

**ŞARAPLARDA *TRANS*-RESVERATROLÜN
HPLC YÖNTEMİ ile
MİKTAR TAYİNİ ve SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**Derya KOCAMAN
Yüksek Lisans Tezi**

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Haziran – 2002**

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 010328**

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Derya KOCAMAN'ın "Şaraplarda *Trans*-Resveratrolün HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini ve Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi" başlıklı Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki, Yüksek Lisans Tezi ...20.06.2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Yrd. Doç .Dr. Bülent ERGUN

Üye : Prof. Dr. Asuman Karakaya

Üye : Yrd. Doç. Dr. Göksel Altıokka

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...12.06.2002..... tarih ve14..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞARAPLARDA *TRANS*-RESVERATROLÜN HPLC YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DERYA KOCAMAN

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Bülent ERGUN

2002

Bu tezde kırmızı şaraptaki flavanoid yapıya sahip bir fenolik bileşik olan *trans*-resveratrolün HeLa (serviks adenokarsinoma) hücreleri üzerinde nötral kırmızısı boyama tekniği ile TNF testi ve direk sitotoksosite testi uygulanarak sitotoksitesini incelenmiştir. Direk sitotoksosite ve TNF testi sonuçları karşılaştırıldığında *trans*-resveratrolün TNF salınımını inhibe ettiği ve direk sitotoksosite testinde ise ölüm oranlarının doza bağımlı olmadığı görülmüştür.

Çalışmanın ikinci bölümünde Türkiye’de üretilen bazı kırmızı şaraplardaki *trans*-resveratrol miktar tayinleri floresan dedektör kullanılarak HPLC yöntemiyle araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kırmızı şarap, *Trans*-Resveratrol, TNF, Antikanser aktivite, HPLC

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF *TRANS*-RESVERATROL IN WINES BY HPLC METHOD AND INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS

DERYA KOCAMAN

Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmaceutical Toxicology

Supervisor: Assist.Prof.Bülent ERGUN
2002

In this thesis the cytotoxicity of *trans*-resveratrol, a phenolic compound in flavonoid structure present in red wine, was investigated on HeLa (cervix adenocarcinoma) cell line using neutral red dying technique with direct cytotoxicity test and TNF test procedure. When the results obtained from direct cytotoxicity test compared with TNF test results it was observed that *trans*-resveratrol inhibits TNF release and death rate in direct cytotoxicity test is non dose dependent.

In the second part of the study *trans*-resveratrol quantities present in several red wines produced in Turkey was determined by HPLC method using fluorescence detector.

Keywords: Red Wine, *Trans*-Resveratrol, TNF, Anticancer activity, HPLC

TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve tamamlanması aşamalarında değerli bilgileri ile beni yönlendiren ve her zaman bana destek olan tez danışmanım sevgili Hocam, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd.Doç.Dr. Bülent ERGUN'a,

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e, değerli enstitü çalışanlarından Enstitü Sekreteri Zafer YAZICI ve Füsun YUMRUKÇAL'a,

Her zaman yanımda olan Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki sevgili çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Ahmet SARAÇOĞLU ve Sinem ILGIN'a,

Değerli bilgileri ile bana destek olan Yrd.Doç.Dr. Göksel ALTIOKKA, Arş.Gör. Seval KORKMAZ ÇETİN ve Arş.Gör. Erol ŞENER'e,

Sayın Prof.Dr. Tuğrul KURAL ve Doç.Dr. Sadettin DERNEK'e,

Maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme,

Beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşlarım Arş.Gör. İlham ERÖZ, Arş.Gör. Derya AKAR, Arş.Gör. Halide Edip İNCEDAL ve Elif Elem LİF'e

Bana destek olan sevgili Yrd.Doç.Dr. Kadriye BENKLİ ve Tekn. Güray ATKOŞAR'a,

Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu'na,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Arş.Gör. Derya KOCAMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLO ve ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Resveratrolün Kimyasal Yapısı.....	3
2.2. Şaraplardaki Resveratrol Konsantrasyonları.....	3
2.3. Biyoyararlanım, Tolerans ve Etkili Doz.....	6
2.4. Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	7
2.4.1. Antioksidan Aktivite.....	7
2.4.2. Lipid ve Lipoprotein Metabolizmasının Modülasyonu...	9
2.4.3. Antitrombosit Agregasyon.....	9
2.4.4. Vazorelaksan Aktivite.....	11
2.4.5. Antikanser Aktivite.....	11
2.4.6. Östrojenik Aktivite.....	13
2.4.7. Nöral Etkiler.....	13
2.4.8. Diğer Etkiler.....	14
2.5. Üzümde ve Şarapta Resveratrol Oluşumu.....	14
2.6. Tümör Nekroz Faktör (TNF).....	16
2.6.1. TNF Biyokimyası.....	17
2.6.2. TNF- α 'nın Biyolojik Aktiviteleri.....	18

2.7. Resveratrol ile Yapılan Bazı Hücre Kültürü Çalışmaları.....	19
2.8. Reşveratrolle Yapılan Kimyasal Analiz Çalışmaları.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan Hücreler.....	25
3.1.2. Kimyasal Madde ve Çözeltiler.....	25
3.1.3. Kültür Ortamı Çözeltileri.....	25
3.1.4. Kullanılan Aygıtlar.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. <i>Trans</i> -Resveratrol Çözeltisinin Hazırlanması.....	27
3.2.2. İmmünolojik Çalışmalar.....	27
3.2.2.1. Besiyeri Hazırlanması.....	27
3.2.2.2. Hücre Pasajı (Besiyerinin Yenilenmesi).....	28
3.2.2.3. Neubauer Odacığında Hücrelerin Sayılması.....	28
3.2.2.4. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Testi.....	29
3.2.2.5. Direk Sitotoksisite Tayini.....	33
3.2.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Şaraplarda Bulunan <i>Trans</i> -Resveratrol Miktar Tayini.....	35
3.2.3.1. Hareketli Faz.....	35
3.2.3.2. <i>Trans</i> -Resveratrol Standart Numunelerinin Hazırlanması	35
3.2.3.3. Şarap Numunelerinin Hazırlanması.....	35
3.2.3.4. Dedeksiyon	36
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	37
4.1. TNF Testi ve Direk Sitotoksisite Tayini.....	37
4.2. HPLC ile Kırmızı Şarapta Bulunan <i>Trans</i> -Resveratrolün Analizi...	40
5. KAYNAKLAR.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. <i>Trans</i> ve <i>cis</i> resveratrolün (3,4',5-trihidroksi stilben) kimyasal yapıları	3
3.1. Neubauer hücre sayma odacığının bir bölmesi	28
3.2. 96 gözlü plaka	31
4.1. TNF testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi	37
4.2. Direk sitotoksisite testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi	38
4.3. Direk sitotoksisite testi sonuçlarına göre % ölüm oranları	39
4.4. Standart çözelti ve şarap numunelerine ait kromatogram	41

TABLO ve ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Kırmızı şaraptaki resveratrol konsantrasyonları	5
4.1. TNF testinde elde edilen 540 nm’de nötral kırmızısı boyasının optik dansite ortalamaları	36
4.2. Direk sitotoksisite testinde elde edilen 540 nm’de nötral kırmızısı boyasının optik dansite ortalamaları	38
4.3. <i>Trans</i> -resveratrolün kalibrasyon konsantrasyonlarının pik normalizasyonları	40
4.4. <i>Trans</i> -resveratrolün konsantrasyon alan ilişkisi	40
4.5. Kırmızı şaraplardaki <i>trans</i> -resveratrol miktarları	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

COX	: Siklooksijenaz
ED₅₀	: Ortalama etkili doz
FCS	: Fetal buzağı serumu
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoproteinler
LOD	: Dedeksiyon limiti
LOQ	: Tayin limiti
LPS	: Lipopolisakkarit
NEAA	: Esansiyel olmayan aminoasit
NO	: Nitrik oksit
PMN	: Polimorfonükleer
TNF	: Tümör nekroz faktör
UV	: Ultraviyole
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Stilben glikozitleri ve 30 kadar stilben türevinin spermatofitler sınıfındaki bitkilerde sınırlı bir şekilde doğal olarak oluştuğu bilinmektedir [1]. Bu stilbenlerden resveratrol, *Vitis* cinsinde belirlenen ikincil bir metabolittir [2]. *Trans-Resveratrol* ilk olarak 1976'da Langcake ve Pryce tarafından üzüm şarabında (*Vitis vinifera*) tayin edilmiş ve bileşiğin yaprak dokusu tarafından mantar enfeksiyonuna (özellikle *Botrytis cinerea*) karşı cevap olarak veya UV ışımına maruziyette sentezlendiği bulunmuştur [3].

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, kardiovasküler hastalık insidansı ve şarap tüketimi arasındaki ters korelasyon gösterildikten sonra kırmızı şarapta bulunan bileşiklere olan ilgi artmıştır. Elde edilen sonuçlar, diğer alkollü içkilerde olduğu gibi şarapta da korumanın kısmen alkole bağlı olduğunu göstermiştir. Etanol, hemostatik mekanizma yoluyla ve dolaşımdaki yüksek dansiteli lipoproteinleri (HDL) artırarak etki gösterir. Bununla beraber, alkolden başka bileşiklerin de koruyucu etkisi olabileceği düşünülmüştür. Büyük oranda flavanoid yapıya sahip fenolik bileşiklerin biyoaktivitesi ile ilgili çeşitli çalışmalar bu düşüncelyi desteklemiştir. 1992'de Siemann ve Creasy tarafından bu bileşiklerin bulunduğu gösterildiğinde, resveratrole olan ilgi artmıştır. Bu araştırmacılar, resveratrolün kırmızı şaraptaki biyolojik aktif madde olduğunu düşünmüşlerdir. Bunun üzerine resveratrolün özellikleri detaylı bir şekilde incelenmeye başlanmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalar resveratrolün birçok biyolojik aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir [3]:

1. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu
2. Bakır şelasyonu
3. Serbest radikallerin temizlenmesi
4. Eikosanoid sentezinin değiştirilmesi
5. Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
6. Antiinflamatuvar aktivite
7. Vazorelaksan etki
8. Lipid metabolizmasının modülasyonu
9. Antikanser aktivite
10. Östrojenik aktivite

Son yıllarda gerçekleştirilen birçok çalışmada resveratrolün antikanser etkisi incelenmiş ve gösterilmiştir. Üzüm ekstraktı ile resveratrol ve analoglarının antiproliferatif etkileri ile ilgili bulgular ve kanıtlar artmaktadır. Bu durum kronik inflamasyonlar ve neoplastik hastalıkların önlenmesinde ve belki de tedavisinde uygulanabilir. İnflamatuar ve neoplastik sorunların mekanizmalarında çeşitli yollar bulunmaktadır [4].

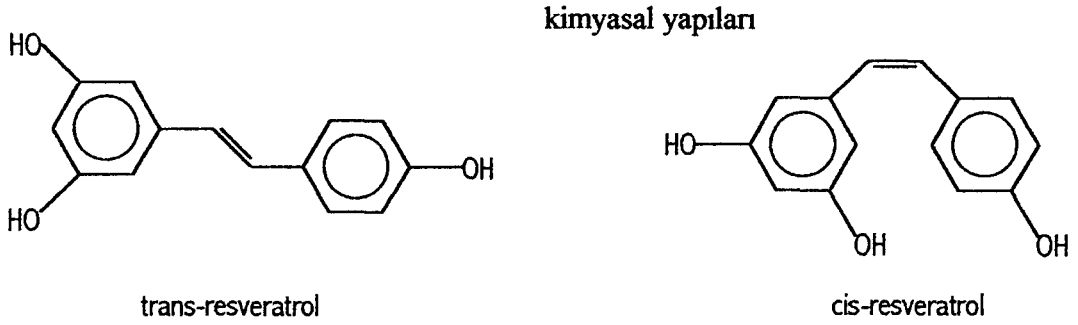
Bu çalışmada Türkiye’de üretilen çeşitli şaraplarda bulunan *trans*-resveratrolün HPLC yöntemiyle miktar tayininin yapılması ve *trans*-resveratrolün antikanser aktivitesinin TNF testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Resveratrolün Kimyasal Yapısı

Stilben, iki karbon köprüsüyle bağlanmış iki fenolik halkadan oluşmuştur ve maksimum absorpsiyon değeri yaklaşık 310 nm'dir [4]. Resveratrol stilben molekülünün 3,4' ve 5 konumlarına hidroksil gruplarının bağlanmasıyla oluşmuş bir yapıdır (Şekil 1). Resveratrolün *cis* ve *trans* izomerik formları bulunmakla birlikte, *cis* izomeri üzüm ekstraktında hiçbir zaman bulunamamıştır. Resveratrol, viniferinler olarak adlandırılan polimerlerin ana molekülüdür [3].

Şekil 2.1: [3] *Trans* ve *cis* resveratrolün (3,4,5- trihidroksi stilben)



2.2. Şaraplardaki Resveratrol Konsantrasyonları

Çeşitli şarap türlerinde resveratrolün varlığı saptanmıştır. Tablo 2'de de gösterildiği gibi çeşitli ülkelerde (ABD, Fransa, İtalya, İspanya, Japonya) üretilen kırmızı şarap analizleri konsantrasyon farklılığına bağlı olarak geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Bunlar üzüm kültürüne, coğrafik kaynağına, şarap tipine, *Botrytis* enfeksiyonuna ve eonolojik (şarap bilgisi) pratiklere bağlıdır.

