

Sıçan metabolik sendrom modelinde resveratrol'ün oksidan ve antioksidan sistemler üzerine etkileri

[Effects of resveratrol on oxidant and antioxidant systems in model of rat metabolic syndrome]

Nevin İlhan¹,
Hilal Güngör¹,
Ayşe Şebnem İlhan²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ;
²Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Nevin İlhan

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
Telefon: +90 424 237000/4697
E-posta: dmilhan@yahoo.com

Kayıt Tarihi: 21 Kasım 2013; Kabul Tarihi: 10 Haziran 2014
[Registered: 21 November 2013; Accepted: 10 June 2014]

ÖZET

Amaç: Son yıllarda ciddi bir sağlık problemi olan metabolik sendromun oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu artırıcı etkisi, polifenol yapıda doğal bir antioksidan olan resveratrol'ün bu alanda kullanımını gündeme getirmiştir. Yüksek fruktoz diyeti ile deneysel metabolik sendrom oluşturulmuş sıçanlarda, resveratrol tedavisiyle değişen kalp, böbrek ve hepatik doku malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) değerlerinin kontrol grubu ve tedavi öncesi metabolik sendromlu grup ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Metod: Çalışmada Wistar/albino cinsi 15 adet sıçan kullanıldı. Kontrol, metabolik sendrom oluşturulan grup ve tedavi ajanı olarak resveratrol verilen grup olmak üzere sıçanlar eşit 3 gruba ayrıldı. Deneysel süre sonrası MDA, NO, SOD ve KAT düzeyleri dokuların homojenizasyonu sonrası manuel spektrofotometrik metodlarla çalışıldı.

Bulgular: Çalışma sonucu, kalp ve karaciğer doku MDA ve kalp, böbrek, karaciğer doku NO değerlerinde, metabolik sendromlu grupta kontrollere göre anlamlı artışlar ($p < 0.05$), resveratrol tedavisini takiben ise kontrol değerlerine yakın olacak şekilde düşüşler gözlemlendi. Böbrek ve karaciğer doku katalaz aktivitesi metabolik sendromlu grupta istatistiksel olarak azalmış ($p = 0.019$ ve $p = 0.021$) ve resveratrol tedavisiyle kontrol değerlerine yakın anlamlı bir yükselme ($p = 0.011$ ve $p = 0.058$) izlenmiş, SOD için bu değişimler katalaz kadar belirgin olmamıştır ($p > 0.05$). Ancak hepatik SOD aktivitesi açısından resveratrol tedavisi alan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında tedavi alan grupta belirgin bir artış kaydedilmiştir ($p = 0.011$).

Sonuç: Bu sonuçlar resveratrolün muhtemelen antioksidan etkisi ile metabolizmada önemli yeri olan karaciğer ve böbrek dokusu oksidatif stresini azaltıp endojen antioksidanlara destek verdiğini, eksojen fruktoz ile oluşturulan doku hasarına karşı direkt veya dolaylı etkisiyle oluşan hasarı önlemede etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metabolik sendrom, doku MDA, NO, SOD, katalaz, resveratrol

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması yoktur.

ABSTRACT

Objective: In recent years, metabolic syndrome, which is a serious health problem, enhancing the effect of oxidative stress and lipid peroxidation, which is a natural antioxidant resveratrol, a polyphenol structure, the use of this area has brought. The present study aimed to evaluate the influence of resveratrol (RSV) treatment on heart, kidney and hepatic tissue malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels in high fructose feeding rats which form an experimental metabolic syndrome model and compared to pre-treatment of metabolic syndrome group and the control group values.

Methods: Wistar/albino rats ($n = 15$) were used in the present study. Rats were divided equally into 3 groups as control, created group of metabolic syndrome and metabolic syndrome plus resveratrol treatment. At the end of the experimental period, tissue MDA, NO, SOD and CAT levels were studied manual spectrophotometric methods after homogenization of tissues.

