo-1 aktivasyonu ve Pdx-1 inaktivasyonu, B(a)P toksikasyonuna maruz kalan hücrelerde resveratrol etkisiyle hücre proliferasyonunun baskılandığını göstermektedir. Bu etki B(a)P'nin karsinogenik etkisine karşı resveratrolün koruyucu özellik gösterdiği şekilde yorumlanabilir. Benzer şekilde, kanser gelişiminde önemli olan ve kanserli hücrelerin apoptotik yolağa girememesinin temel nedeni olan p53 geni inhibisyonu bu çalışmada da beta hücrelerinde B(a)P maruziyeti sonrasında ortaya çıkmış; resveratrol uygulaması ise bu etkiyi tersine çevirerek önemli bir apoptotik etki oluşturmuştur. Bu açıdan bakıldığında, B(a)P maruziyetine bağlı oluşabilecek karsinogeneziste resveratrolün koruyucu ya da tedavi edici bir ajan olarak önemli bir etki gösterebileceği söylenebilir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlardan hareketle, resveratrolün, pankreas beta hücrelerinde benzoapiren toksikasyonuna bağlı olarak meydana gelebilecek hücre fonksiyon bozulmalarına, oksidatif değişikliklere ve karsinogenetik genlerle ilişkili olarak ortaya çıkabilecek olumsuz etkilere karşı korunmada ya da tedavi edilmesinde çok önemli bir terapötik ajan olabileceği söylenebilir. Resveratrolün bu etkilerinin ortaya konulması, kendinden zengin besin maddeleri ile beslenme kültürünün çevresel kirleticilerin neden olabileceği olumsuz etkileri önlemede ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Resveratrol'den zengin besinlerin önemi bu yönüyle bir kere daha bilimsel verilerle ortaya konulmuştur. Yapılabilecek daha ileri çalışmalar ile resveratrolün bu etkilerinin altında yatan hücre ya da moleküler mekanizmaların aydınlatılması mümkün olabilecektir.

ÖZET

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon Bileşiği Benzo(a)piren'in Neden Olduğu Pankreas Fonksiyon Bozukluğu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin INS1-E (832/13) Beta Hücre Hattında İncelenmesi

Diyabet günümüz dünyasının en önemli sorunlarından birisidir. Tüm yaş gruplarında ve her iki cinsiyette giderek artan bir prevalans göstermektedir. Hastalık çok sayıda ve farklı organ ve sistemleri etkilemesi nedeniyle çok önemli bir sağlık sorunudur. Uluslararası diyabet federasyonunun verilerine göre bu hastalık dünya nüfusunun %8,3'ünü etkilemekte olup 382 milyon olan bu sayının 2035 yılında 592 milyon olacağı öngörülmektedir. Aynı kuruluş, yaklaşık 183 milyon kişinin de bu hastalıktan habersiz olduğunu ileri sürmektedir.

Çevresel kirleticilerin çok sayıda kronik hastalıkta önemli bir etken olduğu bilinmektedir. Bu çevresel kirleticiler ajanların glukoz metabolizmasında bozulmalara, insülin direncine ve tip 2 diyabete neden olduğu değişik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile, çevresel kirleticiler içerisinde önemli bir yer tutan; akciğer, deri, ovaryum, kolon, retina, karaciğer ve özafagus gibi çok sayıda organ ya da dokuda karsinogenik ve diğer zararlı etkileri yapılan değişik çalışmalarla ortaya konulan Benzo(a)piren'in pankreas beta hücrelerinde hücresel ve moleküler düzeyde zararlı etkilerinin ortaya konulması ve bu zararlı etkileri üzerine resveratrolün iyileştirici özelliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada rat pankreas INS-1E beta hücre hattı kullanılmıştır. HücrelerE kültür işlemleri sonrasında uygun sayıya ulaşıldıktan sonra önce resveratrol (80 µM) uygulaması (48 saat), sonrasında benzo(a)piren (20 µM) uygulaması (24 saat) yapılmıştır. İnkubasyonlar sonrasında toplanan hücrelerde oksidatif stres, insülin sekresyonu (hücre ve medyumda), hücre canlılığı, hücre çoğalması ve apoptozis yönünden biyokimyasal ve moleküler analizler yapılmıştır.