Resveratrol üzümün kabuğunda üretildiği için, üzüm kabuğuyla temasta fermantasyon zamanı majör faktördür. Maserasyon süresi kısa olan beyaz şaraptaki resveratrol konsantrasyonunun düşük olması bu durum ile açıklanmaktadır [3]. Romero-Perez [5], çeşitli orjinlerden gelen beyaz şaraplarda değişik araştırmacılar tarafından bulunan resveratrol değerlerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda genel olarak 0.1 mg/L'den daha az resveratrol (*cis* + *trans*) tayin

edilmiştir. Araştırmacılar resveratrolün dört monomerik formunun miktar tayinini yapmışlar ve 0.05-1.8 mg/L total stilben miktarı bulmuşlardır. Ortalama değerleri; aglikon için 0.13(*trans*) ve 0.06(*cis*), pseed için 0.16(*trans*) ve 0.12(*cis*) olarak göstermişlerdir. Pembe şarapta resveratrol monomerlerinin seviyesi, kırmızı ve beyaz şarapta bulunan seviyelerin arasındadır. Farklı varyetelerden kullanılan üzüm tiplerinin kabukları ile maserasyon zamanı da şarabın resveratrol içeriğini etkilemektedir.

Jeandet [3], aynı süre maserasyona tabi tutulmalarına rağmen, kırmızı üzümünden yapılan Pinot noir'in resveratrol oranının beyaz üzümünden yapılan Chardonnay'dan daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Pinot noir üzümlerinin nispeten ince olan kabuğu, bu üzümleri *Botrytis* enfeksiyonunun ve UV ışığının travmatik etkilerine karşı daha duyarlı hale getirebilir. Jeandet ve ark., %10 oranında *Botrytis* enfeksiyonuna uğramış üzümlerden, kalite etkilenmeksizin, yüksek oranda resveratrol içeren şarap üretilebileceğini bulmuştur. Bunun tersine, *Botrytis*'den %40-80 oranında etkilenmiş üzümlerden elde edilen şarapların en az düzeyde resveratrol taşıdığı bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonucu, yüksek oranda *Botrytis* istilası sonucu oluşan resveratrolün, mantarların ekzosellüler enzimleri tarafından degregasyona uğratılabileceği şeklinde açıklamışlardır.

Işık etkisinin olduğu veya ışıktan korunarak toplanan üzümlerden elde edilen bazı şaraplarda, *cis* izomer oranının yüksek olması (total resveratrol oranının %40'dan fazlası) *trans*-izomerin izomerizasyonunun üzüm tanelerinde oluşumundan sonra güneş ışığına maruz kalmasına bağlı olmadığını göstermiştir. Goldberg ve ark., *cis*-izomerin fermantasyon sırasında maya enzimleri tarafından veya viniferinlerden salınarak üretildiğini ileri sürmüştür. Araştırmacılar 450'den fazla ticari şarabı analiz etmiş ve *cis* - *trans* oranı arasında önemli oranda farklılıklar bulmuşlardır. *Trans* izomerin yüksek olduğu şaraplarda *cis* izomerin de yüksek olması, her iki izomerin de konsantrasyonlarının aynı değişkenler tarafından etkilendiğini düşündürmektedir.

Tablo 2.1: [3] Kırmızı şaraplardaki resveratrol konsantrasyonları

<u>Orjin</u>	<u>Resveratrol konsantrasyonları (mg/L)</u>
USA Fransa	Chardonnay, 0.1 ⁽¹⁾ 'e kadar; California<New York Bordeaux, 0.3-0.6
Fransa (Burgundy)	Pinot noir, 0.4-2
USA (California)	Pinot noir, 0.2-0.7 Cabernet Sauvignon, <0.09
Kuzey Amerika, Avustralya, Avrupa	0.1-12 California, Avustralya, İtalya< Oregon,Kanada,Fransa
USA (California) Fransa	<0.02-1.7 (Pinot noir'de en yüksek,5) Beaujolais (Gamay), 3.2-3.6
Fransa	aglikon, 0.5-5; glikozit, 0-14.5 Cabernet franc, Gamay, Grenache<Pinot noir, Mourvèdre, Cabernet Sauvignon
USA (California)	aglikon izomerleri, 0.3-3 (ortalama 1.5)
İspanya	aglikon+piseid izomerleri (<i>trans>cis</i>) 2.5-13.8 R ₄ : Pinot noir, 5.1; Merlot, 4; Grenache, 2.4; Cabernet Sauvignon, 1.4; Trempanillo, 1.3
Avrupa	aglikon izomerleri (<i>trans>cis</i>), Fransa, 3.7-7.1 Beaujolais, Midi, Rhône<Bordeaux, Burgundy İtalya, 1.2<İspanya, Portekiz, 2.8<Orta Avrupa, 3.1 <İsviçre, 6.9
Amerika	Güney Amerika, 1.8<California, 3<Oregon, 6.3
İtalya	Recioto ve Amarone (Verona çevresi), 0.05-0.8
USA (Güneydoğu)	aglikon izomerleri, 0.1-42; Muscadine'de en yüksek (<i>trans</i> , 13.4'e kadar; <i>cis</i> , 31.9'a kadar) tetrahidroksistilben varlığı
Japonya	total stilbenler, 0.8-13.4 (ortalama 4.4); aglikon (ortalama1.8, <i>trans>cis</i>);piseid(ortalama2.5, <i>cis>trans</i>); Pinot noir ve Merlot'da en yüksek konsantrasyonlar
USA (California)	Cabernet Sauvignon, 0.4-2; Pinot noir, 1.2; Merlot, 3.5

⁽¹⁾*Trans*-Resveratrol konsantrasyonu (R₄) tam olarak spesifik değildir.

2.3. Biyoyararlanım, Tolerans ve Etkili Doz

Resveratrolün organizmadaki absorpsiyonu, dağılımı, metabolizasyonu ve etkili dozu ile ilgili bulgular yok denecek kadar azdır. Kırmızı şaraplar çok düşük miktarda ve değişen oranlarda resveratrol içermektedir. Resveratrolün oral olarak alındığında insanlar tarafından ne kadarının absorbe edildiği bilinmemektedir. Bununla birlikte ratlara oral yoldan yaklaşık 80 µg/kg resveratrol içeren kırmızı şarap verilerek gerçekleştirilen deneylerden bazı yaklaşımlara ulaşılabilir. Resveratrolün rat bağırsağından iyi absorbe olduğu ve atılımının yavaş olduğu, çeşitli organlara dağıldığı ve plazmada sıfır seviyesine düştüğünde bile bu organlarda bulunduğu gösterilmiştir. Plazma değeri 60 dakikada pik seviyesine ulaşır ve 240 dakikada sıfır seviyesine inerken, kalp kasında pik konsantrasyonuna 120 dakikada ulaşır ve 480 dakikada sıfır seviyesine iner. Karaciğer bulguları da buna benzerdir. Primer atılım yeri olan böbrekte 720 dakikada sıfır seviyesine iner. Ratlarda gerçekleştirilen diğer bir çalışmada da, maddenin gastrointestinal yoldan iyi absorbe olduğu (yarı ömrü 0.46 saat) ve bir veya iki açık kompartmanlı modelde dağıldığı gösterilmiştir.

Doz/cevap konusunda yapılan bazı çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir. Resveratrol, şaraptaki konsantrasyonuna yakın olan 1.2 mg/L konsantrasyonda plazmaya uygulandığında, bunun insan plazmasında trombosit agregasyonunun inhibisyonu için ortalama etkili doz (ED₅₀) olduğu görülmüştür. İzole edilmiş perfüze rat ince bağırsağı kullanılarak yapılan bir başka çalışmada, resveratrolün bir kısmının glukronidi halinde sistemik dolaşıma girdiği gösterilmiştir. Aynı yöntem kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise resveratrol glukronidin enterositik transfer sırasında β-glukronidaz içeren hücreler tarafından oksidatif stres altında enzimatik yolla uzaklaştırılmak üzere sentezlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, insanlarda oral olarak alınan daha yüksek dozdaki resveratrolün biyoyararlanımının ne kadar olduğu sorusuna cevap vermemektedir. Günlük olarak birkaç litre şarap alımı anlamlı dozlara ulaşılmasını sağlayabilir.

Üzüm ekstraktının veya bileşenlerinin insanlarda koruyucu ve/veya terapötik etkisi için gerekli dozun ne kadar olduğu kesin değildir ve invitro çalışmalardan bu konuda sonuç çıkarmak oldukça zordur. Bazı çalışmalarda üzüm ekstraktının antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir. Sonuç olarak 600 mg üzüm ekstraktı, baskın olarak proantosiyanidinler, 20 genç insanda serum total antioksidan aktivitesini %10 oranında artırmıştır.

İnsan plazma düşük dansiteli lipoproteinlerinin (LDL) invitro oksidasyonu ile ilgili bir çalışmada polifenoller, antosiyanidinler ve proantosiyanidinler içeren üzüm kabuğu ve çekirdeğinden elde edilen ekstraktların iyi antioksidanlar olduğu ve ratlarda tolere edilebilen maksimum dozunun yaklaşık 3.000 mg/kg olduğu belirtilmiştir.

Sütten yeni kesilmiş ratlarda yapılan bir çalışmada 1 mg/kg resveratrolün hastalık yapıcı bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Ratlarda lipid metabolizması üzerine etkileriyle ilgili bir çalışmada ise oral olarak verilen 50 veya 100 mg/kg/gün resveratrolün herhangi bir negatif yan etkisi ve dikkate değer pozitif bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Antineoplastik etkilerinin elde edilebilmesi için, antiinflamatuvar etki için gerekli olan dozdan daha yüksek dozda resveratrole gereksinim olabilir [4].

2.4. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

2.4.1. Antioksidan Aktivite

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu ile, LDL özelliklerinin değişiminin aterosklerozda önemli rol oynadığına inanılmaktadır. Oksidasyon LDL partiküllerinin protein kısmını (apoB) regüle B/E reseptör sistemi ile katabolizmasını bozarak etkiler. Bu nedenle polifenolik bileşikler yönünden zengin besinlerin koruyucu etkilerinin antioksidan özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir [3]. Frankel [6], insan LDL'sine uygulanan *trans*-resveratrolün bakır tarafından katalize edilen oksidasyonun redüksiyonunda etkili olduğunu göstermiştir. 10 µmol/L konsantrasyondaki resveratrol tarafından LDL peroksidasyonu, kırmızı şarabın polifenolik ekstraktına oranla daha fazla inhibe

edilmiştir. Ancak stilbenin antioksidan potansiyeli epikateşin ve kersetine göre daha azdır. Domuz LDL oksidasyonu sırasında poliansatüre yağ asitlerinden degretatif ürünlerin oluşumu ölçüldüğünde, flavanoidler daha iyi bir serbest radikal temizleyicisi iken, *trans*-resveratrolün esas olarak bakırla şelat oluşturarak etki gösterdiği gözlenmiştir. Bakır aracılıklı oksidasyon sırasında resveratrolün flavonoidlere göre daha koruyucu olduğu gözlenmiştir. Konjuge dien oluşumu kinetiği, LDL'ye uzun süreli resveratrol uygulamasının doza bağlı olarak oksidasyon oluşumunu geciktirdiğini göstermiştir.

Bakırla indüklenen oksidasyonda 1.5 µmol/L konsantrasyonda resveratrol ile oksidasyon oluşum zamanının diğer flavonoidlere göre (kateşin, epikateşin, kersetin) iki kat daha yavaş olduğu görülmüştür. Serbest radikal oluşturan bir madde olan AAPH (2,2'-azobis-12-amidino propan dehidroklorür) ile indüklenen oksidasyonda tam tersi sonuçlar elde edilmiştir [7]. Resveratrol aynı zamanda membran lipidlerinin peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Blond ve arkadaşları, non-enzimatik veya NADPH bağımlı peroksidasyonda %50 oranında inhibisyon sağlamak için gerekli konsantrasyonun resveratrol için kersetine göre 3 kat daha az olduğunu göstermiştir. Resveratrol hücre membranını koruyarak oksidatif stresin canlı hücrelerdeki zararlı etkilerini azaltır [3].

Sun ve ark. [8], PC12 hücrelerine (rat adrenal feokromositomo hücreleri) kullanarak demir ve etanol tarafından indüklenen lipid oksidasyonu sırasında resveratrolün etkilerini incelemiştir. Bu hücreler dopaminerjik nöronal hücreler için bir model olarak düşünülmüştür ve ağır metal iyonları ile serbest radikal ataklarına son derece duyarlıdır. Araştırmacılar, resveratrolün hücreleri peroksidatif stres ve doku hasarından koruduğunu göstermiştir.

Trans-resveratrol ve vitamin C ve/veya vitamin E kombinasyonunun hücrelerde bu antioksidanların tek başına gösterdiği etkiden daha fazla koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, resveratrolün sadece antioksidan ve antimitojenik özellikler taşımadığını aynı zamanda hücre ölümünü azalttığı göstermektedir. Resveratrol karaciğeri koruyucu etki de gösterir. Karaciğer fibrozisi gelişiminde kritik rol oynayan yıldız hücre proliferasyonunun oksidatif stresten etkilendiği bilinmektedir. Bu hücrelerin aktivasyonunu inhibe edebilen bileşikler karaciğer fibrojenezisini önleyebilir [3].

