



OKSİRESVERATROLÜN L929 FİBROBLAST HÜCRELERİNDEKİ OKSİDATİF STRES HASARI ÜZERİNE OLUMLU ETKİLERİ

POSITIVE EFFECTS OF OXYRESVERATROL ON OXIDATIVE STRESS DAMAGE IN L929 FIBROBLAST CELLS

Fatih Mehmet ATEŞ^{1*} , Yasin BAYIR² 

¹Bayburt Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, 69000, Bayburt, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 25240, Erzurum, Türkiye

ÖZ

Amaç: L929 fibroblast hücrelerinde H₂O₂ etkisiyle oluşturulan hücre hasarının bertaraf edilmesinde oksiresveratrolün rejeneratif etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Oksiresveratrolün total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), toplam fenolik madde seviyeleri farklı derişimlerde ölçülmüştür. Oksiresveratrol fibroblast hücrelerinde IC₅₀ değeri MTT yöntemiyle belirlenmesinin ardından 12.5 - 400 µM konsantrasyonlarında H₂O₂ ile meydana getirilen oksidatif stres hasarındaki rejeneratif etkisi in-vitro ortamdaki hücre proliferasyonunun ölçümü xCELLigence cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hücre hasarındaki yara iyileşme düzeylerini belirlemek amacıyla 3.125 - 25 µM derişimlerinde scratch analizi yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Oksiresveratrolün 0.5 mg/ml'de TAS değeri 3 ± 0.3 ve TOS değeri 0.77 ± 0.52; (OSİ) değeri 0.02 ± 0.09 olarak bulunmuştur. Oksiresveratrolün 0.625 mg/ml'den 10 mg/ml'ye farklı dozlarındaki total fenolik madde (TFM) derişimleri düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona daha yüksek TFM'ye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Oksiresveratrolün L929 fibroblast hücreleri IC₅₀ değeri 214.2 µM; H₂O₂'e maruz bırakılan L929 fibroblast hücrelerindeki hücre hattında oksiresveratrol IC₅₀ değeri 109.7 µM olduğu belirlenmiştir. Oksiresveratrolün 12.5 µM konsantrasyonunun xCELLigence cihazıyla ölçülmesinde en fazla hücre proliferasyonu gözlenmiştir. Scratch analizinde H₂O₂ ile hasarlanmış hücrelerdeki 12.5 µM oksiresveratrol konsantrasyonunda 24. Saat için %62, 48. Saat için %88'lik bir hücre proliferasyonu ile diğer dozlardan daha fazla iyileşme gözlenmiştir. 12.5 µM konsantrasyonu hem proliferasyon, hem de scratch analizinde en etkili konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Oksiresveratrol; düşük konsantrasyonlarda gösterdiği antioksidan kapasiteyle H₂O₂ aracılığıyla meydana getirilen

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Fatih Mehmet Ates
e-posta / e-mail: fmehmetates@bayburt.edu.tr, Tel. / Phone: +904582111152

Gönderilme / Submitted : 02.02.2023

Kabul / Accepted : 21.03.2023

Yayınlanma / Published : 20.05.2023

hücre sel hasarda, L929 fibroblast hücrelerini oksidatif stresten korur, fibroblast canlılığına ve migrasyona bir güç çarpanı etkisi oluşturur. Bu sonuçlar oksiresveratrolün; serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu akut ya da kronik hastalıkların engellenmesinde hücre düzeyinde etkili olabileceğini göstermiştir. Hücre düzeyinde gerçekleştirilecek daha kapsamlı çalışmalar, in-vivo çalışmalarla oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde oksiresveratrolün potansiyel bir molekül olabileceği düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Oksiresveratrol, OSI, TAS, TFM, TOS

ABSTRACT

Objective: *It was aimed to determine the regenerative effect of oxyresveratrol in eliminating the cell damage caused by the effect of H₂O₂ in L929 fibroblast cells.*