Results: The result of the study, a significant increase in heart and liver tissue MDA levels, and heart, kidney, liver tissue NO levels were observed in the metabolic syndrome group compared to the controls ($p < 0.05$), following treatment with resveratrol significantly decreases were observed to be close to the control values. Kidney and liver tissue catalase activity statistically significant decrease in metabolic syndrome group compared to the controls, ($p = 0.019$ and $p = 0.021$, respectively), kidney and liver tissue catalase activity similar to control values after treatment with resveratrol, a significant increase was observed ($p = 0.011$ and $p = 0.58$), but changes in the activity of SOD has not been as significant as catalase ($p > 0.05$). However, hepatic SOD activity of resveratrol treatment group compared with the control group, a significant increase was recorded in the treated group ($p = 0.011$).

Conclusion: These results suggest probably antioxidant effects of resveratrol to reduce oxidative stress in the liver and kidney tissue which is an important role in metabolism. Against tissue damage generated by exogenous fructose, resveratrol is effective in preventing tissue damage with a direct or indirect effect shows.

Key Words: Metabolic syndrome, tissue MDA, NO, SOD, catalase, resveratrol.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Giriş

İnsülin direnciyle başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği metabolik sendromun oksidatif stres ve özellikle de lipid peroksidasyonu artırıcı etkisi, resveratrol'un bu alanda da kullanımına olanak sağlamıştır [1]. Fizyolojik şartlar altında düşük hızda gerçekleşen lipid peroksidasyonunun oksidanlar ve oksidatif stres ile oluşum hızı artabilmektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen, azot ya da demir ürünlerinin oluşumu ile bağlantılı genel bir terimdir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ailesi moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşan oldukça biyoaktif, kısa ömürlü molekülleri içerir [2].

Nitrik oksit (NO) memeli vücudundaki birçok önemli olayda rol oynayan bir sinyal molekülüdür. Bir serbest radikal olan NO hem sitotoksik hem de hücre koruyucu özellikleri olan bir reaktif moleküldür [3]. Bazı araştırmalar endojen NO'nun toksik olduğunu açıkça belirtirken, diğerleri ise koruyucu olduğunu göstermiştir. Koruyucu etkileri antioksidan mekanizmalar üzerinden sunulurken, NO aracılı toksisite hücre ölümüne yol açan reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna dayandırılır. Genel olarak, düşük derişimlerde (<1µM) doğrudan, buna karşın yüksek derişimlerde (>1µM) dolaylı etki göstermektedir. NO, özgün bölgedeki derişimi, diğer ROS'ların derişimi ve özellikle hücre redoks durumuna bağlı olarak antioksidan, düzenleyici veya toksik etki gösterebilmektedir [4].

Son birkaç yıldır, yapılan deneysel çalışmalar resveratrolun (3,5,4'-trihidroksistilben) organizmada antioksidan özelliği ile yararlı etki gösterdiğini ve bazı metabolik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir [5]. Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir. Resveratrol, stilbenlerin alt grubu olup üzüm, şarap, yer fıstığı ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir [6,7]. Resveratrol'un özellikle patojenlerin bitkilere saldırması, yaralanma veya ultraviyole (UV) ışığa maruz kalma sonucunda bitkiler tarafından üretilen bir fitoalleksin olduğu da bilinmektedir [8].

Resveratrol, serbest radikaller ve diğer oksidanlara karşı mücadele eden sistemleri harekete geçirerek vücudu korur. Özellikle, H₂O₂ ile oluşan apoptotik hücre ölümündeki artışa karşı endotel hücrelerini korur ve damarların oksidatif strese direncini artırır, antiinflamatuvar, antidiyabetik aktivite, antihiperkoesterolemik etkiler, yaşlanma karşıtı ve hücre siklusunu kontrol etme yeteneğine sahiptir [9-12]. Resveratrol'un doğal antioksidan rolü; koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak, eikosanoid sentezi, modüle lipoprotein metabolizmasını değiştirmeden trombosit agregasyonunu ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmek şeklindedir [10,13]. Resveratrolün *in vivo* antioksidan özelliği NO

sentezini arttırma yeteneği ile güç kazanmakta ve oluşan NO, süperoksidi yakalama yeteneğine sahiptir. Resveratrol, biyolojik sistemlerde bulunan antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarının sürdürülmesini de sağlamaktadır [14]. Resveratrol ve resveratrolün hidroksil, glikozil türevleri fenoksil radikallerine enzimatik veya nonenzimatik yollarla tek elektron yolağını kullanarak okside edebilir [15].