B(a)P uygulaması sonucunda NO düzeylerinde artış olurken, resveratrolün bu artışı daha da ilerlettiği görülmüştür. B(a)P tarafından düşürülen TAS, resveratrol tedavisi ile yükselmiş; enteresan bir şekilde TOS düzeyleri de resveratrol uygulaması ile artış göstermiştir. TAS ve TOS düzeyleri dikkate alınarak hesaplanan OSI değerlerinde ise önemli bir değişiklik saptanmamıştır. GSH düzeyleri ise B(a)P tarafından düşürülürken, resveratrol ile kontrol değerlere yakın bir düzeye yükseltilmiştir. Beta hücre fonksiyonları ile ilişkili olarak mRNA ekspresyon düzeyleri incelenen İns-1, İns-2 ve SIRT-1 genleri resveratrol tedavisi sonrasında uyarılmışlardır. Hücre içi ve sekrete edilen (medyum) insülin seviyeleri resveratrol etkisiyle artış göstermiştir. Resveratrol tedavisi ile hücre çoğalması ile ilişkili genlerden olan Foxo-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi artarken; Pdx-1 geninin mRNA ekspresyon düzeyi ise azalmıştır. B(a)P, p53 geni mRNA ekspresyonunu baskılamış, resveratrol ise B(a)P'nin bu etkisini tersine çevirerek ilgili genin mRNA ekspresyon düzeyini artırmıştır.

Bu çalışma ile ilk defa pankreatik beta hücrelerinde benzo(a)piren'in etkileri ve bu etkileri üzerine resveratrolün koruyucu yönü in vitro olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, resveratrolün pankreas beta hücrelerinde B(a)P'nin oksidatif değişiklikler, fonksiyonel bozukluklar ve karsinogenetik etkilerine karşı korunmada etkili bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Benzo(a)piren, beta hücre fonksiyonu, INS1-E beta hücresi, pankreas

SUMMARY

Investigation of preventive effects of resveratrol against pancreatic dysfunction induced by polycyclic aromatic compound benzo(a)pyren in INS1-E (832/13) beta cell line

Diabetes is one of the most important problems in the world today. In all age groups and both sexes show a growing prevalence. This disease is a very important health problem due to affects many different organs and systems. According to data from the International Diabetes Federation, this disease affects the 8.3% of the world's population (382 million) and this is estimated to be 592 million in 2035. The same organization suggests that approximately 183 million people is unaware of this disease.

Environmental pollutants are known to be an important factor in many chronic disease. It has been well established that, environmental pollutants had deleterious effects on glucose metabolism, and caused insulin resistance and type 2 diabetes. With this investigation, it was aimed to investigate the effects of benzo(a)pyrene, a carcinogenic agent in so many organs or tissues such as lungs, skin, ovarium, colon, retina, liver and oesophagus, on pancreatic beta cells and treatment effects of resveratrol.

In this study, rat pancreatic INS-1E beta cell line was used. After reaching the appropriate number of cells culture operations by cell culture, benzo(a)pyrene (20 μ M, 24h) application have been made after resveratrol (80 μ M, 48h) application. After incubations oxidative stress, insulin secretion (in cell and in medium), cell viability, cell proliferation and apoptosis were analysed in cells by biochemical and molecular techniques.

B(a)P application resulted in NO increase and resveratrol also increased this level of NO. Resveratrol increased the TAS levels decreased by B(a)P, and TOS levels were also increased by resveratrol interestingly. OSI levels determined with TAS and TOS levels, has no significant change between groups. GSH levels were decreased by B(a)P while resveratrol increased its' level to control level. mRNA expression levels of beta cell functions related genes INS-1, INS-2 and SIRT-1 were increased by resveratrol treatment. Insulin levels in cell and in medium were increased after resveratrol treatment. mRNA expression level of FOXO-1 gene was increased while PDX-1 was decreased by resveratrol treatment. B(a)P suppressed the mRNA expression of p53 gene, but resveratrol increased.