Material and Method: *Total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOC), oxidative stress index (OSI), total phenolic substance levels of oxyresveratrol were measured at different concentrations. After the IC₅₀ value of oxyresveratrol fibroblast cells was determined by the MTT method, the regenerative effect on oxidative stress damage induced by H₂O₂ at 12.5 - 400 µM concentrations was performed with the xCELLigence device to measure cell proliferation in-vitro. In addition, scratch analysis was performed at concentrations of 3.125 - 25 µM in order to determine the wound healing levels in cell damage.*

Result and Discussion: *The TAC value of oxyresveratrol at 0.5 mg/ml was 3 ± 0.3 and the TOC value was 0.77 ± 0.52; (OSI) value was found to be 0.02 ± 0.09. It has been observed that the total phenolic substance (TPS) concentrations of oxyresveratrol at different doses from 0.625 mg/ml to 10 mg/ml have higher TPS from low concentration to high concentration. Oxyresveratrol L929 fibroblast cells IC₅₀ value 214.2 µM; The IC₅₀ value of oxyresveratrol was determined to be 109.7 µM in the cell line of L929 fibroblast cells exposed to H₂O₂. The highest cell proliferation was observed when measuring the 12.5 µM concentration of oxyresveratrol with the xCELLigence device. Scratch analysis showed a greater improvement than other doses, with a cell proliferation of 62% at the 24th hour and 88% at the 48th hour at a concentration of 12.5 µM oxyresveratrol in H₂O₂-damaged cells. The 12.5 µM concentration was determined to be the most effective concentration in both proliferation and scratch analysis. Oxyresveratrol; with its antioxidant capacity at low concentrations, L929 protects fibroblast cells from oxidative stress in cellular damage caused by H₂O₂, and creates a power multiplier effect on fibroblast viability and migration. These results indicate that oxyresveratrol; showed that it can be effective at the cellular level preventing of acute or chronic diseases caused by free oxygen radicals. It can be thought that oxyresveratrol may be a potential molecule in the treatment of oxidative stress-induced diseases with more comprehensive studies to be carried out at the cellular level and in-vivo studies.*

Keywords: OSI, oxyresveratrol, TAC, TPS, TOC

GİRİŞ

Canlılardaki homeostazinin değişmesiyle serbest radikaller oksidatif stres meydana getirmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROT), yüksek aktiviteye sahip moleküllerdir. ROT, öncelikle mitokondride ve diğer hücre elemanlarındaki normal metabolik faaliyetler neticesi ya da iskemi, reperfüzyon, yaşlılık, radyoaktivite, oksijen basıncı, inflamasyon, kimyasal etkenlere maruziyet gibi sebeplerle oluşmaktadır [1-3]. Oksidatif stres, kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar vb. birçok hastalık oluşumuna sebep olmaktadır [4-7]. Oksidatif stresin azaltılmasında antioksidanların önemli bir fonksiyonu vardır. Antioksidanlar; kansere, diyabete, kalp-damar hastalıklarına neden olan ve aşırı düzeyde reaktif olan serbest radikalleri etkisizleştirebilen kimyasallardır. Organizmanın ihtiyaç duyduğu antioksidanlar endojen ya da eksojen yollardan karşılanmaktadır. Eksojen yolla alınan fenolik bileşikler doğal antioksidanlardır ve fenolik asit, flavonoid ve fenolik polimer bu grupta yer almaktadır [8]. Kronik dejeneratif hastalıklar, özellikle de kalp-damar hastalıklarına karşı polifenollerin koruyucu etkisini kanıtlar nitelikteki çalışmalar artmaktadır [9,10]. Oksidatif stresin azaltılmasında flavonoidler de kullanılmaktadır [11]. Flavonoidlerden biri olan oksiresveratrol, gıdalarda bulunan bir dış antioksidan fenolik bileşiktir [12].