Bu çalışmada, yüksek dozda fruktoz diyeti ile deneysel metabolik sendrom oluşturulmuş sıçanlarda resveratrol tedavisini takiben doku malondialdehit (MDA), NO gibi oksidanlar ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerin değişen değerlerinin kontrol grubu ve tedavi almayan metabolik sendromlu grupla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nde (FÜDAM) standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü. Çalışmada 8-10 haftalık erkek Wistar/albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar; çalışma boyunca 22-24 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu, otomatik olarak klimatize edilen odalarda 5'erli ve 3'erli gruplar halinde, hayvanlar için hazırlanmış önceden sterilize edilmiş özel kafeslerde korundu. Hayvanların beslenmesi standart bir mineral ve vitamin karışımı içeren 8 mm'lik pellet cinsi yem (%21 protein, %4 yağ, %50 karbonhidrat (sebze nişasta) ve %4.5 selüloz) ve çeşme suyu ile sağlandı. Bir haftalık uyum süresinin sonunda sıçanların kiloları ölçülerek kontrol grubunda 6, metabolik sendrom oluşturulacak grupta ise 12 hayvan olacak şekilde rastgele 2 gruba ayrıldı. Çalışmada gruplar ve uygulanan metodlar şu şekilde belirlendi;

Kontrol grubu (n=6), 5 hafta boyunca standart pellet yemle beslendi. Daha sonraki 3 hafta boyunca her gün intraperitoneal (ip) olarak %0.9 NaCl içinde hazırlanan etanol (3 g/kg vücut ağırlığı) enjeksiyonu (%35; v/v) yapıldı. Süre bitiminde sıçanlar dekapite edilerek kan ve kalp, böbrek, karaciğer doku örnekleri alındı.

Metabolik sendrom oluşturulan grup (MS, n=12), 5 hafta boyunca standart yeme ek olarak içme suyuna % 10 fruktozun eklendiği grup olarak dizayn edildi ve süre sonunda eşit 2 gruba ayrıldı. İlk gruba (MS, n=6), 3 hafta boyunca günlük sadece ip. etanol-salin enjeksiyonu (%35; v/v) yapıldı. Bu grup MS hasta grubu olarak ifade edildi. Diğer gruba (MS+Res, n=6) ise 3 hafta boyunca 10mg/kg resveratrol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, saflık oranı %99) her gün etanol-salin (%35; v/v) içerisinde çözdürülüp ip. enjeksiyon şeklinde uygulandı. Bu grup tedavi grubu olarak adlandırıldı. Süre bitiminde her iki gruptaki sıçanlar dekapite edilip kan ve doku örnekleri alındı. Çalışmaya her grupta eşit sayıda sıçan olacak şekilde ölümler sonrası kalan toplam 15 sıçan ile devam edildi.

Resveratrolün belirgin antioksidan etkisinin 10 mg/kg/gün dozunda (ip) olduğu ilgili literatür bilgisinden belirlendi [16]. Hayvanların vücut ağırlıkları başlangıçta ve tedavi sonrası her hafta kaydedildi. Deney süresi sonunda sıçanlar gece boyunca aç bırakıldı, diurnal etkilerden kaynaklanan durumların giderilmesi için, her sıçan günün aynı zamanında eter anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyonu takiben kanlar rutin biyokimyasal test tüplerine alındı ve 15 dakika 4000 rpm (4 °C)'de santrifüj edildi. Biyokimyasal analizler yapıncaya kadar serumlar -70 °C de saklandı.

Serum glukoz, trigliserid ve total kolesterol düzeyleri enzimatik yöntemlerle otoanalizörde (Olympus AU 600, Hamburg, Germany), insülin seviyeleri ise rat/mouse ELISA kiti kullanılarak (Linco research, USA) kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı ve elde edilen değerler mU/mL'e çevrildi. Homeostatic model assessment (HOMA) indeksi ise insülin (mU/mL) X [glukoz (mmol/l/22.5)] formülü ile hesaplandı [17].