The effects of B(a)P on pancreatic beta cells and the protective effects of resveratrol on this cells were investigated in vitro with this research firstly. The results obtained from this research showed that oxidative changes, functional impairment and carcinogenetic effects of B(a)P in pancreatic beta cells could be blocked by resveratrol.

Key words: Benzo(a)pyren, beta cell function, INS1-E beta cell, pancreas

KAYNAKLAR

- AKSOY Y. (2002). Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T Klin J Med Sci*; **22**:442-448.
- BAE S., LEE E.M., CHA H.J., KIM K., YOON Y., LEE H., KIM J., KIM YJ., LEE H.G., JEUNG H.K., MIN Y.H., AN S. (2011). Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cells*. **32(3)**:243-249.
- BERTAZZI P.A., CONSONNI D., BACHETTI S., RUBAGOTTI M., BACCARELLI A., ZOCCHETTI C., PESATORI A.C. (2001). Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol*. **153(11)**:1031-1044.
- BHOR V.M., RAGHURAM N., SIVAKAMI S. (2004). Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol*. **36(1)**:89-97.
- BONNER-WEIR S. (2000). Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. **141(6)**:1926-1929.
- BORDONE L., MOTTA M.C., PICARD F., ROBINSON A., JHALA U.S., APFELD J., MCDONAGH T., LEMIEUX M., MCBURNEY M., SZILVASI A., EASLON E.J., LIN S.J., GUARENTE L. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*. **4(2)**:e31. Erratum in: *PLoS Biol*. 2006 **4(9)**:e295.
- BRADFORD M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**:248-54.
- BUETLER E., DUBON O., KELLY B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione, *J Lab Clin Med* **61**:882-888.
- BUTLER A.E., JANSON J., BONNER-WEIR S., RITZEL R., RIZZA R.A., BUTLER P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. **52(1)**:102-110.
- CAI D., YUAN M., FRANTZ D.F., MELENDEZ P.A., HANSEN L., LEE J., SHOELSON S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB, *Nat. Med.*, **11**:183-190.
- CHEN Z., JIN K., GAO L., LOU G., JIN Y., YU Y., LOU Y. (2010). Anti-tumor effects of bakuchiol, an analogue of resveratrol, on human lung adenocarcinoma A549 cell line. *Eur J Pharmacol*. **25;643(2-3)**:170-179.
- CHOUCROUN P., GILLET D., DORANGE G., SAWICKI B., DEWITTE J.D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutat Res*. **478(1-2)**:89-96.
- COLLINS A.R., MA A.G., DUTHIE S.J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. *Mutat Res*; **336**:69-77.

- DEFRONZO RA, FERRANNINI E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. **14(3)**:173-194.
- DELANEY C.A., DUNGER A., DI MATTEO M., CUNNINGHAM J.M., GREEN M.H., GREEN I.C. (1995). Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol*. **50(12)**:2015-2020.
- DELİBAŞ N., KILINÇ İ. (2003). İnsulin ve Gliklazid Tedavisinin Streptozotosin Diabetik Rat Hipokampuslarında Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. *Türk Biyokimya Klinik Dergisi*, **1(1)**:33-39.
- DENIZOT F., LANG R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immun Meth*. **89**: 271–277.
- EIZIRIK D.L., POULSEN T.M., (2001). A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta cell apoptosis, *Diabetologia*, **44**:2115-2133.
- EREL O., (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, **37(2)**:112-119.
- EREL O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin Biochem*, **38(12)**:1103-1111.
- ESPOSITO K., PETRIZZO M., MAIORINO M.I., BELLASTELLA G., GIUGLIANO D. (2015). Particulate matter pollutants and risk of type 2 diabetes: a time for concern? *Endocrine*, DOI 10.1007/s12020-015-0638-2.
- FRANKEL E.N., WATERHOUSE A.L., KINSELLA J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, **341(8852)**:1103-1104.
- GELBOIN H.V. (1980). Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev*. **60(4)**:1107-1166.
- GIOVANNINI L., MIGLIORI M., LONGONI B.M., DAS D.K., BERTELLI A.A., PANICHI V., FILIPPI C., BERTELLI A. (2001). Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys, *J.Cardiovasc. Pharmacol* **37**:262-270.
- GREEN L.C., WAGNER D.A., GLOGOWSKI J., SKIPPER P.L., WISHNOK J.S., TANNENBAUM S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. **126(1)**:131–138.
- HALİFEOĞLU İ., KARATAŞ F., ÇOLAK R., CANATAN H., TELO S. (2005). Tip 2 Diyabetik Hastalarda tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. *Fırat Tıp Dergisi*, **10(3)**:117-122.