Oksiresveratrol, *Artocarpus lakoocha*'nın [13] öz odununda, bundan üretilen konvansiyonel ilaç 'Puag-Haad'da [14] ve beyaz dutta [15] var olan mulberroside A'nın aglikonunda vardır [16].

Oksiresveratrol, kuvvetli tirozinaz inhibisyonu yapmakta ve melanom inhibisyonuna neden olmaktadır [17]. Oksiresveratrolün; fotoprotektif aktivitesi, [18] prooksidan aktivitesi, [19] antiviral aktivitesi [20,21], antiherpetik etkisi [22] *in-vitro* olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda kuvvetli antioksidan, antiinflamatuvar, nöroprotektif ve nörodejeneratif bozukluklar, kanserle mücadele tedavisinde aday ilaç olarak kullanımı tavsiye edilmektedir [23-26]. Çalışmamızda, oksiresveratrolün antioksidan ve oksidan seviyesinin ve toplam fenolik içeriğinin tespitinin ardından hidrojen peroksitle oluşturulmuş L929 fibroblast hücrelerinde oksiresveratrolün MTT analizi ve xCELLigence cihazı aracılığıyla hücre proliferasyonuna etkisi sitotoksitesisi; scratch analiziyle ise yara iyileşmesindeki rolü tespit edilmek istenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Kimyasalları

Dimetil Sülfoksit (DMSO) [Sigma-Aldrich]; Trypsin/EDTA(1X) [Gibco]; L929 Mediumu [ATCC]; Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) [Lonza]; H₂O₂ [Sigma-Aldrich]; 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) [Sigma-Aldrich]; Tripin Mavisi(%0.5) [Sigma-Aldrich]; Oksiresveratrol [Sigma-Aldrich]; L-Glutamin [Gibco]; Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin(PSA) [Lonza]; Fetal Bovin Serum (FBS)(%10) [Gibco]; TAS Assay Kit [RAD]; TOS Assay Kit [RAD]; Folin-Ciocalteu reaktif [Sigma-Aldrich] kimyasalları köşeli parantez içerisinde belirtilen ticari firmalardan temin edilmiştir.

Hücre Kültürü Hazırlığı

37°C su banyosunda hücre hattı çözüldüğünde flakon su banyosundan çıkarılarak %70 etanolle asepsi işlemine tabi tutulmuştur. Flakon içeriği 1000 rpm, 5 dk. santrifüj edilmiş ve hücre hattı 15 dakika inkübe edilerek pH değeri 7.0 -7.6 aralığında olması sağlanmıştır.

Kültür ortamı %0.25 Tripsin-0.53 mM EDTA çözeltisiyle yıkanmıştır. Flakona Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücre tabakasının dağılmasında sonlandırılmıştır. Yeni kültür kapları hücre süspansiyonuna uygun biçimde eklenmiştir. Hücrelerin çoğalmasında flasklar %5 CO₂, %90 nem, 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Her hafta 2-3 defa yenilenerek hücre yoğunlukları %85 üstüne çıkıncaya dek sürdürülmüştür. %89 DMEM; %10 FBS; %1 PSA besiyerleri kullanılmıştır.

16'lı plate kuyucukları en az mililitredeki hücre sayıları 1×10^5 olacak şekilde ekilmiştir. xCELLigence cihazındaki e-plate kuyucukları toplam hacimi 100 µl besiyerine denk gelecek şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Herbir kuyucukta 1960 µl (hücre ve besiyeri) + 40 µl oksiresveratrol bulunacak şekilde hesaplanmıştır. Herbir kuyucuk %5CO₂, %90 nem, 37°C koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra oksiresveratrol uygulanmıştır.

TAS ve TOS Tayini

TAS solüsyonları ve örnekler eklenerek 10 dakika sonra spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Yöntemin işleyişi; numunedeki antioksidanlar, solüsyonlardaki koyu yeşil renge sahip 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikası (ABTS•+) katyonu indirgenip ABTS molekülüne dönüşümüyle tayin edilmektedir. Yöntemdeki kalibrasyon E vitaminine benzeyen ve "Trolox Equivalent" olarak isimlendirilen stabil antioksidan standardıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümü gerçekleştirilen TAS mmol Trolox Eq/L şeklinde verilmiştir [27].