Alınan dokular %0.9'luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Analiz zamanına kadar -80 °C'de bekletildi. Analiz sırasında dokuların kuru ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Bu dokular küçük parçalara ayrılarak homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0,15 M'lık KCl çözeltisi içinde (1:9,w:v), 16000 rpm'de 3 dakika soğuk ortamda homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlardan doku MDA ve NO düzeyleri ölçüldü. Geri kalan homojenatlar +4°C'de 60 dakika süreyle 5000xg'de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatantlarda SOD ve KAT enzim aktiviteleri tayin edildi.

SOD enzimi Sun ve arkadaşlarının modifiye ettiği metotla ölçüldü [18]. Bu metodun prensibi; nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit kaynağı olan ksantinksantin oksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. SOD'un bir ünitesi NBT'deki azalma oranında %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. SOD, U/mg protein olarak ifade edildi.

Katalaz aktivitesi Aebi metoduna göre çalışıldı [19]. Testin prensibi 240 nm'de H₂O₂'in parçalanma hızının hız sabiti olan k'nın (/s) belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçlar k/g protein olarak ifade edildi. Protein ölçümleri Lowry metodu ile gerçekleştirildi [20].

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın ölçümü Ohkawa metodu ile gerçekleştirildi [21]. MDA, asit ve alkali ortamda ısıtılarak serbestleştirilip tiyobarbiturik asit (TBA) reaktifi ile 90-95°C'de reaksiyona giren malondialdehit, MDA-TBA renkli bileşiminin oluşturulması sonucunda UV-1201V-Shimadzu marka spektrofotometrede 532 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. 1,1,3,3, tetraetoksipropan standart olarak kullanıldı.

NO'nin stabil son ürünü olan nitrit düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü [22]. pH 9,7 glisin tamponunda

bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyona bırakılarak nitratın redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletlen diamin (NNDA) diazotizasyonuyla reaksiyon sonucu oluşan pembe rengin 545nm dalga boyunda okunması ile belirlendi. Sodyum nitrit standart olarak kullanıldı, konsantrasyonlar standart eğri ile karşılaştırılarak tanımlandı.

İstatistik Analizi: Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.0 paketi (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrik testlerin ön şartlarını (ölçümlerin nicel olması, sonuçların ortalama şeklinde verilmesi, grupların rastgele ve birbirinden bağımsız seçilmesi, homojen olması vb. gibi) sağlayan değişkenlere ilişkin grup karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden LSD testi kullanıldı. p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.

Bulgular

Gıda alımı açısından gruplar arasında çok hafif varyasyonlar vardı. Kontrol ve metabolik sendrom oluşturulan gruplardaki günlük gıda alımında önemli bir değişiklik yoktu. Bu da normal gıda alımına yüksek fruktoz diyetinin bir etkisi olmadığını gösterdi. Resveratrol tedavisi alan grupta ise günlük gıda alımında hafif bir azalma tespit ettik. Bu durum sıçanların ortalama vücut ağırlığında hafif bir azalma ile karşımıza çıkırsa da diğer gruplarla karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Gruplara ait serum insülin, glukoz, HOMA indeksi, trigliserid ve kolesterol değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Metabolik sendrom oluşturulan grupta tüm parametreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yükselmişti (p<0.0001, p=0.012, p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001, sırasıyla). İnsülin, HOMA indeksi, trigliserid ve kolesterol değerleri metabolik sendrom oluşturulan grup ile karşılaştırıldığında, resveratrol tedavisi ile anlamlı azalma gösterdi (p<0.0001, p=0.007, p=0.002, p<0.0001, sırasıyla). Glukoz değerlerindeki azalma ise istatistiksel anlamlı değildi (p=0.17).