2.4.2. Lipid ve Lipoprotein Metabolizmasının Modülasyonu

Resveratrolün rat lipid metabolizması için yararlı etkileri olduğu yaklaşık 20 yıl önce bulunmuştur. Toronto Üniversitesi'nde gerçekleştirilen son çalışmalarda normal karaciğer parankima hücrelerinin fonksiyonlarının çoğunu taşıyan HepG2 insan hepatokarsinoma hücreleri kullanılmıştır. Araştırmacılar, medyumda artan *trans*-resveratrol konsantrasyonuna (50 µmol/L'den fazla) cevap olarak intrasellüler apoB konsantrasyonunda önemli oranda azalma gözlemişlerdir. Bundan başka, kolesterol esterleri ve trigliseritlerin salını düşmüştür, bu da daha az VLDL ve bunun sonucunda daha az LDL üretildiğini düşündürmektedir [1].

Bazı gözlemler, resveratrolün aterosklerozise karşı koruyucu etkisi olduğuna karşı çıkmaktadır. Diyetle hiperkolesterolemi yapılan tavşanlarda, diyetle alınan *trans*-resveratrolün (5 gün boyunca 0.6 mg/kg, 6-60 günler arasında 1 mg/kg) plazmadaki çok yüksek kolesterol içeriğini (normalin yaklaşık 30 katı) düşürmediği ve plazmadan izole edilen LDL'in elektroforetik mobilitisini değiştirmede gösterilmiştir. Resveratrol uygulanan tavşanlarda aortta şiddetli aterosklerotik lezyonlar bulunduğundan aortun cevabı beklenmedik bir durumdur. Başka bir çalışmada, *trans*-resveratrol dişi ratlara günlük olarak yüksek miktarlarda (20-40 mg/kg) enjekte edilmiştir. 21 günlük uygulamadan sonra, lipoprotein profili değişmeden kalmıştır ve serum proteinlerine bağlı lipidlerin bakır aracılıklı peroksidasyonuna karşı hassasiyetinde değişim olmadığı bildirilmiştir [3].

2.4.3. Antitrombosit Agregasyon

Trombosit agregasyonu arasıdonik asitten ekosenoidlerin sentezi ile bağlantılıdır. Potent bir vazodilatör olan Prostasiklin PGI₂ ve proagregant ve vazokonstrüktör ajan olan tromboksan TxA₂ siklooksijenaz (COX) yolağında üretilir. Bundan başka hidroksiasitler (HHT,HPETE ve HETE) ve lökotrienler (LT) lipoksijenaz yolağında üretilir [3]. Kimura [9], *Poliganum* köklerinden izole ettiği stilbenleri kullanarak 10⁻⁶-10⁻³ mol/L konsantrasyonda resveratrolün rat

peritoneal polimorfonükleer lökositlerinde lipoksijenaz ürünlerinin ve TxB_2 'nin (TxA_2 'nin stabil metaboliti) oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu maddeler kemotaktik maddeler ve trombosit agregasyonu oluşumu gibi inflamatuvar proseselerden sorumludur. Bundan başka 10^{-3} mol/L resveratrol araşidonik asit tarafından indüklenen trombosit agregasyonunu inhibe etmiştir.

Son yıllarda sağlıklı insanlardan elde edilen trombositçe zengin plazmada resveratrolün antitrombosit aktivitesi gösterilmiştir. Kollajen tarafından indüklenen trombosit agregasyonu $3.6 \mu\text{g/L}$ *trans*-resveratrol varlığında %50.3 oranında azalmıştır. 1000 kat seyreltilmiş ve 3.6 mg/L polifenol ve $1.2 \mu\text{g/L}$ doğal *trans*-resveratrol içeren kırmızı şarabın kullanıldığı yöntemlerde %42 oranında inhibisyon görülürken, aynı şaraba $1.2 \mu\text{g/L}$ *trans*-resveratrol eklendiğinde bu oran %78'e çıkmıştır. Bu bulgular resveratrol ile kırmızı şarap bileşenleri arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Aynı araştırmacı grubu her iki resveratrol izomerinin antiagregan etkilerini karşılaştırdığında eşit konsantrasyonda *trans* izomerin *cis* izomere göre biraz daha az aktif olduğunu gözlemiştir [10].

Pace-Asciac ve ark. da [3] trombositçe zengin insan plazması kullanmıştır fakat agregasyon, trombin veya ADP ile indüklenmiştir. Bu araştırmacılar, *trans*-resveratrol ve kersetinin gerçekleştirdiği inhibisyonun doza bağımlı olduğunu bulmuşlardır. Trombositçe zengin plazmadan yapılan çalışmalar iki şarabın ve resveratrolce zenginleştirilmiş üzüm suyunun trombositlerin trombinle indüklenen agregasyonuna karşı rezistansını arttırdığını ve TxB_2 içeriğini azalttığını göstermiştir. $TxB_2/12\text{HETE}$ 'nin trombosit oranı resveratrolce zenginleştirilmiş üzüm suyu alımıyla azalırken, ticari meyve suyu uygulamasından sonra artmıştır. Araştırmacılar *trans*-resveratrolün üzüm suyundan biyolojik olarak aktif miktarda absorbe edilebildiğini düşünmektedirler. Polifenollerce zengin kırmızı şarabın herhangi bir etki göstermemesi, şaraptaki en önemli antiagregan maddenin etanol olduğunu düşündürmektedir.

Resveratrol 3-0- β -D-glukopranozidin de trombosit agregasyonu üzerine aktivitesi gösterilmiştir. En yüksek indükleyici aktivite kollojende bulunmuştur, diğer indükleyicilere karşı oluşan cevap şu şekilde sıralanmaktadır: Adrenalin> Araşidonik asit> ADP. Araştırmacılar diğer benzer hidroksitilbenler ve glikozitlerin aktivitesini de incelemiştir. Aktivitenin, hidroksil gruplarının

farklı lokalizasyonuna ve oryantasyonuna ve çifte bağı konfigürasyonuna bağlı olduğu görülmüştür. Stilbenlerin glukozilasyonu aktiviteyi deprese etmiştir [11].

2.4.4. Vazorelaksan Aktivite

Poligamum cuspidatum ve *multiflorum* köklerinden ekstre edilen resveratrol antijenle duyarlılaştırılmış kobaylardan izole edilen trakenin kontraksiyonunu kısmen antagonize etmiştir. Bu durum resveratrolün araşidonik metabolizması üzerine inhibitör etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bir çalışmada, üzüm ürünlerinin kardiovasküler etkilerini denemek amacıyla bunların rat aort halkalarındaki relaksan etkileri karşılaştırılmış ve *trans*-resveratrolün vazorelaksan etkisinin olmadığı bulunmuştur. Buna karşın Chen ve Pace-Asciak, kersetin ve *trans*-resveratrolün kontrakte edilmiş rat aort endotelyumunda nitrik oksit (NO) aracılıklı relaksasyona neden olduğunu gözlemişlerdir. Bileşikler aynı zamanda açılmış aortta NO'den bağımsız vazodilatasyonu da indüklemiştir [3].

2.4.5. Anikanser Aktivite

Japonya'da yapılan bir çalışmada, *Yucca schidigera* ekstraktı bakteri hücrelerinde antimitojenik etki göstermiştir. Resveratrol olarak tanımlanan aktif bileşikteki hidroksil grupları bu aktivite için gereklidir. Bundan başka *Cassia quinquangulata*'dan (Leguminosae) elde edilen resveratrol karsinogenezisin üç ana basamağında kansere karşı kimyasal koruyucu etki göstermiştir. Madde antioksidan ve antimitojen olarak etki göstermiş ve karsinogenlerin detoksifikasyonunu indüklemiştir. Ayrıca, resveratrol esas olarak siklooksijenaz-1'i (COX-1) inhibe ederek ve hidroperoksidaz fonksiyonu ile antiinflamatuvar proseslere aracılık etmektedir. Resveratrol aynı zamanda hücre farklılaşmasını indükleyerek kanser gelişimini inhibe eder. Resveratrolün kemopreventif (kimyasal koruyucu) aktivitesi ile ilgili direk kanıt, maddenin fare deri modelindeki tümörjenezis kadar karsinogen uygulanan fare meme bezlerindeki preneoplastik lezyonların gelişimini inhibe edici aktivitesi tayin edilerek bulunmuştur.

Bunun gibi sentetik *trans*-resveratrol de üç basamaklı kanser gelişiminden sorumlu hücrel prosesleri inhibe etmiştir. Araştırmacılar üç farklı insan göğüs epitelyal hücrelerinde (immortal reseptör-negatif, malign reseptör-negatif ve reseptör pozitif hücreler) resveratrolün etkilerini karşılaştırmıştır. Her üç seride de inhibisyon ve proliferasyonun doza ve zamana bağlı olduğu bulunmuştur. Resveratrol uygulanması canlı hücrelerin sayısını ve eksponensial büyümeyi azaltmıştır. Bu durum resveratrolün hem hormona duyarlı hem de duyarsız göğüs kanserlerinde potansiyel bir kimyasal koruyucu ajan olduğunu göstermektedir. Siklooksijenaz-2 (COX-2) tümörjeneziste önemli olduğundan *trans*-resveratrolün bu enzimin gen ekspresyonunu modüle etme yeteneği araştırmacılar tarafından insan meme ve epitelyal hücrelerinde incelenmiştir [3].

PGE₂ prostaglandin üretimi forbol esteri ile indüklenmiştir. Sonuçta sentetik *trans*-resveratrol protein kinaz C sinyal transdüksiyon yolağını inhibe ederek COX-2 gen ekspresyonu aktivasyonunu suprese etmiştir. Bileşik COX-2 direkt olarak da inhibe etmiştir. İnsan HepG2 hepatoma hücrelerinde resveratrolün arilhidrokarbonları genotoksik metabolitlere dönüştüren enzimlerin ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [12].

Casper ve ark. [3], resveratrolün arilhidrokarbon reseptörünün kompetitif antagonisti olduğunu göstermiştir. Bileşiğin *in vivo* ve *ex vivo* koşullarda mikromolar konsantrasyonlarda etkili olmasından dolayı araştırmacılar, bileşiğin çevresel toksikanlara bağlı inflamatuvar endotelyal hücre hasarını azaltmak için yeterli potansiyeli olduğunu düşünmüşlerdir. Fare lösemi hücrelerinde *trans*-resveratrol hücre proliferasyonundan sorumlu olan ribonükleotid redüktazı inhibe etmiştir. Resveratrol muhtemelen hidroksiüreden daha az toksiktir ve enzimin tirozil radikalinin temizlenmesinde daha aktiftir, ayrıca DNA sentezini inhibe eder. *Trans*-resveratrolün aynı zamanda kemoterapötik bir potansiyeli de vardır.

2.4.6. Östrojenik Aktivite

Trans-resveratrol ve sentetik bir östrojen olan dietilstilbesterol arasındaki yapı benzerliği maddenin östrojenik aktivitesi olabileceğini düşündürmektedir. Gehm ve arkadaşları, östrojen pozitif ve negatif insan göğüs adenokarsinoma hücrelerini kullanarak, resveratrolün diğer etkileri için gerekli olan konsantrasyonlarda (3-10 µmol/L) östrojen reseptörüne bağlanmak için östradiol ile yarıştığını göstermişlerdir.

Resveratrol doğal olarak regüle edilmiş gen ekspresyonunu artırmış ve östrojene bağımlı göğüs kanser hücrelerinin proliferasyonunu stimüle etmiştir. Ancak aynı tipte östrojen pozitif insan göğüs kanser hücrelerinde (MCF-7) daha yüksek konsantrasyonlarda resveratrol (20-160 µmol/L) hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Bir fitoöstrojen olan resveratrol kırmızı şarap tüketimi ile meydana gelen kardioprotektif etkiyi arttırmaktadır. Ancak yine de bu maddeyle meydana gelebilecek beklenmedik etkiler göz önünde bulundurulmalıdır [3].

2.4.7. Nöral Etkiler

Fransa'nın Bordeaux bölgesinde yapılan epidemiyolojik bir çalışma, düzenli olarak kırmızı şarap kullanımının istatistiki olarak nörodejeneratif hastalıkların gelişimini önlediği gösterilmiştir. Düzenli olarak korteksin koku almayla ilgili bölgesine ve hippokampusa toksik etkili olduğu bilinen eksitoksin kainik asit verilen ratlara kronik olarak günlük oral resveratrol uygulamasının bu bölgelerdeki hasarı önlediği gösterilmiştir. Araştırmacılar *in vitro* olarak nöronlardaki ve hippokampustaki iskemik hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisinin yetersiz olduğunu belirtmişlerdir [4].

2.4.8. Diğer Etkiler

Resveratrolün kardiovasküler hastalıkları önleyici etkisi polimorfonükleer lökositlerin fonksiyonlarını ayarlama kapasitesine bağlı olabilir. Bu hücreler hastalığın patojenezisini artırabilir. Polimorfonükleer (PMN) hücrelerin fonksiyonel ve biyokimyasal cevabı üzerine *trans*-resveratrolün etkisi in vitro olarak incelenmiştir. Sonuçlar resveratrolün PMN hücreleri tarafından aktive edilen inflamatuvar medyatörlerin salınımını etkilediğini ve adhezyona bağlı trombojenik PMN fonksiyonlarını azalttığını göstermiştir [13].

Resveratrol gibi doğal olarak oluşan bazı hidrokstilbenlerin gastrik H^+/K^+ ATPaz inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Bu enzim peptik ülser tedavisinde önemli bir hedefdir. Fenolik hidroksil grupları bu aktiviteden sorumludur, fakat komşu hidroksil grupları taşıyan stilbenler en etkili inhibitörlerdir. Resveratrol ve α -viniferin, trozinazın L-dopa oksidaz aktivitesini inhibe eder. Bu enzim lokal hiperpigmentasyon hastalıklarından sorumlu olan melaninin biyosentezinde miktarı sınırlayıcı basamağı katalize eder [3].