TOS solüsyonları ve örnekler eklenerek 10 dakika sonra spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Yöntemin işleyişi; numunedeki oksidanların analizdeki solüsyonları Fe⁺² iyon komplekslerini okside edip Fe⁺³ şekle dönüşümüyle ilerlemektedir. Yöntemin kalibrasyonu hidrojen peroksitle yapılarak, sonuçlar µmol H₂O₂ Eq/L ile ifade edilmiştir [28].

OSİ Tayini

Oksidatif yük belirteci OSİ; TOS sonuçlarının TAS sonuçlarına bölümüyle bulunur. OSİ değerleri aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır [29].

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi} = \frac{\text{Total Antioksidan Seviyesi}}{\text{Total Oksidan Seviyesi} \times 10}$$

TFM Tayini

Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi; total fenolik madde miktar tayininde çoğunlukla kullanılmaktadır [30]. TFM ölçülmesinde, Gallik Asit (GA) standardı kullanılmış; 0.625 - 10 mg/ml oksiresveratrol konsantrasyonlarına denk gelen TFM bulunmuştur [31]. GA, %70'lik metanolde 1 mg/ml çözelti hazırlanıp; 8 mg oksiresveratrol 10 ml saf su içinde seyreltilmiştir. 1:10 suyla seyreltilip FC reaktifi hazırlanmıştır. 7.5 g Na₂CO₃, 90 ml su içinde çözülerek suyla 100 ml'ye ulaştırılmıştır. Oksiresveratrol konsantrasyonları tekrarlı şekilde eppendorf tüplerine eklenip üzerlerine, 125 µl FC reaktifi ilave edilmiştir. 5 dakika 30°C'de inkübasyon sonrasında karışım plate yüklenmiştir. Kuyucuklara 10 µl Na₂CO₃ eklenip, 90 dakika 30°C'de inkübe edilip ve 765 nm'de ölçülmüştür. TFM değerleri; oksiresveratrol örneklerinin miligramı başına miligram Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) şeklinde verilmiştir.

MTT ile IC₅₀ Tayini

Çalışmamızda 0.4 mM H₂O₂ ile hüresel hasara maruz kalan L929 hücre hatları üzerinde oksiresveratrolün 2.5-1000 µM konsantrasyonları zamana bağlı IC₅₀ değerlendirilmesinde yararlanılmıştır. IC₅₀; H₂O₂ maruziyeti olan ve olmayan numunelerde ve farklı saatlerde belirlenmiştir. Hücre hatlarına oksiresveratrol eklenmesinin ardından, H₂O₂'e 3 saat maruz kalan hücreler; plateleri %5 CO₂'li, neme sahip atmosferde 37°C'de 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon sonrasında çıkarılmıştır. Plateler; 24., 48. ve 72. saatlerde kuyucukların üstündeki bölgeler uzaklaştırılmıştır. Sonrasındaki işlemler karanlıkta yapılmıştır. Kuyucuklara 100 µl MTT çözeltisi ilave edilmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkan platelerin üzerindeki süpernatant atılmıştır. Hücrelere 200 µl izopropilalkol eklenmiştir. Spektrofotometrede ölçümler 570 nm'de alınmıştır. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism7.0 programından faydalanılarak bulunmuştur.