Yüksek fruktoz diyeti ile metabolik sendrom oluşturulan grupta kontrollere göre kalp ve karaciğer doku MDA düzeyleri anlamlı olarak yükseltmişti (p=0.010 ve p=0.005, sırasıyla). NO, kontrollere göre metabolik sendrom oluşturulan sıçanların kalp dokusunda artış göstermesine rağmen istatistiksel anlamlı değilken, böbrek ve karaciğer dokularında anlamlı artış göstermiş (p=0.002 ve p=0.021, sırasıyla) ve resveratrol tedavisi ile sıçanların kalp ve karaciğer doku NO değerleri metabolik sendrom oluşturulan gruba göre anlamlı olarak azalmıştı (p=0.019 ve p=0.002, sırasıyla). SOD aktivitesi, resveratrol tedavisi alan sıçanların karaciğer dokusunda anlamlı artmıştı (p=0.011). KAT aktivitesi, MS oluşturulan grubun böbrek

Tablo 1. Gruplara ait serum biyokimyasal parametreleri

	Kontrol	MS	MS+Res
Ortalama ağırlık (g)	311.00 g±34.35	323.00±23.34	302.00±20.49
İnsülin (mU/mL)	47.08±3.59	72.22±1.38 ^a	52.93±4.06 ^{b,c}
Glukoz (mg/dL)	75.40±7.54	130.40±36.78 ^b	103.40±33.95
HOMA indeksi	8.73±0.72	23.22±6.63 ^a	13.56±4.83 ^d
Trigliserid (mg/dL)	118.60±12.09	175.20±13.70 ^a	139.40±15.86 ^{b,d}
Kolesterol (mg/dL)	75.00±4.47	114.80±10.44 ^a	84.40±4.72 ^c

^ap<0.0001, kontrol ile karşılaştırıldığında

^bp<0.05, kontrol ile karşılaştırıldığında

^cp<0.0001, MS ile karşılaştırıldığında

^dp<0.01, MS ile karşılaştırıldığında

Tablo 2. Doku oksidan düzeyleri ve antioksidan aktiviteleri

	Gruplar	MDA (nmol/ gr doku)	Nitrit (µmol/ gr doku)	SOD (U/mg protein)	CAT(k/gr protein)
Kalp doku	Kontrol	6.96±1.19	1.49±0.35	1.92 ±0.95	5.30±4.83
	MS	10.32±1.78 ^a	2.09±0.62	1.32±1.32	4.91±2.69
	MS+Resveratrol	9.3±2.10	1.314±0.342 ^b	1.29±0.661	5.84±3.25
Böbrek doku	Kontrol	12.96±1.93	0.98±0.20	0.58±0.12	25.21±14.25
	MS	12.42±3.54	1.87±0.55 ^c	0.66±0.07	7.43±9.28 ^a
	MS+Resveratrol	15.42±1.81	1.04±0.17	0.55±0.11	27.23±5.98 ^b
Karaciğer doku	Kontrol	6.66±0.98	0.87±0.08	0.44±0.17	4.43±2.98
	MS	9.18±1.09 ^c	1.57±0.53 ^c	0.60±0.09	0.83±0.85 ^a
	MS+Resveratrol	7.63±1.35	0.81±0.07 ^d	0.71±0.15 ^a	3.67±2.05

^ap<0.05, kontrol ile karşılaştırıldığında

^bp<0.05, MS ile karşılaştırıldığında

^cp<0.005, kontrol ile karşılaştırıldığında

^dp<0.005, MS ile karşılaştırıldığında

ve karaciğer dokularında kontrollere göre anlamlı azalırken (p=0.019 ve p=0.021, sırasıyla), resveratrol tedavisiyle bu azalmanın geriye döndüğü tespit edildi (p=0.011 ve p=0.058, sırasıyla) (Tablo 2).