2.5. Üzümde ve Şarapta Resveratrol Oluşumu

Üzümde resveratrol sentezinin özellikle kabuk kısmında yer aldığı, meyve etinde ya çok düşük konsantrasyonda bulunduğu ya da hiç olmadığı ifade edilmektedir. Bu durum, üzümün küflenmeye karşı dirençlerinin özellikle kabuk kısmında oluştuğunu göstermektedir.

Üzüm çekirdeğindeki resveratrol miktarı çok fazla araştırılmamıştır. Resveratrolün, *V. vinifera* ve *V. labrusca* üzüm tanelerinin meyve eti kısmında değil, yalnızca kabuk kısmında sentezlendiği bildirilmektedir. Bu üzüm türlerinin aksine, *Muscadinia* alt cinsine giren muscadine (*Vitis rotundifolia*) üzüm çekirdeklerinin yüksek konsantrasyonda resveratrol içerdiği belirlenmiştir.

Üzüm tanelerinin resveratrol içeriği yeşil aşamadan tam olgunluk aşamasına geçiş süresince gittikçe azalmakta ve olgun meyvede neredeyse tamamen yok olmaktadır. Yani, üzüm tanelerinin gelişim aşaması ile üzüm kabuğundaki resveratrol arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır.

Olgunlaşma sırasında resveratrol konsantrasyonundaki azalma, tanelerin olgunlaşma düzeylerinin bir ölçütü olan meyvenin şeker konsantrasyonu ile üzüm kabuğundaki resveratrol miktarı arasındaki negatif korelasyon ($r = -0.857$) ile de belirlenmiştir.

Hasat zamanında hastalığa karşı oluşturulan direnç incelendiğinde yalnızca *Botrytis cinerea* gelişimi ele alınırsa, beklenenin aksine orta düzeyde ya da yüksek düzeyde Botrytis ile enfekte olan bağlarda resveratrol içeriği daha düşük bulunmuştur. Yani az miktarda hastalığın bulunduğu yıllar şaraplarda maksimum resveratrol miktarı ile sonuçlanmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre *Botrytis* enfeksiyonu yüksek miktarda resveratrol içeren şarap üretimi için gereklidir. Ancak hasattan önce aşırı miktarda *Botrytis* gelişiminin şaraptaki resveratrol miktarını azaltabileceği bildirilmektedir. Toplam *cis* ve *trans* resveratrol miktarı *Botrytis*'den %40 ve %80 oranında etkilenen üzümlerden elde edilen şaraplarda en az iken (sırasıyla 2.02 ± 0.5 ve 1.01 ± 0.15 mg/L) sağlıklı üzümlerden ve *Botrytis*'den yalnızca %10 düzeyinde etkilenen üzümlerden üretilen şaraplarda daha fazla miktarda (sırasıyla 2.71 ± 0.24 ve 3.88 ± 0.1 mg/L) belirlenmiştir.

Şarabın olgunlaştırılmasının şaraptaki resveratrol konsantrasyonuna etkisi incelendiğinde, resveratrolün şarapta stabil olduğu görülmüştür. Nitekim bazı olgun şaraplar, taze şaraplara oranla daha yüksek konsantrasyonda resveratrol içermektedir. Örneğin; resveratrol konsantrasyonu 1982'de üretilen şarapta 2.11 mg/L iken 1991'de üretilen şarapta 1.49 mg/L olarak saptanmıştır. Resveratrol üretiminin üzüm varyetesine bağlı olduğu açıktır ve dolayısıyla bunların biyosentezi de genetik kontrol altındadır. Aynı koşullarda yetiştirilmelerine ve aynı işlemlere tabi tutulmalarına rağmen farklı varyetelerden üretilen şarapların resveratrol içeriklerinin farklı olduğu görülmektedir. Kırmızı üzümlerden üretilen şaraplar (Pinot noir), beyaz üzümlerden (Chardonnay blanck) üretilen şaraplara kıyasla yaklaşık 3 kat daha fazla resveratrol içermektedir. Bu sonuç ise küf enfeksiyonuna karşı resveratrol sentezleme üzerine varyete farklılığının önemini ortaya koymaktadır.

Üzüm varyetesinin yanı sıra üzümlerin nasıl yetiştirildiği de şaraptaki resveratrol konsantrasyonu açısından önemlidir. Özellikle yetiştirme periyodundaki hava durumunun büyük rolü olduğu düşünülmektedir.

Trans izomerleri UV ışık altında *cis* formuna dönüşmektedir.

Şarap fermantasyonunun da resveratrol miktarı üzerine etkisi araştırılmıştır. Kabuklar olmaksızın yapılan fermantasyonda resveratrol konsantrasyonunda herhangi bir artış belirlenmemiş, kabuklar ile yapılan fermantasyonda ise resveratrol miktarı artmıştır. Kabuktan ekstrakte olarak şaraba geçen resveratrol miktarı üzüm varyetesine ve kabuk ile temas süresine göre farklılık göstermektedir.

Şarap ve meyve suyu üretiminde renk maddelerinin ekstraksiyonu ve stabilitesini sağlamak, verimi artırmak ve ayrıca durultma amacıyla kullanılan pektolitik enzimler şarap üretiminde *trans*-resveratrol konsantrasyonunda artışa neden olmuştur.

Maserasyon işlemi beklendiği gibi şarapta resveratrol konsantrasyonunun artışı ile sonuçlanmaktadır. Maserasyon işleminden dolayı resveratrol artışı beyaz şaraplarda yaklaşık 10 kat civarında iken kırmızı şaraplarda yaklaşık 13 kat dolayındadır.

Şaraptaki tanenleri ya da pigmentleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılan reçinelerden Polyolar-AT denendiğinde resveratrol konsantrasyonunda önemli düzeyde azalmalar belirlenmiştir [2].

2.6. Tümör Nekroz Faktör (TNF)

Sitokin familyasından Tümör Nekroz Faktör (TNF) TNF- α (Kaşektin) ve TNF- β (Lenfotoksin) olmak üzere iki regülatör faktörden oluşmaktadır. Her iki molekül de aynı reseptörlere bağlanmasına ve benzer biyolojik aktiviteleri indüklemesine karşın sınırlı bir homoloji gösterirler.

2.6.1. TNF Biyokimyası

TNF- α aynı zamanda kaşektin, makrofaj sitotoksik faktör, makrofaj sitotoksin ve nekrosin olarak ta bilinir. Bu isimlerin bazılarında da anlaşıldığı gibi TNF- α 'nın en önemli hücrel kaynakının aktive olmuş makrofajlar olduğu görülmektedir. Fakat TNF- α birçok başka hücre tipleri tarafından da sentezlenir.

İnsanlarda TNF- α 'nın majör hücrel kaynakları:

- Makrofajlar
- NK hücreleri
- Eozinofiller
- Hepatik Kuppfer hücreleri
- Glomeruler mezangial hücreler
- Fibroblastlar
- Polimorfonukleer lenfositler
- Astrositler
- Langerhans hücreleri
- Beyin mikrogial hücreleri
- Değişik transforme hücreler
- B ve T lenfositleri

TNF- α sentezi sadece immün sistem hücreleriyle sınırlanmaz, aynı zamanda beyin de dahil değişik anatomik bölgelerdeki farklı hücreler tarafından da üretilir.

TNF- α üretiminin majör fizyolojik indükleyicileri:

- Lipopolisakkarit
- Mycobacteria
- Antikor-antijen kompleksleri
- İnflamatuar medyatörler
- Bakteriyel enterotoksin
- Çeşitli virüsler
- Parazitler
- Çeşitli sitokinler

- TNF- α (otokrin aktivite)

Bakteriyel lipopolisakkarit en önemli indükleyici olarak görünmektedir ve TNF bu maddenin patofizyolojik etkilerine aracılık eder.

2.6.2. TNF- α 'nın Biyolojik Aktiviteleri

Daha yüksek miktarlarda TNF- α 'nın elde edilebilmesi, bu sitokinin in vivo etkilerinin yanı sıra, in vitro olarak ta incelenmesini kolaylaştırmıştır.

TNF- α tarafından indüklenen majör biyolojik cevaplar:

- Nonspesifik ve spesifik immünite ile çeşitli elementlerin aktivasyonu. Özellikle Gr(-) bakterilere karşı cevap.
- İnflamasyon regülasyonunun indüksiyonu
- Çeşitli tümör hücrelerine karşı selektif sitotoksik aktivite
- Septik şok, kaşeksi ve anoreksi gibi çeşitli patolojik olaylara aracılık

Fakat aşağıdaki gerçekler nedeniyle antikanser bir ajan olarak TNF'e gösterilen ilgi azalmıştır:

- Birçok tümörler TNF'in gerçekleştirdiği harabiyete duyarlı değildir. (Bazı tümör hücreleri TNF'i otokrin bir büyüme faktörü olarak sentezler.)
- Tümör hücre nekrozu TNF'in majör biyolojik aktivitesi değildir.
- Bu sitokin sistemik olarak terapötik dozda uygulandığında genellikle şiddetli yan etkiler gelişir.

Ancak çeşitli şirketler klinik denemelerde TNF'i antikanser ajan olarak denemeye devam etmektedir [14].

2.7. Resveratrol ile Yapılan Bazı Hücre Kültürü Çalışmaları

Resveratrolün antikarsinojenik etki mekanizmasını belirlemek amacıyla birçok hücre kültürü çalışması yapılmıştır.

Mitchell, Zhu ve ark. [15], LNCaP prostat kanser hücrelerinde androjen fonksiyonu üzerine resveratrolün inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Resveratrolün protein veya mRNA seviyesinde değişik androjenler tarafından değiştirilen genleri baskıladığı bulunmuştur. Androjenler tarafından stimule edilen hücre çoğalması ve gen ekspresyonundaki bu inhibisyonun transkripsiyon seviyesinde bulunan AR(androjen reseptörü) içeriğinin redüksiyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu çalışma, resveratrolün prostat kanserine karşı yararlı bir kemopreventif/kemoterapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Gautam, Xu ve ark. [16], fare 32Dp210, L1210 ve insan U937, HL-60 lösemi hücrelerini kullanarak resveratrolün hücre proliferasyonunu inhibe ederek antilösemik etki gösterdiğini bulmuşlardır. Uzun süreli resveratrole maruziyetin lösemi hücrelerinde test edilenden daha yüksek bir IC₅₀ konsantrasyonunda normal hematopoetik progenitor hücrelerin klonal çoğalmasını da inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrolün inhibitör etkisi lösemi hücrelerinde büyük oranda irreversibl iken hematopoetik progenitor hücrelerde kısmen reversibledir. Lösemi hücrelerinin resveratrol tarafından inhibisyonunda nukleozomal DNA fragmentasyonu vardır. Diğer yandan resveratrol normal hematopoetik progenitor hücrelerdeki spontan olarak oluşan apoptotik ölümü indüklemeyi ve artırmaz.

Tsan, White ve ark. [17], resveratrolün THP-1 insan monositik lösemi hücrelerinin çoğalmasını 12 µM ortalama etkili dozda ve doza bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada resveratrolün THP-1 hücrelerinin farklılaşmasını indüklediği ve makrofajlara/monositlere forbol miristat asetat verilerek farklılaşma indüklendiğinde THP-1 hücrelerine toksik etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Damianaki, Bakogeorgou ve ark. [18], hormona duyarlı (MCF7, T47D) ve rezistan (MDA-MB-231) göğüs kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine konsantre edilmiş kırmızı şarap, resveratrol, kersetin, kateşin ve epikateşin gibi purifiye polifenollerin antiproliferatif etkilerini ölçmüşler ve polifenollerin

hormona duyarlı hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak pikomolar ve nanomolar aralığında proliferasyonu azalttığını göstermişlerdir.

Elattan ve Virji [19], resveratrolün SCC-25 (insan oral epitel karsinoma hücresi) hücrelerinin çoğalmasını ve DNA sentezini doza bağlı olarak 10 – 100µM konsantrasyonda inhibe ettiğini göstermişlerdir. 50 µM resveratrol ile 10, 25 ve 50 µM kersetin kombinasyonunun bu bileşiklerin inhibitör etkisinde önemli oranda artışa yol açtığı gözlenmiştir. 1.6 µM resveratrol ve kersetin içeren dilue edilmiş kırmızı şarabın hücre çoğalması, DNA sentezi ve hücre morfolojisindeki değişimler üzerine bu bileşiklerin tek başına veya kombinasyon halinde gösterdikleri etkiden çok daha önemli oranda inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Buna göre resveratrolün tek başına veya kersetinle kombinasyon halinde SCC-25 hücrelerinin çoğalması ve DNA sentezi üzerine inhibitör etkili olduğu ve şarapta bulunan diğer fenolik fitokimyasalların, resveratrol ve kersetinin kanser hücrelerinin çoğalması ve DNA sentezi üzerine inhibitör etkisini önemli oranda artırdığı bulunmuştur.

Nielsen, Ruch ve ark. [20], WB-F344 rat karaciğer epitel hücrelerinde resveratrolün gap-junctional intraselluler iletişim üzerine etkisini incelemişlerdir. Gap-junctional intraselluler iletişimin (GJİİ) inhibisyonu tümör gelişim mekanizmasında önemli rol oynar. 6 saat boyunca 17-50 µM resveratrole maruz bırakılan WB-F344 hücrelerinde GJİİ, solvent verilen kontrol grubuna göre önemli oranda artış göstermiştir. Resveratrol 17-50 µM konsantrasyonda TPA (12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat) ve DDT (dikloro difenil trikloroetan) tarafından GJİİ'nin down regülasyonunu önemli oranda önlemiştir. Sonuç olarak resveratrolün GJİİ'yi artırdığı ve GJİİ'ye etki gösteren tümör promoterleri bulunmuştur. Bu resveratrolün gelişmeyi önleyici ve antikarsinojenik etkisinin mekanizması olabilir.