xCELLigence Cihazı ile Hücre Proliferasyon Tayini

xCELLigence Real Time Cell Analysis (RTCA) ile ölçümde %5 CO₂, %90 nem, 37°C şartlarına sahip inkübasyon seçilmiştir. Önce kuyucuklara 50 µl besiyeri eklenmiştir. Ardından kuyucuklarda 5x10³ hücre bulunacak biçimde 50 µl (hücre+besiyeri) çözeltisi eklenmiştir. Stok oksiresveratroler DMEM (%10 FBS-%1 PSA) karışımıyla dilüe edilerek 12.5-400 µM konsantrasyonlarına seyreltilmiştir. Konsantrasyonlar IC₅₀ değerleriyle belirlenmiştir. Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra, plate tabanlarına tutunmuş hücre üstündeki süpernatant atılmış ve oksiresveratrol çözeltileri kuyucuklarda 100'er µl olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol grubu içinde üç kuyucuk üzerine yalnızca 100 µl DMEM ilave edilmiştir. Oksiresveratrol uygulandıktan 1 saat sonra H₂O₂ (0.4 mM) herbir kuyucuğa uygulanarak hücre hasarı indüklenmiştir. Oksiresveratrol uygulanmadan önceki 24 saat ve oksiresveratrol uygulandıktan sonraki 72 saatte kuyucukların hücre canlılığı ve proliferasyonu xCELLigence RTCA sistem programıyla 15 dakika arayla gerçek zamanlı empedans ölçümlerinin alınabileceği biçimde ayarlanmış, 96 saatlik veriler kaydedilmiş ve hücre-zaman proliferasyonunu gösteren Şekil 5'deki grafiklere ulaşılmıştır.

Scratch Tayini

L929 hücreleri, mikropalakalara her bir kuyucukta 1 ml besiyerinde 2x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler iki gün 37°C'de, %90 nemlilikte ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Olympus CKX53 inverted mikroskopta incelererek hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında kuyular 200 µl steril pipet ucu vasıtasıyla kuyu tabanlarına birbirlerine paralel olacak şekilde aynı yönde boşluk (yara) açılmıştır. Kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve PBS ile kuyucuklar 2 defa yıkanmıştır. 25-3.125 µM oksiresveratrol, %10 FBS L929'da hazırlanmış ve yara açılan kuyulara 1 ml'ye tamamlanmıştır. Kontrol için bir kuyuya oksiresveratrol bulunmayan besiyerinden 1 ml ilave edilmiştir. Sonrasında kuyucukların

görüntüleri kaydedilmiş ve 0. saat, 24. saat, 48. saatteki mesafe görüntüleri kaydedilmiştir. Yara kapanma yüzdeleri aşağıdaki formül aracılığıyla hesaplanmıştır [32].

$$\%Proliferasyon = \frac{\text{Başlangıçtaki hasarın mesafesi-t anındaki ölçülmüş hasarın mesafesi}}{\text{Başlangıçtaki hasarın mesafesi}} \times 100$$

İstatistiki Analiz

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin istatistiki analizleri SPSS yazılımı (SPSS25.0 for Windows, IBM Co. II, USA) aracılığıyla yapılmıştır. ANOVA normal dağılımlı serilerinde uygulanmıştır. Post-Hoc ve Duncan çoklu karşılaştırma testlerinde uygulanmıştır. Normal dağılımlı veri analizlerinde eşleştirilmiş örneklem t-Testi uygulanmış ve veriler ortalama \pm standart sapma biçiminde sunulmuştur. İstatistiki anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ değeri baz alınmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