Tartışma

Görülme sıklığındaki artış nedeniyle metabolik sendrom son yıllarda önemli bir sağlık sorunu haline gelmiş, buna yönelik olarak konuyla ilgili araştırma ve çalışmalar da beraberinde artmıştır. İnsülin direnci temelinde oluşan metabolik sendrom, değişkenleri arasında güçlü interkorelasyon bulunan karmaşık fizyolojik yapı ile karakterizedir. Yüksek fruktoz alımı sıçanlarda hiperinsülinemi ve insülin direncini indüklemektedir [23]. Deneysel olarak metabolik sendrom oluşturduğumuz bu çalışmada, metabolik sendrom tanı kriterlerinden insülin direnci göstergesi HOMA indeksi ve beraberindeki insülin, glukoz, trigliserid ve kolesterol değerlerinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı yükselmesi sıçanlarda bu patolojiyi oluşturduğumuzu desteklemektedir. Çalışmamızda yüksek fruktozu sularına eklediğimiz sıçanlarda açlık trigliserid ve kolesterol değerlerinde artış yani dislipide-

mi oluşumu, sıçan ve diğer kemirgenler (örneğin: Hamster) üzerinde yapılan daha önceki çalışmalar ile uyumlu idi [24,25]. Yüksek fruktoz ile beslenen sıçanlarda oluşan insülin direnci ve fruktozun hipertrigliseridemik etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Fruktoz ile beslenme hem esterlenmemiş yağ asitlerinin dolaşımında yeniden esterleşmesini sağlayarak hem de yağ asidinin de novo sentezini uyararak lipogenezi ve hepatik trigliserid üretimini uyarmaktadır [25]. Kasta trigliserid veya esterlenmemiş yağ asitlerinin artışı glukoz kullanımını engeller ve insülin etkisini bozar [26]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda barsak lipoprotein metabolizmasının dereglasyonu ve insülin direnci gelişimi arasında ilginç bağlantılar belirlendi. Kronik fruktoz ile besleme hem lipid sentezini (özellikle serbest kolesterol, kolesterol ester ve trigliserid), hem de mikrozomal trigliserid transfer proteini kütlesi (MTP) ve aktivitesini artırarak B48 – içeren lipoprotein partikülleri formunda apolipoprotein salgılanmasını uyarır. Sonuçta bu durum, insülin dirençli ya da diyabetik hayvanlarda açlık lipoproteinlerinin salgılanmasından sorumlu bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir [26,27]. Ayrıca resveratrol tedavisini takiben HOMA indeksi, insülin, trigliserid ve kolesterol değerlerinde anlamlı azalmanın görül-

mesi (standart sapmadaki büyüklük nedeniyle glukoz değerlerindeki azalma istatistiksel anlamlı değildi), kontrol düzeylerine yakın değerlere inmesi, yüksek fruktoz alan sıçanlarda fruktoz alımına bağlı gelişen hiperinsülinemi, insülin direnci ve hiperlipidemi tablosunda iyileşme sağlandığını göstermektedir. Resveratrol beta hücrelerinden insülin salgılanmasını artırır ve yüksek insülin nedeniyle insülin duyarlılığının iyileştirilmesinden sorumlu olabileceği bilinmektedir [28,29]. Bu çalışmada, insülin duyarlılığını artırmak amacı ile tedavi ajanı olarak verilen resveratrolün metabolik sendrom oluşturulan gruba göre tedavi grubunda belirtilen parametrelerde yaptığı anlamlı değişiklikler bu mekanizma ile açıklanabilir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Bagul ve ark. [30] ile Baek ve arkadaşlarının [31] yaptıkları çalışma sonuçlarıyla uyumluydu.

Nitrik oksit fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen önemli bir sinyal gaz moleküldür. Hem diyabetik hastalarda hem de fruktoz ile beslenen diyabetik sıçanlarda artmış serum NO düzeyleri bildirilmiştir. Artan NO seviyeleri peroksinitrat oluşumu yoluyla oksidatif hasara neden olabilir [32-34]. Bu çalışmada, karaciğer ve böbrek dokusu NO düzeyleri kontrol grubu sıçanlara kıyasla fruktoz ile beslenen sıçanlarda anlamlı olarak daha yüksekti. Fruktoz ile beslenen sıçanların kalp doku NO düzeylerinde de belirgin artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.057$). Fruktoz ile beslenen sıçanlarda resveratrol tedavisi ile kalp, karaciğer ve böbrek doku NO düzeyleri normal kontrol değerlerine indi. Fruktoz ile beslenen sıçanlarda resveratrol tedavisi ile doku NO düzeylerinin azalması resveratrol tedavisinin oksidatif stresi azalttığını göstermektedir.