- HARRIS M.I., FLEGAL K.M., COWIE C.C., EBERHARDT M.S., GOLDSTEIN D.E., LITTLE R.R., WIEDMEYER H.M., BYRD-HOLT D.D. (1998). Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, pp.1988-1994. *Diabetes Care*. **21(4)**:518-524.
- HE N., ZHU X., HE W., ZHAO S., ZHAO W., ZHU C. (2015). Resveratrol inhibits the hydrogen dioxide-induced apoptosis via Sirt 1 activation in osteoblast cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. **79(11)**:1779-1786.
- HENRIKSEN G.L., KETCHUM N.S., MICHALEK J.E., SWABY J.A. (1997). Serum dioxin and diabetesmellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*. **8(3)**:252-258.
- HUNG L.M., CHEN J.K., HUANG S.S., LEE R.S., SU M.J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res.*, **47(3)**:549-555.
- HUNT J.V., SMITH C.C., WOLFF S.P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. **39(11)**:1420-1424.
- JING X., CHENG W., WANG S., LI P., HE L. (2015). Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep*. doi: 10.3892/or.2015.4384.
- KANETO H, KAJIMOTO Y, MIYAGAWA J, MATSUOKA T, FUJITANI Y, Umayahara Y, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y, YAMASAKI Y, HORI M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*. **48(12)**:2398-2406.
- KAVAK S. (2008). Roziglitazonun Diyabetik Sıçan Papiller Kalp Kasının Mekanik ve Elektriksel Aktiviteleri Üzerine Etkisi (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Adana.
- KESAVULU M.M., RAO B.K., GIRI R., VIJAYA J., SUBRAMANYAM G., APPARAO C. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract*. **53(1)**:33-39.
- KIM J.K., FILLMORE J.J., SUNSHINE M.J., ALBRECHT B., HIGASHIMORI T., KIM D.W., LIU Z.X., SOOS T.J., CLINE W., O'BRIEN W.R., LITTMAN D.R., SHULMAN G.I. (2004). PKC θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance, *J. Clin. Invest*. **114**:823-827.
- KODE A., RAJENDRASOZHAN S., CAITO S., YANG S.R., MEGSON I.L., 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 Lung Cell Mol Physiol*, **294**: 478-488.
- KONG W., CHEN L.L., ZHENG J., ZHANG H.H., HU X., ZENG T.S., HU D. (2015). Resveratrol supplementation restores high-fat diet-induced insulin secretion dysfunction by increasing mitochondrial function in islet. *Exp Biol Med (Maywood)*. **240(2)**:220-229.

- LEE B.H., LEE C.C., CHENG Y.H., CHANG W.C., HSU W.H., WU S.C. (2013). Graptopetalum paraguayense and resveratrol ameliorates carboxymethyllysine (CML)-induced pancreas dysfunction and hyperglycemia. *Food Chem Toxicol.* **62**:492-8.
- LIU Y., WU Y.M., ZHANG P.Y. (2015a). Protective effects of curcumin and quercetin during benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **19(9)**:1736-1743.
- LIU Z., JIANG C., ZHANG J., LIU B., DU Q. (2015b). Resveratrol inhibits inflammation and ameliorates insulin resistant endothelial dysfunction via regulation of AMP-activated protein kinase and sirtuin 1 activities. *J Diabetes.* doi: 10.1111/1753-0407.12296.
- LONGNECKER M.P., DANIELS J.L. (2001). Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes. *Environ Health Perspect.* **109 Suppl 6**:871-876.
- MATHIS D., VENCE L., BENOIST C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature.* **414(6865)**:792-798.
- MEMİŞOĞULLARI R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*; **3**:30-39.
- MORI K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **101(5)**:451-454.
- MOYNIHAN K.A., PLUEGER M.M., BERNAL-MIZRACHI E., FORD E., CRAS-MÉNEUR C., PERMUTT M.A., IMAI S. (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. **2(2)**:105-117.
- NADERALI E.K., DOYLE P.J., WILLIAMS G. (2000). Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs. *Clin. Sci. (Lond.)*, **98(5)**:537-543.
- NARAYAN K.M., GREGG E.W., FAGOT-CAMPAGNA A., ENGELGAU M.M., VINICOR F. (2000). Diabetes--a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Res Clin Pract.* **50 Suppl 2**:77-84.
- OYADOMARI S., KOIZUMI A., TAKEDA K., GOTOH T., AKIRA S., ARAKI E., MORI M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest.* **109(4)**:525-532.
- OYADOMARI S, TAKEDA K, TAKIGUCHI M, GOTOH T, MATSUMOTO M, WADA I, AKIRA S, ARAKI E, MORI M. (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98(19)**:10845-10550.
- OZSOY-SACAN O., KARABULUT-BULAN O., BOLKENT S., YANARDAG R., OZGEY Y. (2004). Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var *cicla*) on the liver of the diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68(8)**:1640-1648.
- PFAFFL M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29(9)**:e45.