Babich, Reisbaum ve ark. [21], insan gingival epitel S-G hücrelerinde resveratrolün sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Neoplastik (SCC-25) immortal, nonomalign (S-G ve RHEK-1) hücrelerinin normal insan fibroblast hücrelerine göre resveratrole 1-3 kat daha fazla duyarlı olduğu bulunmuştur. S-G hücreleri 2 gün boyunca 75-150 µM resveratrole maruz bırakıldıktan sonra 3 gün boyunca resveratrol bulunan medyumda bırakılmıştır. 2 ve 3. günler arasındaki toksisite

farklılığının DNA sentezinin inhibisyonuna bağlı hücre çoğalmasının durması ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Hepatik S9 mikrozomal fraksiyonunun bulunması resveratrolün toksisitesini ne arttırmış ne de azaltmıştır.

Chan, Mattiacci ve ark. [22], RAW264.7 fare makrofaj hücrelerinde μM düzeyde resveratrol ve kersetinin iNOS (indüklenebilir NO sintaz) gen ekspresyonu ve NO üretimini baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca hücre dışı bir sistemde fizyolojik koşullarda sodyum nitro pürsit kullanılarak polifenollerin NO temizleyicisi olduğu bulunmuştur. %0.1-0.75 konsantrasyonda alkol varlığının konsantrasyona bağlı olarak üzüm polifenollerinin etkisini artırdığı gözlenmiştir.

Wadsworth ve Koop [23], RAW264.7 fare makrofaj hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada resveratrolün 0.05-0.1 mM konsantrasyonda postranskripsiyonel olarak LPS tarafından indüklenen nitrit salımını azalttığı bulunmuştur. Resveratrol aynı zamanda protein ve TNF- α mRNA'nın bazal seviyesini artırmış ve LPS tarafından indüklenen TNF- α mRNA ve sitokin salınımını yükseltmiştir.

Szende, Tyihak ve ark. [24], insan HT-29, SW-620, HT-1080 tümör hücreleri ve HUV-EC-C endotel hücrelerinde değişik dozlardaki (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resveratrolün etkilerini incelemişlerdir. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonra hücre sayısı, apoptotik ve mitotik indeks ölçülmüştür. Düşük dozlardaki resveratrol (0.1-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hücre proliferasyonunu artırmış, yüksek dozlardaki resveratrol ise (10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hücre sayısındaki değişikliklerle gözlenen apoptozisi artırmış ve mitotik aktiviteyi düşürmüştür. Resveratrol doza bağlı olarak insan tümör ve endotel hücrelerinde proliferatif ve apoptotik aktiviteyi etkilemiştir.

Schneider, Vincent ve ark. [25], CaCo-2 insan kolon kanser hücrelerinin gelişimi ve poliamin metabolizması üzerine resveratrolün etkilerini incelemişlerdir. CaCo-2 hücrelerine 25 μM resveratrol uygulandığında büyümeyi %70 oranında inhibe etmiştir. Hücreler, hücre siklusunun S/G2 geçiş fazında birikmiştir. Sitotoksikite veya apoptozisle ilgili belirti kaydedilmemiştir. Resveratrol kanser gelişiminde artan ve poliamin biyosentezinde anahtar enzim olan ornitin dekarboksilaz aktivitesinde önemli oranda düşüşe neden olmuştur. Bu

durum poliaminlerin resveratrolün antiproliferatif etkilerinden sorumlu olan çeşitli hedeflerden biri olabileceğini göstermektedir.

Nicolini, Rigolio ve ark. [26], paklitaksel verilmiş SH-SY5Y (insan nöroblastoma hücreleri) kültürlerine kırmızı şarap ve üzümde bulunan doğal bir antioksidan olan *trans*-resveratrol eklediklerinde hücre ölümünün önemli oranda azaldığını gözlemişlerdir. *Trans*-resveratrolün nöroprotektif etkisi ne antioksidan kapasitesine ne de paklitaksel tarafından indüklenen tubulin polimerizasyonu ile etkileşmesine bağlıdır. Ancak *trans*-resveratrol paklitaksele maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde oluşan poli-(ADP-riboz)-polimeraz degradasyonunu ve kaspaz 7 aktivasyonunu inhibe edebilir. Bu durumda resveratrol antiapoptotik etkisini bu nöron benzeri hücrelerdeki sinyal yollarını hafifleterek gösterir.

Park, Choi ve ark. [27], insan histiositik lenfoma U937 hücrelerinde resveratrolün antiproliferasyonu ve S fazının durmasını indüklediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar düşük konsantrasyonlardaki resveratrolün (30-60 µM) U937 hücrelerinde S fazında durmayı indüklediğini fakat yüksek konsantrasyonlarda bu etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Kültür ortamından resveratrolün uzaklaştırılması ile U937 hücrelerinin senkronize bir şekilde tekrar hücre siklusuna girdiği bulunmuştur. Bu veriler resveratrolün S fazı durmasına ve reversibl hücre siklusu durmasına neden olduğunu göstermektedir. Bu durum resveratrolün kanser preventiv bir ajan olmasının yanı sıra önemli bir hücre siklusu blokeri olduğunu göstermektedir.

Surh, Hurh ve ark. [28], insan promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde resveratrolün hücre tarafından DNA sentezi yeteneğini ve hücrenin canlılığını azalttığını göstermişlerdir. Resveratrolün antiproliferatif ve büyümeyi inhibe edici etkisi morfolojik ve ultrastrüktürel değişimler, internükleozomal DNA fragmentasyonu ve subdiploid hücre popülasyonunun oranındaki artışla tayin edilebilen apoptotik hücre ölümünün indüksiyonuna bağlıdır. Bu sonuçlar resveratrolün kemoproventiv potansiyelinin yanı sıra bir kanser terapötik etkisinin de olduğunu göstermiştir.

2.8. Resveratrolle Yapılan Kimyasal Analiz Çalışmaları

Gu, Creasy ve ark. [29], şaraptaki resveratrolü analiz edebilmek için kapiller elektroforez metodu kullanmışlardır. Numune hazırlanmasında C₁₈ solid faz kartuşu kullanmışlardır. *Trans* ve *cis* resveratrol için baseline seperasyonu miselli mod kullanılarak yaklaşık 8 dakikada elde edilmiştir. *Trans* ve *cis* resveratrol için dedeksiyon limitleri 0.1 ve 0.15 µmol/L olarak bulunmuştur. Bu yöntem 26 şaraptaki *trans* ve *cis* resveratrol analizi için kullanılmıştır.

Chu, O'Dwyer ve ark. [30], kapiller elektroforezde miseller madde 310 nm UV dedektörü ile resveratrolün dedeksiyon limitini 1.25 µM olarak bulmuşlardır. Bu prosedürü şaraptaki *trans*-resveratrolün direk analizi için kullanmışlardır.

Sakkiadi, Stavrakakis ve ark. [31], 20 µl şarap veya kalibrasyon standardını direk olarak HPLC sistemine vermişler ve elüsyon için su, asetik asit ve metanol kullanmışlardır. Akış hızını 0.6 ml/dk olarak kullanmışlardır. Zero-time'de 280 nm'de, 22. dakikada 257 nm'de, 23.5. dakikada 306 nm'de, 32. dakikadan sonra ise UV ışığında saptamışlardır..

Riberio de Lima, Waffo-Teguo ve ark. [32], 120 şarapta bulunan stilben türevlerini HPLC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bunun için C₁₈ kolonda (4.0x250 mm) ısıyı 30 °C'de tutarak 0.5 ml/dk akış hızında çalışmışlardır. Solvent olarak pH 2.4 olan suda asetik asit (Solvent A) ve %80 MeCN ve %20 Solvent A'dan oluşan (Solvent B) sistemini kullanmışlardır. Gradiet sisteminin verilışı 0. dakikada %100 A, %0 B; 10.dakikada %100 A, %0 B; 20. dakikada %90 A, %10 B; 30. dakikada %80 A, %20 B; 40. dakikada %60 A, %40 B; 45. dakikada %0 A, %100 B şeklinde gerçekleştirilmiştir. 25 µl ekstrakt 45 µm filtreden süzöldükten sonra direk olarak kolona verilmiştir. *Cis*-resveratrol 286 nm'de, *trans*-resveratrol 306 nm'de saptanmıştır.

Revilla ve Ryan [33], fotodiod array sistemi kullanılarak, HPLC ile kırmızı şarabı direk enjekte ederek 15 fenolik bileşiğin tayinini yapmışlardır. Mobil faz olarak perklorik asit ile pH'ı 1.8'e getirilmiş su:asetonitril (95:5) (Solvent A) içinde perklorik asit ile pH'ı 1.8'e getirilmiş su:asetonitril (50:50) (Solvent B) kullanılmıştır. Akış hızı 0.6 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Spektro 250-600 nm

arasında her saniyede kaydedilmiştir. *Trans*-resveratrolün 70.5-71.5 dakikaları arasında 305.3 nm’de maksimum absorpsiyon verdiği gözlemlenmiştir.

Rodriguez-Delgado, Malovana ve ark. [34], fenolik aldehytlar, asitler ve flavanoidleri içeren fenolik bileşiklerin HPLC ile ayırımını literatürde belirtilenden daha kısa sürede gerçekleştirmişlerdir. Floresans dedektörün kullanılması şarap numunelerindeki *trans*-resveratrol, epikateşin, sirinjik asit, vanilik asit ve kateşinin tayininde seçiciliğin ve duyarlılığın artmasını sağlamıştır. Numune hazırlanmasında dietil eter ile pH 2’de sıvı-sıvı ekstaksiyonu yapılmıştır. Bu yöntem şarap numunelerinin analizinde iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır.

Vinas, Lopez-Erroz ve ark. [35], gradient elüsyon ile ters fazlı kolon kullanarak *trans* ve *cis*-resveratrol, kateşin, epikateşin, kersetin ve rutin ayırmasını sağlayan bir ters fazlı likit kromatografi metodu geliştirmişlerdir. Florimetrik dedektör ve fotodiyod array kullanılmıştır. Florimetrik dedektör sisteminin fotodiyod array sistemine göre çok daha yüksek duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. Her iki dedeksiyon sisteminde de tutunma özellikleri UV spektrumu ve pik saflığı indeksi ticari standartlarla karşılaştırılmıştır. Prosedürler değişik tipteki şaraplarda ve sıralardaki polifenolik bileşiklerin tayininde uygulanmıştır

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Hücreler

TNF testinde ve direk sitotoksitenin saptanmasında HeLa epitel benzeri insan serviks adenokarsinoma hücreleri kullanılmıştır. Hücreler Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Makrofaj hücreleri İsviçre albinosu farelerinden (4 – 8 haftalık) elde edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Madde ve Çözeltiler

<i>Trans</i> -resveratrol	(Sigma)
Tiyoglikolat	(Sigma)
Nötral kırmızısı boyası	(Sigma)
Aktinomisin D	(Sigma)
Sodyum hidroksit	(Merck)
Sodyumklorür	(Merck)
Potasyumklorür	(Merck)
Disodyumhidrojenfosfat . 2 H ₂ O	(Merck)
Potasyumdihidrojenfosfat	(Merck)
Asetonitril	(Merck)
Asetik asit	(Merck)
Metanol	(Merck)
Bidistile su*	

* Bidistile su laboratuvarımızda hazırlanmış ve cam şişe içinde saklanmıştır.

3.1.3. Kültür Ortamı Çözeltileri

- RPMI-1640 Medium (2.0 g/L NaHCO₃, L-Glutaminsiz) (Sigma)
- Hepes(1M)(50x)[N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-etanolsülfonikası] (Sigma)
- Mem-Vitamin (100x) (Sigma)

- d. NEAA (100x) Esansiyel olmayan aminoasitler (Sigma)
e. Penisilin/Streptomisin – 10.000U/10.000µg/ml (Biological Ind)
f. L-Glutamin (200mM) (Sigma)
g. FCS – Fetal buzağı serumu (Biological Ind.)
h. Tripsin – EDTA (10x) (Sigma)

a, b ve d sıralamalı çözeltiler buzdolabında (+4⁰C), c, e, f, g, h sıralamalı çözeltiler derin dondurucuda (-70⁰C) saklanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Aygıtlar

- Steril çalışma kabini (Holten)
İnkübatör (Heraeus)
Santrifüj (Biofuge17RS)
Mikroskop (Olympus CK₂)
Eliza cihazı (Biotech EL_x 808)
Otomatik pipetör (Eppendorf)
Doku kültür şişesi (TPP)
96 gözlü plaka (Corning)
Steril pipet (5cc, 10cc ve 25cc)
Steril otomatik pipetör ucu (100 – 1000µL – Eppendorf)
Steril enjektör filtresi (0.22µm ve 0.45µm - Orange Scientific)
Steril santrifüj tüpü (50ml TPP)
Pipet (0.5-10µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl Eppendorf)
12 kanallı pipet (Eppendorf)
LC-10A serisi gradient sıvı kromatografisi (Shimadzu)
LC-10AT gradient donanımlı pompa (Shimadzu)
RF-10A XL floresans dedektör (Shimadzu)
CBM-10A iletişim sağlayan modül (Shimadzu)
20 µL hacimli loop cihazı (Rheodyne)
Luna 3 µ tanecik çapında C₁₈ 150x3.00 mm kolon (Phenomenex)
Pentium 75 işletim sistemli Accura bilgisayar
B-220 ultrasonik banyo ((Branson, CA, USA)

3.2. Yöntem

3.2.1. *Trans*-Resveratrol Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg *trans*-resveratrol 1 ml RPMI-1640 medyumda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, ışıktan korunarak 0°C'nin altında saklanmıştır.