Metabolik sendromda artmış oksidatif stres ve endotelial disfonksiyona sık rastlanır. Oluşan serbest radikaller membran enzimlerine ve reseptörlerine kovalent bağlanarak onların antijenik özelliğini ve membran taşıma fonksiyonunu bozar, poliansatüre yağ asidi protein oranını değiştirirler. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı sonucunda membranda lipid geçirgenliği artar, organelerde fonksiyon bozukluğu, lizozomal fragilite artışı ile mikrozomal enzimlerde değişiklikler oluşur, antioksidan sistem tehlikeye girer, insülin rezistansı gelişir. Sonuçta hücre ölümü gerçekleşir, bu durum da daha fazla oksidatif stres alevlenmesine yol açar [30,35]. Hasarın derecesi hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi bazı hücreSEL antioksidan enzimler serbest radikallerin oluşmasını ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir. Metabolik sendromla ilişkili tüm bu patolojik mekanizmalar, bu çalışmada değerlendirilen doku SOD, CAT, MDA ve NO'e ait sonuçların metabolik sendromlu gruptaki değişen miktarlarıyla paralellik göstermişti ve bu yönüyle konuya ilişkin benzer çalışmalara katkı sağlayabilecektir.

Çalışmamızda, kalp ve karaciğer doku MDA seviyelerini kontrollere göre yüksek fruktozla beslenen metabolik

sendrom grupta anlamlı olarak artmıştı. Resveratrol tedavisi ile kalp ve karaciğer dokusunda MDA seviyeleri azalmış (kalp dokusundaki azalma istatistiksel anlamlı değil, $p=0.054$), bu da oksidatif stresi azaltmada resveratrolün etkin olduğunu göstermiştir. Fruktozla beslenen sıçanlarda tüm doku SOD aktivitelerinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, böbrek ve karaciğer dokularında KAT aktiviteleri anlamlı olarak düşmüştü. Antioksidan enzimler içinde SOD enzimi serbest oksijen radikallerine karşı savunmada ilk basamak olup, oksidatif stres ile karşılaşma sonucunda hızla süperoksit anyon radikallerini oluşturmakta, süperoksit ise daha sonra hidrojen peroksit dönüşmekte ve katalaz enziminin etkisine sunulmaktadır. Aynı zamanda oluşan süperoksit hızla NO ile tepkimeye girerek yüksek reaktif bir ara ürün olan peroksinitriti oluşturmakta ve bu tepkime süperoksit dismutasyonundan 3-4 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Peroksinitrit yüksek konsantrasyonlarda sitotoksiktir; proteinlerde, yağlarda ve DNA'da oksidatif hasar meydana getirmektedir [36]. Metabolik sendrom oluşturulan sıçanların hem karaciğer hem de böbrek doku NO artışı, KAT aktivitelerinin azalışı bu mekanizma ile açıklanabilir. Katalaz enzimi, metabolizmanın ve kan akımının çok hızlı olduğu karaciğer ve böbrek dokusunda hidrojen peroksit aracılı hidroksil radikallerini moleküler suya detoksifiye etmek için çalışmakta ve tükenmektedir. MS oluşturduğumuz grupta kalp, karaciğer ve böbrek dokusunda artan MDA ve NO düzeylerine karşın KAT aktivitesindeki azalmanın oksidatif strese karşı antioksidan defans sistemini çalıştırdığı anlamına gelmektedir. Resveratrol tedavisini takiben böbrek ve karaciğer doku KAT aktivitelerinde oldukça anlamlı artışların yanı sıra, kalp, böbrek ve KC doku NO seviyelerinde ve KC doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma saptanmıştır. Bu da resveratrol'ün oksidatif stresi azaltıcı, antioksidan sistemleri destekleyici özelliğini göstermesi açısından önemlidir. Bu da göstermektedir ki resveratrol'ün etkisiyle artan SOD düzeyleri süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit çevirmiş, yine resveratrol kullanımıyla artan KAT miktarları da hidroksil radikalının oluşumunu önlemek amacıyla hidrojen peroksiti suya ayrıştırarak etkili olmuştur. Resveratrolün çeşitli yollarla kullanılarak antioksidan mekanizmalar üzerine olumlu etkiler göstermesi açısından oldukça değerlidir.