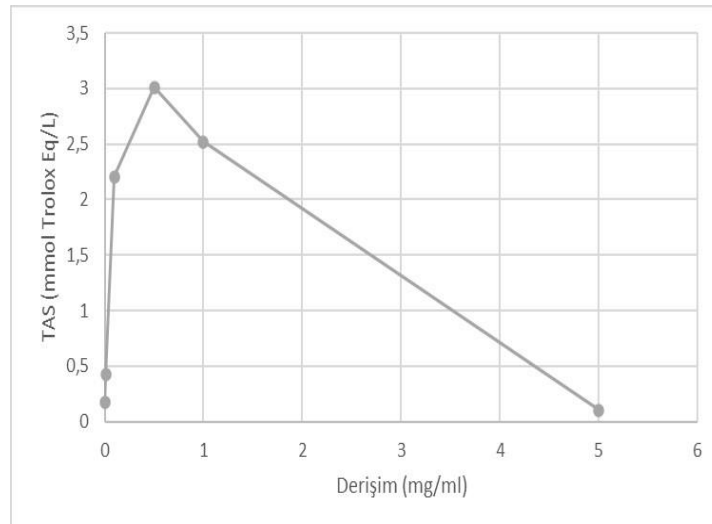
TAS, TOS ve OSİ Analiz Verileri

TAS, TOS ve OSİ verileri Tablo 1’ de ve Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3’de belirtilmiştir.

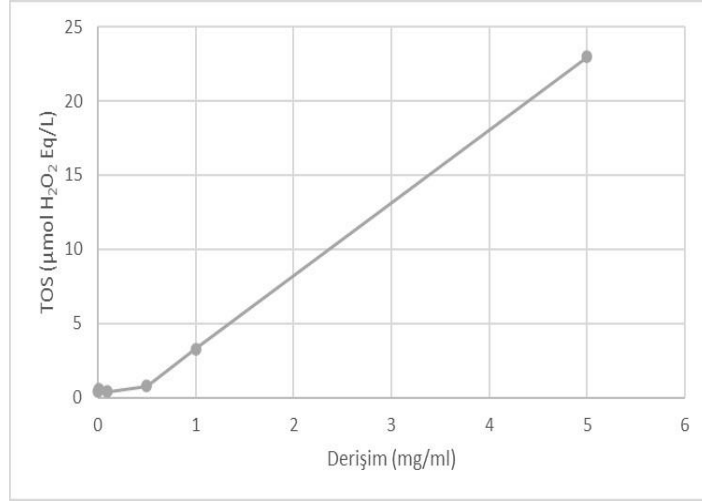
Tablo 1. Oksiresveratrole ait TAS, TOS ve OSİ verileri

Konsantrasyon (mg/ml)	TAS (mmol/l)	TOS (μ mol/l)	OSİ
0.0001	0.17 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.22 ± 0.03
0.01	0.42 ± 0.08	0.59 ± 0.08	0.14 ± 0.03
0.1	2.20 ± 0.13	0.40 ± 0.07	0.01 ± 0.00
0.5	3.00 ± 0.30	0.77 ± 0.52	0.02 ± 0.09
1.0	2.52 ± 0.18	3.26 ± 0.19	0.12 ± 0.07
5	0.10 ± 0.09	22.96 ± 2.57	37.92 ± 1.7

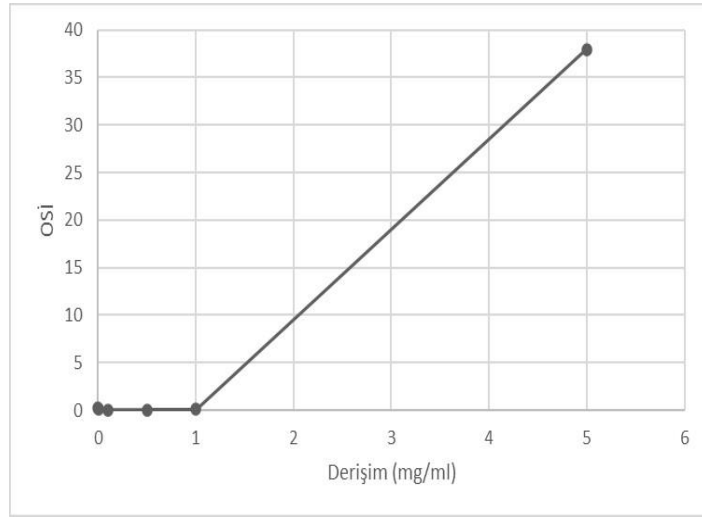
Veriler Ortalama \pm SD olarak belirtilmiş ve analiz maddeleri 3 tekrarlı çalışılmıştır ($p < 0.001$).