3.2.2. İmmünolojik Çalışmalar

Bu bölümde *trans*-resveratrolün değişik dozlarda makrofaj ve HeLa hücreleri üzerinde, TNF testi ile ve direk olarak sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bütün çalışmalar steril gereçler kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2.1. Besiyeri Hazırlanması

500 ml RPMI-1640 medyum (steril) içine aşağıda belirtilen çözeltiler katılmıştır.

- i) 10 ml Hepes – tampon çözelti (1M)(10x)
- ii) 5 ml Mem-Vitamin (100x)
- iii) 5 ml NEAA (100x)
- iv) 5 ml Penisilin/Streptomisin – 10.000U/10.000µm/ml)
- v) 10 ml L-Glutamin (200mM)
- vi) 50 ml FCS

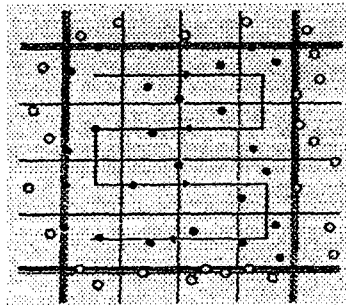
Bütün maddeler 0.22µm çapında enjektör filtresinden süzülerek konulmuştur. FCS ilave edilmeden önce 1 saat 56°C'de su banyosunda inaktive edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 50 ml'lik steril şişelere konularak kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2.2. Hücre Pasajı (Besiyerinin yenilenmesi)

Bu işlem immünolojik deneylerde kullanılan HeLa hücrelerini canlı tutmak için 2 – 3 günde bir rutin olarak yapılmıştır.

- i) İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi hafifçe çalkalanarak, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır.
- ii) Kültür şişesinde kalan serum artıklarını temizlemek için şişeye 5 ml N RPMI-1640 konularak yıkanmış (2 kez) ve yıkama çözeltileri atılmıştır.
- iii) Kültür şişesine 5 – 10 ml tripsin çözeltisi (1/10 oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir) konularak hafifçe çalkalanmış ve 1 dakika dinlendirildikten sonra tripsin çözeltisi pipetle alınarak şişenin ağzı kapatılıp inkübatörde 5 – 10 dakika bekletilmiştir (%5 CO₂, %95 nem ve 37⁰C'de)
- iv) İnkübatörden alınan kültür şişesine 10 – 20 ml kadar besiyeri ilave edilerek çalkalanmış ve 5'er veya 10'ar ml'lik porsiyonlara bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır.
- v) Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem ve 37⁰C).

3.2.2.3. Neubauer Odacığında Hücrelerin Sayılması [36]



Şekil 3.1: [36] Neubauer hücre sayma odacığının bir bölümü

Şekilde Neubauer odacığının 16 küçük bölmeden oluşan bir bölmesi görülmektedir. Her bir bölmenin hacmi 0.1 µl'dir. Siyah noktalar ile gösterilen hücreler sayılmış, beyaz noktalar ise sayılmamıştır. Her biri 16 küçük bölmeden oluşan 4 bölme sayılarak ortalamaları alınmış ve bir bölmeye (0.1 µl'ye) düşen hücre sayısı saptanmıştır.

3.2.2.4. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Testi [37]

Makrofaj hücrelerini elde etme yöntemi

İsviçre albinosu fareye %3'lük tiyoglikolat çözeltisi (RPMI-1640 medyum içinde hazırlanmıştır) i.p. olarak verilmiş ve 4 gün sonra farelerin karın boşluğu açılarak steril bir enjektör ile 5ml soğuk fosfat tamponu (magnezyum ve kalsiyumsuz) farenin karın boşluğuna enjekte edilmiştir. Enjektör çıkarılmadan 5 dakika lavaj yapıldıktan sonra aynı enjektörle verilen tampon çözeltinin yaklaşık 4ml'si geri çekilmiş ve böylece makrofaj hücreleri elde edilmiştir.

Kullanılan fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.56)

- | | |
|---|-------|
| i) NaCl | 8 g |
| ii) KCl | 0.2 g |
| iii) Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O | 1.2 g |
| iv) KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |

Maddeler bir miktar suda çözülüp su ile 1L'ye tamamlanmıştır.

Makrofaj hücre kültürü

- i) Makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltiden yaklaşık 20 µl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında 0.1 µl'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- ii) Bir santrifüj tüpüne alınan tampon çözeltisi santrifüj edilmiştir.

Santrifüj koşulları

Devir sayısı : 1500devir/saniye

Isı : 10 °C

Süre : 10 dk

Fren hızı : 6

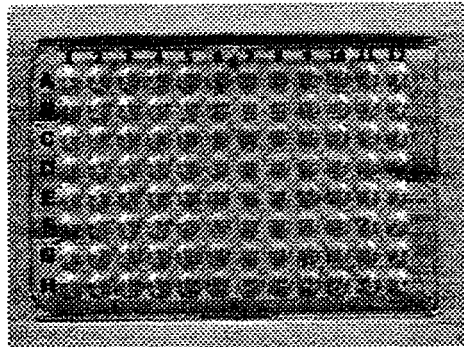
- iii) Santrifüjden alınan makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltinin üst kısmı atıldıktan sonra dibe çöken makrofaj hücrelerinin üzerine hücre sayısı $1.10^6/ml$ olacak şekilde besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır
- iv) Elde edilen makrofaj hücre süspansiyonu her göze 100 μl olacak şekilde plakaya dağıtılarak (1.10^5 makrofaj/100 μl) inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir (%5 CO₂, %95 nem, 37 °C).

HeLa hücrelerinin kültürü

- i) 3.2.2.2.'de belirtilen hücre pasajının dördüncü basamağında inkübatörden alınan kültür şişesine 5 ml besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- ii) Süspansiyon halindeki çözeltiden 20 μl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında bölüm 3.2.2.3.'te açıklanan yöntemle 0.1 μl 'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- iii) HeLa hücre sayısı $2.10^6/10$ ml olacak şekilde besiyeri ilave edildikten sonra kültür şişesi çalkalanmıştır.
- iv) Hücre süspansiyonu plakaya, her göze 100 μl olacak şekilde dağıtılıp (2.10^4 HeLa/100 μl) inkübatörde 20 saat inkübe edilmiştir (%5 CO₂, %95 nem, 37°C).

Makrofaj hücrelerinin üzerine test maddelerinin verilmesi

- i) İnkübatörde 24 saat bekleyen makrofaj kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için plaka ters çevrilerek dökülmüştür.
- ii) Plakada makrofaj hücrelerinin bulunduğu gözlere 100'er µl besiyeri ilave edilmiştir.
- iii) Şekil 3.2.'de görülen plakanın yatay doğrultudaki A sırasındaki gözlerine 100 µl *trans*-resveratrol çözeltisi verildikten sonra; A sırasındaki gözlerden başlayarak ve her defasında 100'er µl alınarak düşey doğrultuda 8 göz aşağıya inilmiş ve böylece basamak şeklinde seyreltme yapılmıştır. Bu işlem sonunda birinci gözde (A-1) 50 µg *trans*-resveratrol/100 µl besiyeri; sekizinci gözde (H-1) 0.406 µg *trans*-resveratrol/100 µl besiyeri olacak şekilde bir konsantrasyon oluşumu sağlanmıştır.
- iv) Plakanın bir gözüne %10'luk LPS çözeltisi ve RPMI-1640 medyum konulmuş ve aynı şekilde seyreltme yapılarak blank hazırlanmıştır.
- v) Üzerlerine test edilecek *trans*-resveratrol çözeltisi verilen makrofaj kültürleri 24 saat inkübatörde tutulduktan sonra (%5 CO₂, %95 nem, 37 °C), üst kısmı HeLa hücrelerine aktarılmıştır.



Şekil 3.2: 96 gözlü plaka

HeLa hücrelerinin boyanması

İnkübatörden alınan plakadaki HeLa hücreleri nötral kırmızısı boyası (%0.1 RPMI-1640 içinde hazırlanan) ile boyanmıştır. Her göze 100 µl nötral kırmızısı verildikten sonra plaka ½ saat inkübe edilmiş ve üzerleri dökülerek test edilecek maddelerin verildiği makrofaj kültürlerinin üst kısımları HeLa hücrelerinin üzerine aktarılmıştır.

Makrofaj kültürlerinin üst kısımlarının HeLa hücreleri üzerine aktarılması

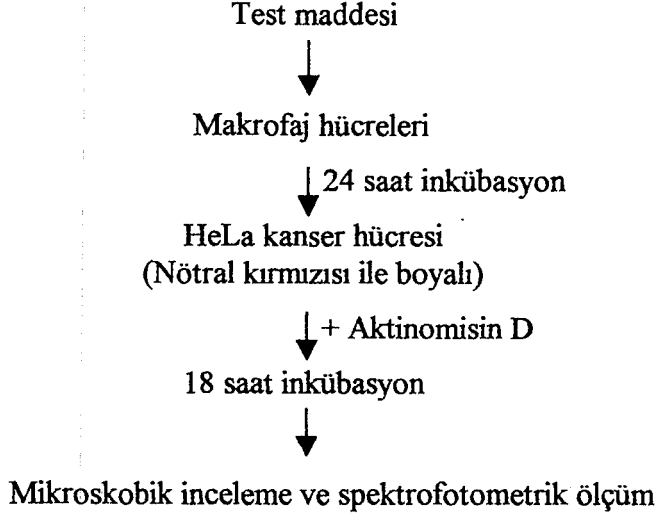
- i) 24 saat sonunda inkübatörden alınan makrofaj kültürlerinin üst kısımları nötral kırmızı ile boyanmış HeLa hücrelerinin üzerine aktarılmıştır.
- ii) Daha sonra her göze 100 µl Aktinomin D çözeltisi verilmiştir. (0.5 µg/göz)
- iii) HeLa hücrelerinin bulunduğu plaka 18 saat inkübe edilmiştir(%5 CO₂, %95 nem, 37⁰C).

Sonuçların değerlendirilmesi

18 saat sonunda inkübatörden alınan HeLa hücrelerini içeren plaka mikroskopta incelenmiş ve ELISA cihazında ölen hücrelerden açığa çıkan boyanın absorbans değerleri okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

TNF testinin şematik gösterimi

TNF testi şema 1’de özetlenmiş olarak verilmiştir.



3.2.2.5. Direk Sitotoksisite Tayini

HeLa hücrelerinin kültürü

- i) 3.2.2.2’de belirtilen hücre pasajının dördüncü basamağında inkübatörden alınan kültür şişesine 5 ml besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- ii) Süspansiyon halindeki çözeltiden 20 µl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında bölüm 3.2.2.3.’te açıklanan yöntemle 0.1 µl’ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- iii) HeLa hücre sayısı $2 \cdot 10^6/10$ ml olacak şekilde besiyeri ilave edildikten sonra kültür şişesi çalkalanmıştır.
- iv) Hücre süspansiyonu plakaya, her göze 100 µl olacak şekilde dağıtılıp ($2 \cdot 10^4$ HeLa/100 µl) inkübatörde 20 saat inkübe edilmiştir (%5 CO₂, %95 nem, 37⁰C).

HeLa hücrelerinin boyanması

İnkübatörden alınan plakadaki HeLa hücreleri nötral kırmızısı boyası (%0.1 RPMI-1640 içinde hazırlanan) ile boyanmıştır. Her göze 100 µl nötral kırmızısı verildikten sonra plaka ½ saat inkübe edilmiştir.

Maddelerin uygulanması

- i) Boyanan hücreler ½ saat inkübe edildikten sonra üzerleri dökülmüş ve her göze 100 µl besiyeri ilave edilmiştir.
- ii) A sırasındaki gözlere 100'er µl *trans*-resveratrol çözeltisi verilmiş ve aşağıya doğru seyreltme yapılmıştır.
- iii) Plaka 18 saat inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, %95 nem, 37°C).

Sonuçların değerlendirilmesi

18 saat sonunda inkübatörden alınan HeLa hücrelerini içeren plaka mikroskopta incelenmiş ve ELISA cihazında ölen hücrelerden açığa çıkan boyanın absorbans değerleri okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Şaraplarda Bulunan *Trans*-Resveratrolün Miktar Tayini

3.2.3.1. Hareketli Faz

Deneyler süresince kullanılacak olan hareketli faz (asetonitril:%5 asetik asit) (25:100) 500 ml hazırlanmıştır. Hazırlanan hareketli faz içerisindeki çözülmüş gazların ve oksijenin uzaklaştırılması için ultrasonik banyoda yarım saat tutulmuştur. Ayırma ve miktar tayini işlemleri bu çözelti ile gerçekleştirilmiştir.

Günlük çalışmalarda deneylere başlamadan önce kolon %75'lik metanolla bir saat yıkandıktan sonra, hazırlanışı yukarıda anlatılan hareketli faz ile yarım saat yıkanarak kolonun şartlanması sağlanmıştır. Deneyler 0.4 ml/dk akış hızında yapılmıştır.

3.2.3.2. *Trans*-Resveratrol Standart Numunelerinin Hazırlanması

12.1 mg *trans*-resveratrol (M_A : 228.2) tartılmış, 160 ml metanol ile çözülmüştür. Su ile 250 ml'ye tamamlanarak 2.12×10^{-4} M (%64 metanolde) konsantrasyonda Stok A çözeltisi elde edilmiştir.