Gerek bu çalışma gerekse konuyla ilgili diğer güncel çalışmalarda hücreyi oksidatif hasara karşı koruduğu bilinen resveratrolün, sıçan metabolik sendrom modelinde de ortaya çıkan hasarların düzeltilmesinde ve antioksidan enzim etkinliklerinin artırılmasında etkin rol oynadığı gösterilmiştir.

Çıkar çatışması

Yazarların çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

[1] Robich MP, Chu LM, Burgess TA, Feng J, Han Y, et al. Resvera-

- trol preserves myocardial function and perfusion in remote nonischemic myocardium in a swine model of metabolic syndrome. *J Am Coll Surg* 2012; 215(5):681-9.
- [2] Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors* 2008; 34(2):171-80.
- [3] Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 2004; 134(10 Suppl):2748-51; discussion 2765-7.
- [4] Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(4-5):434-56.
- [5] Fröjdö S, Durand C, Pirola L. Metabolic effects of resveratrol in mammals—a link between improved insulin action and aging. *Curr Aging Sci* 2008; 1(3):145-51.
- [6] Pirola L, Fröjdö S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 2008; 60(5):323-32.
- [7] Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* 2003; 17(14):1975-85.
- [8] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol* 2001; 492:159-82.
- [9] Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(4):1017-26.
- [10] Le Corre L, Chalabi N, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(5):462-71.
- [11] Dawn B. Resveratrol: ready for prime time? *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(3):484-6.
- [12] Juhasz B, Varga B, Gesztelyi R, Kemeny-Beke A, Zsuga J, et al. Resveratrol: a multifunctional cytoprotective molecule. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(8):810-8.
- [13] Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25(2-3):87-97.
- [14] de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and prooxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5):1156-60.
- [15] Murias M, Jäger W, Handler N, Erker T, Horvath Z, et al. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(6):903-12.
- [16] Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, Cigremis Y, et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. *Gynecol Obstet Invest* 2004; 57(4):218-23.
- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-9.
- [18] Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500.
- [19] Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. 1974; pp. 673-7, Academic Press, New York.
- [20] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [21] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
- [22] Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36(8 Pt 1):1440-3.
- [23] Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 2009; 332(1-2):145-59.
- [24] Shahraki MR, Harati M, Shahraki AR. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of *Tamarindus indica* seed. *Acta Med Iran* 2011; 49(5):277-83.
- [25] Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem* 2000; 275(12):8416-25.
- [26] Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelmann KD, Kohen-Avramoglu R, et al. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem* 2002; 277(35):31646-55.
- [27] Guo Q, Avramoglu RK, Adeli K. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism* 2005; 54(5):689-97.
- [28] Vetterli L, Brun T, Giovannoni L, Bosco D, Maechler P. Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286(8):6049-60.
- [29] Chen WP, Chi TC, Chuang LM, Su MJ. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 568(1-3):269-77.
- [30] Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res* 2012; 66(3):260-8.
- [31] Baek SH, Shin WC, Ryu HS, Lee DW, Moon E, et al. Creation of resveratrol-enriched rice for the treatment of metabolic syndrome and related diseases. *PLoS One* 2013; 8(3):57930.
- [32] Padiya R, Khatua TN, Bagul PK, Kuncha M, Banerjee SK. Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8:53.
- [33] Mancardi D, Pla AF, Moccia F, Tanzi F, Munaron L. Old and new gasotransmitters in the cardiovascular system: focus on the role of nitric oxide and hydrogen sulfide in endothelial cells and cardiomyocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12(9):1406-15.
- [34] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1):315-424.
- [35] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1):24-38.
- [36] Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003; 4(4):41-51.