Şekil 1. Oksiresveratrolün TAS değerlerinin konsantrasyonlara bağlı değişimleri



Şekil 2. Oksiresveratrolün TOS değerlerinin konsantrasyonlara bağlı değişimleri



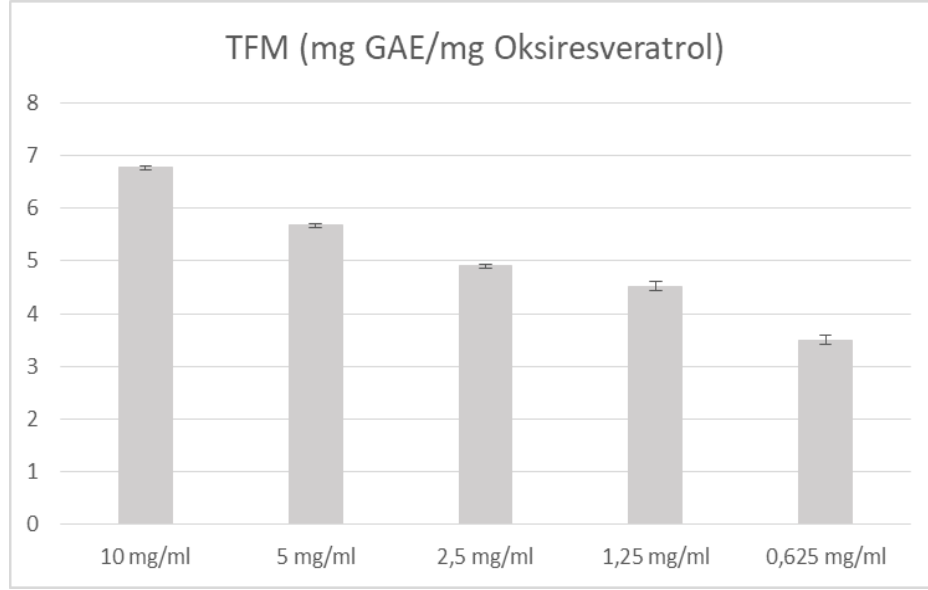
Şekil 3. Oksiresveratrolün OSİ değerlerinin konsantrasyonlara bağlı değişimleri

TFM Tayini Verileri

Oksiresveratrolün seyreltilerek 10-0.625 mg/ml'ye değişen konsantrasyonlardaki TFM verileri Tablo 2'de ve Şekil 4'de ise Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) cinsinden değerleri görülmektedir. Tablo 2'de ve Şekil 4'de de gözlendiği gibi, oksiresveratrolün düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru gidildikçe daha yüksek TFM'ye sahip olduğu gözlemlenmiştir ve bu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$).

Tablo 2. Oksiresveratrol TFM içeriği

Oksiresveratrol Derişimleri (mg/ml)	Oksiresveratrol mg GAE/mg
0.625	3.50 ± 0.08 ^d
1.25	4.52 ± 0.09 ^c
2.5	4.90 ± 0.04 ^c
5	5.68 ± 0.03 ^b
10	6.77 ± 0.05 ^a



Şekil 4. Oksiresveratrolün TFM içeriği ($p < 0.001$).

MTT Tayini IC₅₀ Verileri

L929 hücrelerinin 96 kuyulu mikropalakalara hücre ekiminin ardından 2,5 μM ile 1000 μM arası 20 farklı oksiresveratrol derişimi ve kontrol olarak ise oksiresveratrol içermeyen besiyeri kullanılmıştır. 24., 48. ve 72. saatteki deney grupları oluşturulmuştur. Konsantrasyonlar üçer defa tekrarlanarak MTT canlılık tayini 570 nm'de yapılmıştır. Hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı yüzdesi(\%)} = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Kontrolün Absorbansı}} \times 100$$