Stok A çözeltisinden 0.1 ml alınıp mobil faz ile 10 ml'ye seyreltilerek 2.12×10^{-6} M konsantrasyonda Stok B çözeltisi elde edilmiştir. Stok B çözeltisinden seyreltmelerle deneyler yapılmıştır. Standart stok çözeltiler alüminyum folyo ile kaplanarak buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2.3.3. Şarap Numunelerinin Hazırlanması

Şaraplar $0.22\mu\text{m}$ çaplı filtrelerden süzümüştür. Süzüntüden 0.25 ml alınarak mobil fazla 25 ml'ye tamamlanmıştır. Yedi değişik şarap örneğinde HPLC yöntemiyle miktar tayini yapılmıştır.

3.2.3.4. Dedeksiyon

Gerçekleştirilen çalışmada dedektör olarak floresan dedektör kullanılmıştır. 324 nm eksitasyon ve 370 nm emisyon dalga boyunda çalışılmıştır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

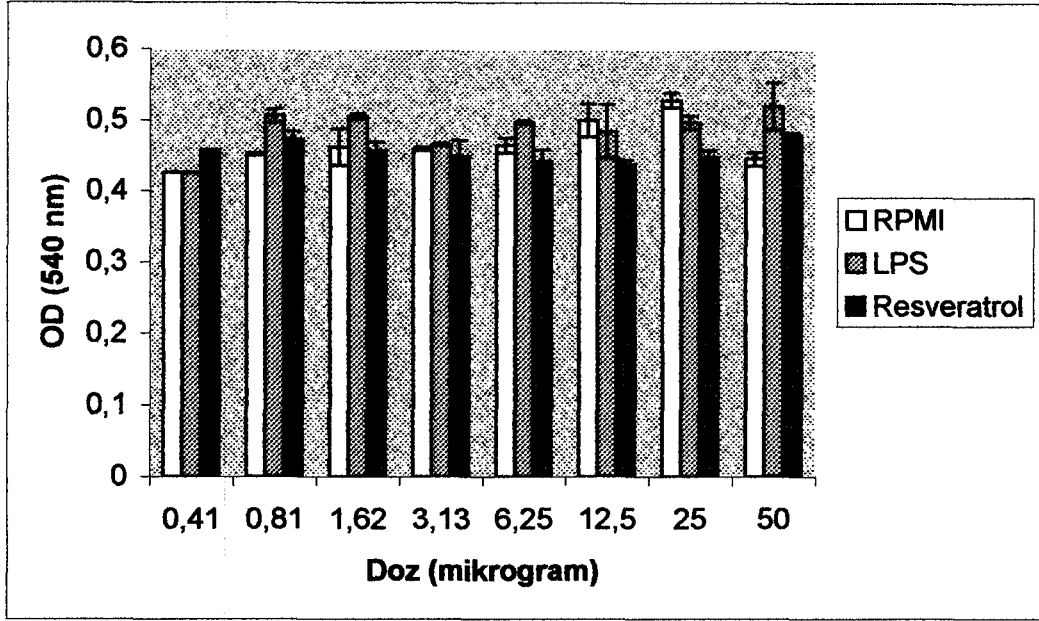
4.1. TNF Testi ve Direk Sitotoksisite Tayini

TNF testinde kullanılan lipopolisakkaritin (LPS) makrofajlardan TNF salgılanmasını stimüle ettiği bilinmektedir [14]. *Trans*-resveratrolün TNF testinde hem RPMI hem de LPS'e göre önemli bir etkisi bulunamamıştır. 12.5 µg ve 0.406 µg dozda hem RPMI hem de LPS'e göre zayıf bir etki bulunmuştur ($P < 0.05$). Elde edilen sonuçlar t testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

Trans-resveratrolün makrofajlardan salınan TNF üzerine direk bir etkisi olmadığı makrofajların üzerinden alınıp HeLa hücreleri üzerine verilen medyumun nötral kırmızısı ölçümleriyle gösterilmiştir. TNF testinde RPMI, LPS ve *t*-resveratrol verilen gözlerde okunan ortalama optik dansiteler çizelge 4.1'de verilmiştir. Optik dansiteler 540 nm'de okunmuştur. Bu değerler ölü hücrelerden salınan nötral kırmızısı boyasının optik dansiteleridir ve beş deneyden elde edilen sonuçların ortalamalarıdır.

Çizelge 4.1: TNF testinde elde edilen 540 nm'de nötral kırmızısı boyasının optik dansite ortalamaları

Doz (µg)	RPMI	LPS (µg)	t-Resveratrol (µg)
50	0.445 ± 0.0145	0.520 ± 0.0419	0.479 ± 0.0228
25	0.528 ± 0.0095	0.497 ± 0.0331	0.448 ± 0.0033
12.5	0.500 ± 0.0103	0.484 ± 0.0095	0.437 ± 0.0091
6.25	0.464 ± 0.0231	0.497 ± 0.0383	0.441 ± 0.0060
3.125	0.459 ± 0.0112	0.465 ± 0.0024	0.449 ± 0.0168
1.615	0.461 ± 0.0020	0.505 ± 0.0020	0.456 ± 0.0219
0.812	0.451 ± 0.0262	0.506 ± 0.0038	0.473 ± 0.0214
0.406	0.425 ± 0.0015	0.425 ± 0.0096	0.457 ± 0.0107



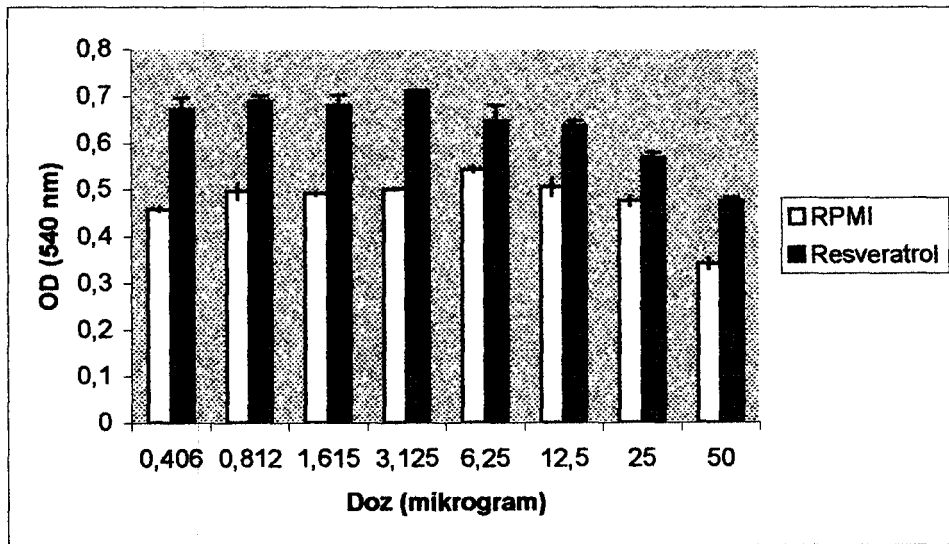
Şekil 4.1: TNF testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi

Trans-resveratrolün direk olarak HeLa hücreleri üzerine uygulanmasıyla hücre ölümünü arttırdığı ve TNF salınımına bağlı olmayan, istatistiki olarak anlamlı oranda ($P < 0.05$) sitotoksosite farkı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar t testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Ancak t-resveratrolün HeLa hücreleri üzerindeki etkisinin doza bağımlı olmadığı tespit edilmiştir.

Direk sitotoksosite testinde RPMI ve t-resveratrol verilen gözlerde okunan ortalama optik dansiteler çizelge 4.2’de verilmiştir. Optik dansiteler 540 nm’de okunmuştur. Bu değerler de ölü hücrelerden salınan nötral kırmızısı boyasının optik dansiteleridir ve beş deneyden elde edilen sonuçların ortalamalarıdır.

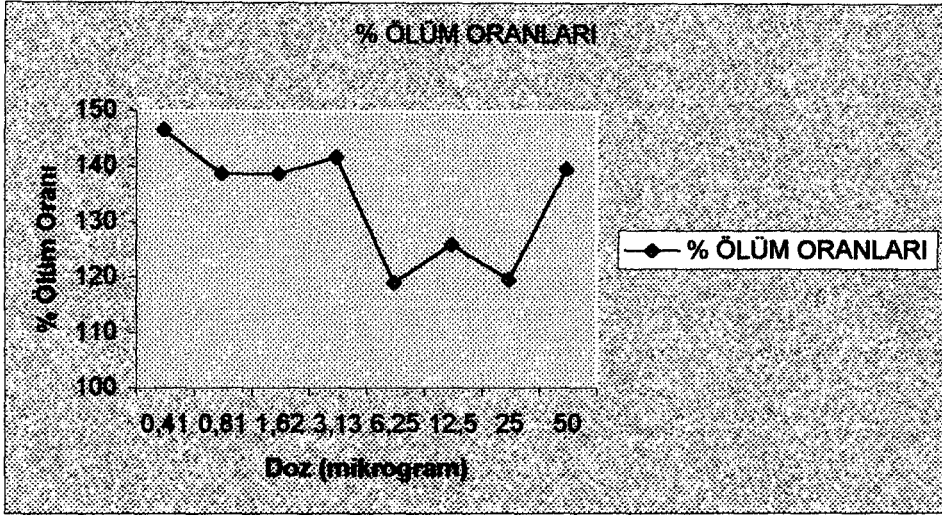
Çizelge 4.2: Direk sitotoksisite testinde elde edilen 540 nm'de nötral kırmızısı boyasının optik dansite ortalamaları

Doz (μg)	RPMI	t-Resveratrol (μg)
50	0.341 \mp 0.0106	0.476 \mp 0.0058
25	0.475 \mp 0.0106	0.568 \mp 0.0110
12.5	0.506 \mp 0.0199	0.637 \mp 0.0103
6.25	0.543 \mp 0.0060	0.646 \mp 0.0343
3.125	0.501 \mp 0.0023	0.710 \mp 0.0020
1.165	0.491 \mp 0.0043	0.681 \mp 0.0215
0.812	0.496 \mp 0.0161	0.688 \mp 0.0111
0.406	0.458 \mp 0.0037	0.671 \mp 0.0242



Şekil 4.2: Direk sitotoksisite testi sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi

Direk sitotoksisite testinden elde edilen sonuçlara göre % ölüm oranları Şekil 4.3'de verilmiştir. Buna göre HeLa hücreleri üzerinde tek başına t-resveratrolün etkisinin doza bağımlı olmadığı, ancak kırmızı şarabın içindeki bir veya birden fazla maddenin sinerjik etki göstermesi sonucu doza bağımlı bir etki oluşabileceği düşünülmektedir. TNF testi sonuçlarıyla direk sitotoksisite sonuçları karşılaştırıldığında ise TNF testi sonuçlarına göre t-resveratrolün TNF salınımını inhibe ettiği düşünülmektedir.



Şekil 4.3: Direk sitotoksisite testi sonuçlarına göre % ölüm oranları

4.2. HPLC ile Kırmızı Şarapta Bulunan *Trans*-Resveratrolün Analizi

Trans-resveratrol stok madde çözeltisi bölüm 3.2.3.2.'de anlatılan yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Doğrusallık aralığının incelenmesi amacıyla stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak değişik konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmış ve HPLC cihazına verilerek tutunma zamanları ve pik alanları tespit edilmiştir. Daha sonra gerekli hesaplamalar yapılarak *trans*-resveratrolün kalibrasyon konsantrasyonlarının pik normalizasyonları hesaplanmıştır. (Şekil 4.4)

Standart Çözelti Konsantrasyonları	Alan	MT(Geliş Zamanı (dk))	Alan/MT
2.12×10^{-7} M (0.05 µg/ml)	35892	13.296	2699.46
3.18×10^{-7} M (0.07 µg/ml)	48799	13.336	3659.19
4.24×10^{-7} M (0.10 µg/ml)	59620	13.357	4463.58
6.36×10^{-7} M (0.15 µg/ml)	103889	13.439	7730.41
8.48×10^{-7} M (0.19 µg/ml)	135242	13.466	10043.22
10.6×10^{-7} M (0.24 µg/ml)	165029	13.476	12246.14

Çizelge 4.3 : *Trans*-resveratrolün kalibrasyon konsantrasyonlarının pik normalizasyonları

Stok çözeltinin stabilitesini sağlamak amacıyla buzdolabında +4°C'de saklanmış ve standart çözeltiler stok çözeltiden taze olarak hazırlanmıştır. Toplam altı konsantrasyon düzeyi için elde edilen piklerin düzeltilmiş alan oranlarının değerlendirilmesi sonucunda elde edilen kalibrasyon eşitlikleri çizelge 4.4'de verilmiştir.