- PICARD F., KURTEV M., CHUNG N., TOPARK-NGARM A., SENAWONG T., MACHADO DE OLIVEIRA R., LEID M., MCBURNEY MW., GUARENTE L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. **429(6993)**:771-776. Erratum in: *Nature*. 2004 **430(7002)**:921.
- PRENTKI M., NOLAN C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. **116(7)**:1802-1812.
- RAJENDRAN P., VENUGOPAL R., EKAMBARAM G., AADITHYA A., SAKTHISEKARAN D. (2008). Rehabilitating activity of mangiferin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis. *Asian J Biochem*, **3**:118-125.
- RAMSEY K.M., MILLS K.F., SATOH A., IMAI S. (2008). Age-associated loss of Sirt1 mediated enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in beta cell-specific Sirt1-overexpressing (BESTO) mice. *Aging Cell*. **7(1)**:78-88.
- RAY P.S., MAULIK G., CORDIS G.A., BERTELLI A.A., BERTELLI A., DAS D.K. (1999). The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury, *Free Radic. Biol. Med* (**27**):160-169.
- SAINI K.S., THOMPSON C, WINTERFORD C.M., WALKER N.I., CAMERON D.P. (1996). Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int*. **39(6)**:1229-1236.
- SAKR H.F., ABBAS A.M., ELSAMANOUDY A.Z., GHONEIM F.M. (2015). Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J Physiol Pharmacol*. **66(4)**:515-527.
- SASAKI Y.F., TSUDA S., IZUMIYAMA F., NISHIDATE E. (1997). Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay, *Mutat. Res*. **388**: 33-44.
- SIN T.K., YUNG B.Y., YIP S.P., CHAN L.W., WONG C.S., TAM E.W., SIU P.M. (2015). SIRT1-dependent myoprotective effects of resveratrol on muscle injury induced by compression. *Front Physiol*. **6**:293.
- SPANIER G., XU H., XIA N., TOBIAS S., DENG S., WOJNOWSKI L., FORSTERMANN U., LI H. (2009). Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol*; **60 (Suppl. 4)**:111-116.
- STEENLAND K., CALVERT G., KETCHUM N., MICHALEK J. (2001). Dioxin and diabetes mellitus:an analysis of the combined NIOSH and Ranch Hand data. *Occup Environ Med*. **58(10)**:641-648.
- STEFAN Y., ORCI L., MALAISSE-LAGAE F., PERRELET A., PATEL Y., UNGER R.H. (1982). Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, **31(8 Pt 1)**:694-700.