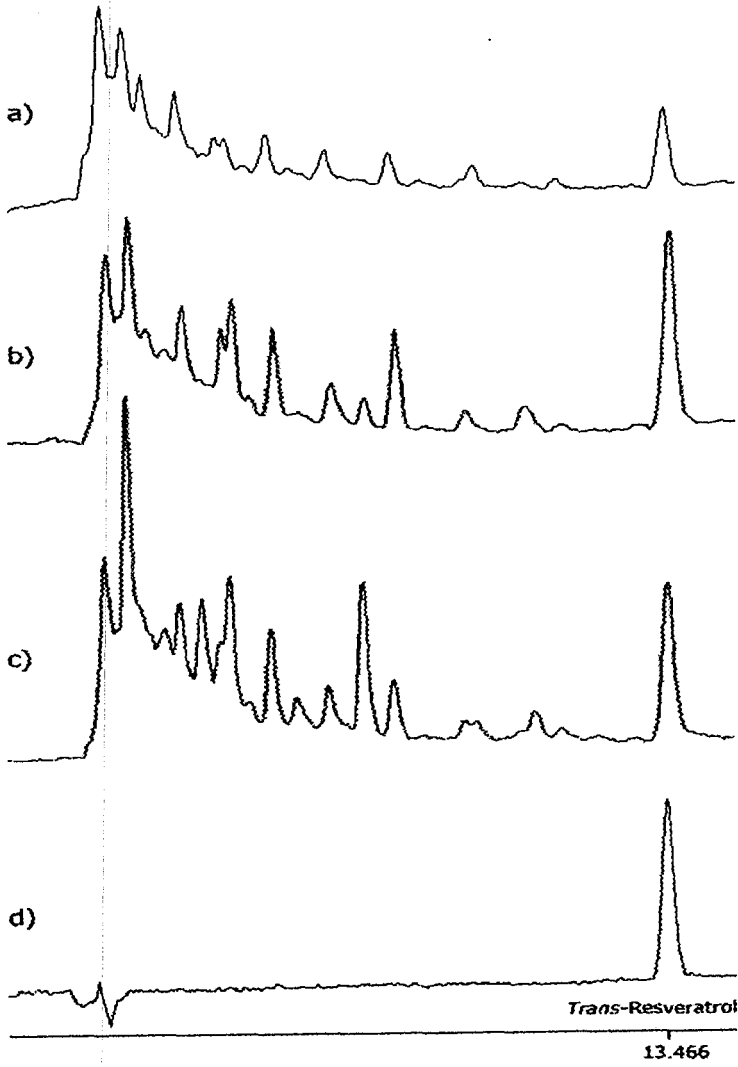
Standart Madde	Konsantrasyon Aralığı (µg/ml)	LOD ng/ml	LOQ ng/ml	Tutunma Zamanı (dk)	Regresyon Eğrisi Denklemleri	Korelasyon Katsayısı (r)
<i>Trans</i> -resveratrol	0.05-0.24	2.80	8.46	13.395 ± 0.0307	$2173.098 + 1.554 \times 10^{11} C$	0.9991

Çizelge 4.4 : *Trans*-resveratrolün konsantrasyon alan ilişkisi

Yöntemin tekrar edilebilirliği sağlandıktan sonra yedi farklı kırmızı şarap numunesi HPLC cihazına enjekte edilerek analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.5'de kırmızı şaraplarda bulunan *trans*-resveratrol miktarları verilmiştir. Şekil 4.4'de *trans*-resveratrolün 8.48×10^{-7} M (0.19 µg/ml) konsantrasyondaki standart çözeltisi ile üç farklı kırmızı şarap numunesine ait kromatogramlar verilmiştir. Kırmızı şarap numunelerinde bulunan *trans*-resveratrolün kullanılan izokratik sistemle, şaraptaki diğer maddelerden son derece iyi ayrıldığı gözlenmektedir.

Numune 1 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 2 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 3 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 4 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 5 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 6 ($\mu\text{g/ml}$)	Numune 7 ($\mu\text{g/ml}$)
8.99	23.25	18.47	26.16	10.20	4.85	10.08

Çizelge 4.5 : Kırmızı şaraplardaki *trans*-resveratrol miktarları



Şekil 4.4 : a) 8.48×10^{-7} M (0.19 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyondaki standart çözeltiye ait kromatogram

b) Numune 1'e ait kromatogram

c) Numune 2'ye ait kromatogram

d) Numune 3'e ait kromatogram

Elde edilen sonuçlara dayanarak, dünyada üretilen kırmızı şaraplara göre Türkiyede üretilen kırmızı şarapların içerdiği *trans*-resveratrol miktarının genel olarak daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Bu değişkenliğin sebebinin üzümün kültürü, üzümün coğrafik kaynağı, şarabın tipi, *Botrytis* enfeksiyonu ve maserasyon süresi gibi birçok etkene bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. SOLEAS, G.J., DIAMANDIS, E.P., GOLDBERG, D.M., *Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?*, *Clinical Biochemistry*, **30**, 91-113 (1997).
2. KARADENİZ, F., *Üzümlerde ve Şaraplarda Resveratrol Oluşumu*, *Gıda*, **25**, 113-119 (2000).
3. FREMONT, L., *Biological Effects of Resveratrol*, *Life Sciences*, **66**, 663-673 (2000).
4. MILOS SOVAK, M.D., *Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review*, *Journal of Medicinal Food*, **4**, 93-104 (2001).
5. ROMERO-PEREZ, A.I., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., WATERHOUSE, A.L., TORRE-BORONAT, M.C., *Levels of Cis- and Trans-Resveratrol and Their Glucosides in White and Rose Vitis vinifera Wines from Spain*, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **44**, 2124-2128 (1996).
6. FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., KINSELLA, C.E., *Inhibition of Human LDL Oxidation by Resveratrol*, *Lancet*, **341**, 1103-1104 (1993).
7. BELGUENDOZ, L., FREMONT, L., LINARD, A., *Resveratrol Inhibits Metal Ion-Dependent and Independent Peroxidation of Porcine Low-Density Lipoproteins*, *Biochemical Pharmacology*, **53**, 1347-1355 (1997).
8. SUN, A.Y., CHEN, Y., JAMES-KRACKE, M., WIXON, P., CHENG, Y., *Ethanol-Induced Cell Death by Lipid Peroxidation in PC12 Cells*, *Neurochemical Research*, **22**, 1187-1192 (1997).
9. KIMURA, Y., OKUDA, H., ARICHI, S., *Effect of Stilbenes on Arachidonate Metabolism in Leukocytes*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **834**, 275-278 (1985).
10. BERTELLI, A.A.E., GIOVANNINI, L., DE CATERINA, R., BERNINI, W., MIGLIORI, M., FREGONI, M., BAVARESCO, L., BERTELLI, A., *Antiplatelet Activity of Cis-Resveratrol*, *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, **22**, 61-63 (1996).

11. ORSINI, F., PELIZZONI, F., VEROTTA, L., ABURJAI, T., *Isolation, Synthesis, and Antiplatelet Aggregation Activity of Resveratrol 3-O- β -D-Glucopyranoside and Related Compounds*, *Journal of Natural Products*, **60**, 1082-1087 (1997).
12. SUBBARAMAIAH, K., CHUNG, V.J., MICHALUART, P., TELANG, N., TANABE, T., INOUE, H., JANG, M., PEZZUTO, J.M., DANNENBERG, A.J., *Resveratrol Inhibits Cyclooxygenase-2 Transcription and Activity in Phorbol Ester-Treated Human Mammary Epithelial Cells*, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 21875-21882 (1998).
13. ROTONDO, S., RAJTAR, G., MANARINI, S., CELARDO, A., ROTILIO, D., GAETANO, G., EVANGELISTA, V., CERLETTI, C., *Effect of Trans-Resveratrol, a Natural Polyphenolic Compound, on Human Polymorphonuclear Leukocyte Function*, *British Journal of Pharmacology*, **123**, 1691-1699 (1998).
14. WALSH, G., *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, Chichester: J. Wiley, ISBN 0-471-97789-6, 209-215, 1998.
15. MITCHELL, S.H., ZHU, W., YOUNG, C.Y.F., *Resveratrol Inhibits the Expression and Function of the Androgen Receptor in LNCaP Prostate Cancer Cells*, *Cancer Research*, **59**, 5892-5895 (1999).
16. GAUTAM, S.C., XU, Y.X., DUMAGUIN, M., JANAKIRAMAN, N., CHAPMAN, R.A., *Resveratrol Selectively Inhibits Leukemia Cells: a Prospective Agent for Ex Vivo Bone Marrow Purging*, *Bone Marrow Transplantation*, **25**, 639-645 (2000).
17. TSAN, M., WHITE, J.E., MAHESHWARI, J.G., BREMNER, T.A., SACCO, J., *Resveratrol Induces Fas Signalling-independent Apoptosis in THP-1 Human Monocytic Leukaemia Cells*, *British Journal of Haematology*, **109**, 405-412 (2000).
18. DAMIANAKI, A., BAKOGEORGOU, E., KAMPA, M., NOTAS, G., HATZOGLU, A., PANAGIOTOU, S., GEMETZI, C., KOUROUMALIS, E., MARTIN, P., CASTANAS, E., *Potent Inhibitory Action of Red Wine Polyphenols on Human Breast Cancer Cells*, *Journal of Cellular Biochemistry*, **78**, 429-441 (2000).

19. ELATTAR, T.M.A., VIRJI, A.S., *The Effect of Red Wine and Its Components on Growth and Proliferation of Human Oral Squamous Carcinoma Cells*, *Anticancer Research*, **19**, 5407-5414 (1999).
20. NIELSEN, M., RUCH, R.J., VANG, O., *Resveratrol Reverses Tumor-Promoter-Induced Inhibition of Gap-Junctional Intercellular Communication*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **275**, 804-809 (2000).
21. BABICH, H., REISBAUM, A.G., ZUCKERBRAUN, H.L., *In Vitro Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol*, *Toxicology Letters*, **114**, 143-153 (2000).
22. CHAN, M.M., MATTIACCI, J.A., HWANG, H.S., SHAH, A., FONG, D., *Synergy Between Ethanol and Grape Polyphenols, Quercetin, and Resveratrol, in the Inhibition of the Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway*, *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1539-1548 (2000).
23. WADSWORTH, T.L., KOOP, D.R., *Effects of Wine Polyphenolics Quercetin and Resveratrol on Pro-Inflammatory Cytokine Expression in RAW 264.7 Macrophages*, *Biochemical Pharmacology*, **57**, 941-949 (1999).
24. SZENDE, B., TYIHAK, E., KIRALY-VEGHELY, Z., *Dose-Dependent Effect of Resveratrol on Proliferation and Apoptosis in Endothelial and Tumor Cell Cultures*, *Experimental and Molecular Medicine*, **32**, 88-92 (2000).
25. SCHNEIDER, Y., VINCENT, F., DURANTON, B., BADOLO, L., GOSSE, F., BERGMANN, C., SEILER, N., RAUL, F., *Anti-Proliferative Effect of Resveratrol, a Natural Component of Grapes and Wine, on Human Colonic Cancer Cells*, *Cancer Letters*, **158**, 85-91 (2000).
26. NICOLINI, G., RIGOLIO, R., MILOSO, M., BERTELLI, A.A.E., TREDICI, G., *Anti-Apoptotic Effect of Trans-Resveratrol on Paclitaxel-Induced Apoptosis in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line*, *Neuroscience Letters*, **302**, 41-44 (2001).
27. PARK, J., CHOI, Y., JANG, M., LEE, Y., JUN, D.Y., SUH, S., BAEK, W., SUH, M., JIN, I., KNOW, T.K., *Chemopreventive Agent Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes, Reversibly Inhibits Progression Through S and G2 Phases of the Cell Cycle in U937 Cells*, *Cancer Letters*, **163**, 43-49 (2001).

28. SURH, Y., HURH, Y., KANG, J., LEE, E., KONG, G., LEE, S.J., *Resveratrol, an Antioxidant Present in Red Wine, Induces Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) Cells, Cancer Letters, 140, 1-10 (1999).*
29. GU, X., CREASY, L., KESTER, A., ZEECE, M., *Capillary Electrophoretic Determination of Resveratrol in Wines, Journal of Agricultural Food Chemistry, 47, 3223-3227 (1999).*
30. CHU, Q., O'DWYER, M., ZEECE, M.G., *Direct Analysis of Resveratrol in Wine by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis, Journal of Agricultural Food Chemistry, 46, 509-513 (1998).*
31. SAKKIADI, A.V., STAVRAKAKIS, M.N., HAROUTOUNIAN, S.A., *Direct HPLC Assay of Five Biologically Interesting Phenolic Antioxidants in Varietal Greek Red Wines, Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 34, 410-413 (2001).*
32. RIBERIO de LIMA, M.T., WAFFO-TEGUO, P., TEISSEDE, P.L., PUJOLAS, A., VERCAUTEREN, J., CABANIS, J.C., MERILLON, J.M., *Determination of Stilbenes (Trans-Astringin, Cis- and Trans-Piceid, and Cis- and Trans-Resveratrol) in Portuguese Wines, Journal of Agricultural Food Chemistry, 47, 2666-2670 (1999).*
33. REVILLA, E., RYAN, J.M., *Analysis of Several Phenolic Compounds with Potential Antioxidant Properties in Grape Extracts and Wines by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection Without Sample Preparation, Journal of Chromatography A, 881, 461-469 (2000).*
34. RODRIGUEZ-DELGADO, M.A., MALOVANA, S., PEREZ, J.P., BORGES, T., MONTELONGO, F.J.G., *Separation of Phenolic Compounds by High-performance Liquid Chromatography with Absorbance and Fluorimetric Detection, Journal of Chromatography A, 912, 249-257 (2001).*
35. VINAS, P., LOPEZ-ERROZ, C., MARIN-HERNANDEZ, J.J., HERNANDEZ-CORDOBA, M., *Determination of Phenols in Wines by Liquid Chromatography with Photodiode Array and Fluorescence Detection, Journal of Chromatography A, 871, 85-93 (2000).*
36. LINDL, T., BAUER, J., *Zell-Und Gewebekultur, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1987.*

37. LUETTIG, B., STEINMULLER, C., GIFFORD, G.E., WAGNER, H., LOHMANN-MATTHES, M.L., *Macrophage Activation by the Polysaccharide Arabinogalactan Isolated from Plant Cell Cultures of Echinacea purpurea*, *Journal of the National Cancer Institute*, **81**, 669-675 (1989).