- SUNDARESAN M., YU Z.X., FERRANS V.J., IRANI K., FINKEL T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. **270(5234)**:296-299.
- TAFEEVA E.A., IVANOV A.V., TITOVA A.A., AKHMETZIANOVA I.F. (2015). Air pollutions as a risk factor for the population health in Kazan city. *Gig Sanit.* 94(3):37-40.
- TAMPIOA M., LOIKKANENA J., MYLLYNEN P., MERTANENA A., VAHAKANGASA K.H. (2008). Benzo(a)pyrene increases phosphorylation of p53 at serine 392 in relation to p53 induction and cell death in MCF-7 cells. *Toxicol Lett*, **178**: 152-159.
- TYAGI A., GU M., TAKAHATA T., FREDERICK B., AGARWAL C., SIRIWARDANA S., AGARWAL R., SCLAFANI R.A. (2011). Resveratrol selectively induces DNA Damage, independent of Smad4 expression, in its efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. **17(16)**:5402-5411.
- UNGER R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*. **53**:319-36.
- VARDI N., PARLAKPINAR H., ATES B., CETIN A., OTLU A. (2009). Antiapoptotic and antioxidant effects of β -carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertil Steril*, **92**:2028-2033.
- VASILIU O., CAMERON L., GARDINER J., DEGUIRE P., KARMAUS W. (2006). Polybrominated biphenyls, polychlorinated biphenyls, body weight, and incidence of adult onset diabetes mellitus. *Epidemiology*. **17(4)**:352-359.
- VENKATESWARAN S., PARI L. (2003). Effect of *Coccinia indica* leaf extract on plasma antioxidants in streptozotocin- induced experimental diabetes in rats. *Phytother Res*. **17(6)**:605-608.
- VETTERLI L., BRUN T., GIOVANNONI L., BOSCO D., MAECHLER P. (2011). Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. *J Biol Chem*. **286(8)**:6049-6060.
- WANG J., TAKEUCHI T., TANAKA S., KUBO S.K., KAYO T., LU D., TAKATA K., KOIZUMI A., IZUMI T. (1999). A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*. **103(1)**:27-37.
- WANG Q., XU J., ROTTINGHAUS G.E., SIMONYI A., LUBAHN D., SUN G.Y., SUN A.Y. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.*, **958(2)**:439-447.
- WITHERS D.J., BURKS D.J., TOWERY H.H., ALTAMURO S.L., FLINT C.L., WHITE M.F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*. **23(1)**:32-40.
- WU L., ZHOU L., LU Y., ZHANG J., JIAN F., LIU Y., LI F., LI W., WANG X., LI G. (2012). Activation of SIRT1 protects pancreatic β -cells against palmitate-induced dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. **1822(11)**:1815-1825.

YOSHIOKA M., KAYO T., IKEDA T., KOIZUMI A. (1997). A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*. **46(5)**:887-894.

ZHANG W., WANG X., CHEN T. (2011). Resveratrol induces mitochondria-mediated AIF and to a lesser extent caspase-9-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Mol Cell Biochem*.**354(1-2)**:29-37.

ZHAO J., WANG L.P., NIE J.S., NIU Q. (2011). Effects of benzo(a)pyrene on apoptosis of neuronal cells and expression of Bcl-2 and Bax proteins in rat brain tissue. *Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*, **29(11)**:820-824.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aksaray'da doğdu. 1990 yılında Aksaray Zafer İlkokulu'ndan mezun oldu. Aynı yıl Hazım Kulak Anadolu Lisesi'nde eğitimine başladı. 1994 yılında eğitimine başladığı Aksaray Fen Lisesinden 1997 yılında mezun oldu. 1999 yılında başladığı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü lisans eğitimini 2005 yılında tamamladı.

2005 yılında Aksaray Mutlu Teşhis ve Görüntüleme Merkezinde tomografi teknisyeni olarak çalıştı. 2006 yılında Aksaray'da Karbogaz adlı fabrikada ihracat elemanı olarak görev yaptı ve daha sonra Kalite Güvence Sorumluluğu görevini yürüttü. Eş zamanlı olarak önce Dış Ticaret Uzmanlığı daha sonra da Emlak Komisyonculuğu ve Bilgisayar Operatörlüğü Sertifikalarını aldı. 2008 yılında Aksaray'da Gür Maden isimli fabrikaya ihracat elemanı olarak girdi. 2015 yılı Haziran'ında memuriyete atandı. Halen Maliye Bakanlığı Aksaray Defterdarlığı Milli Emlak Müdürlüğü'nde VHKİ sıfatıyla çalışmaktadır.