L929 fibroblast hücreleri MTT tayini ile ulaşılan verilerle oksiresveratrolün; hem H_2O_2 'e maruz bırakılan hem de H_2O_2 'maruz bırakılmayan L929 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri bulunmuş ve Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3. IC₅₀ değerleri

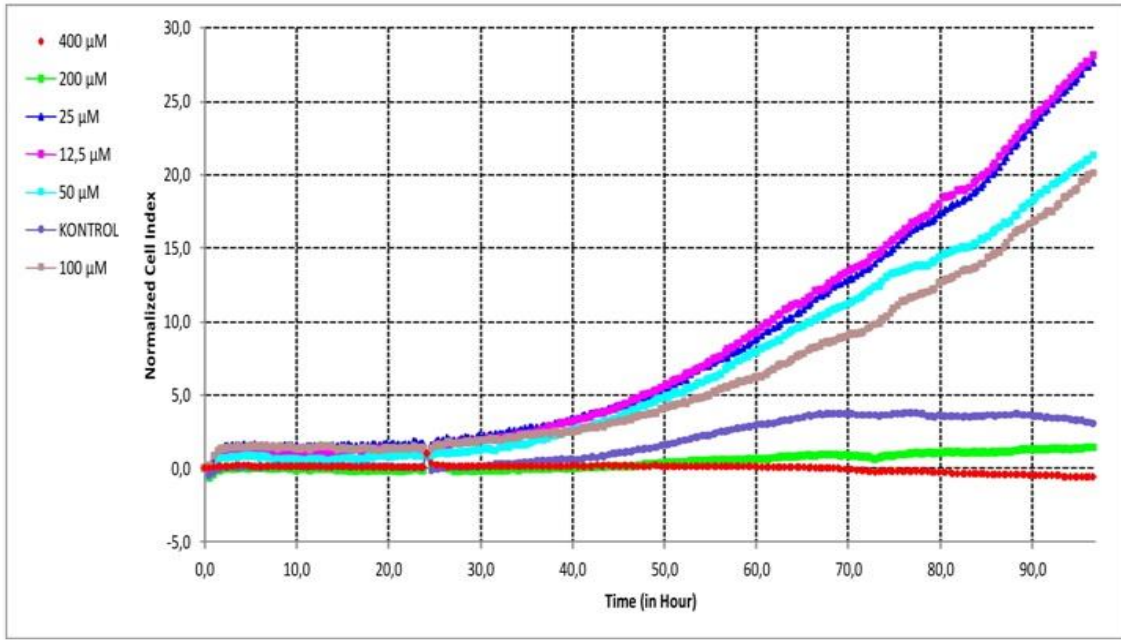
Zaman	Oksiresveratrol(μM)	Oksiresveratrol+ H_2O_2 (μM)
24. saat	151.2	101.7
48. saat	192.8	90.1
72. saat	214.2	109.7

IC₅₀ verileri; maddelerin maksimum biyolojik cevabının yarısının inhibe olmasını sağlayan konsantrasyonu ifade etmektedir. Araştırmamızda MTT tayinindeki hücre canlılığının %50 oranındaki düşüşü tespit edilmiştir. Tablo 3'de hücre hatlarına yalnızca oksiresveratrol ya da oksiresveratrol+ H_2O_2 uygulandığında elde edilen IC₅₀ verileri gözlenmektedir.

xCELLigence ile Proliferasyon Verileri

L929 hücre hatlarının 72 saatte tüm birimlerdeki hücre proliferasyonu, hücre empedans verileri Şekil 5'de gösterilmiştir. Hücrelerin kuyucuklara ekiminden 24 saat sonra oksiresveratrol uygulanmıştır. 1 saatin ardından H_2O_2 'e maruz bırakılarak hücrelerde hasar oluşturulmuştur. Daha sonra 72 saat hücrelerin proliferasyonu takip edilmiştir. İlk 24 saatte, her ne kadar 400 μM , 200 μM oksiresveratrolün

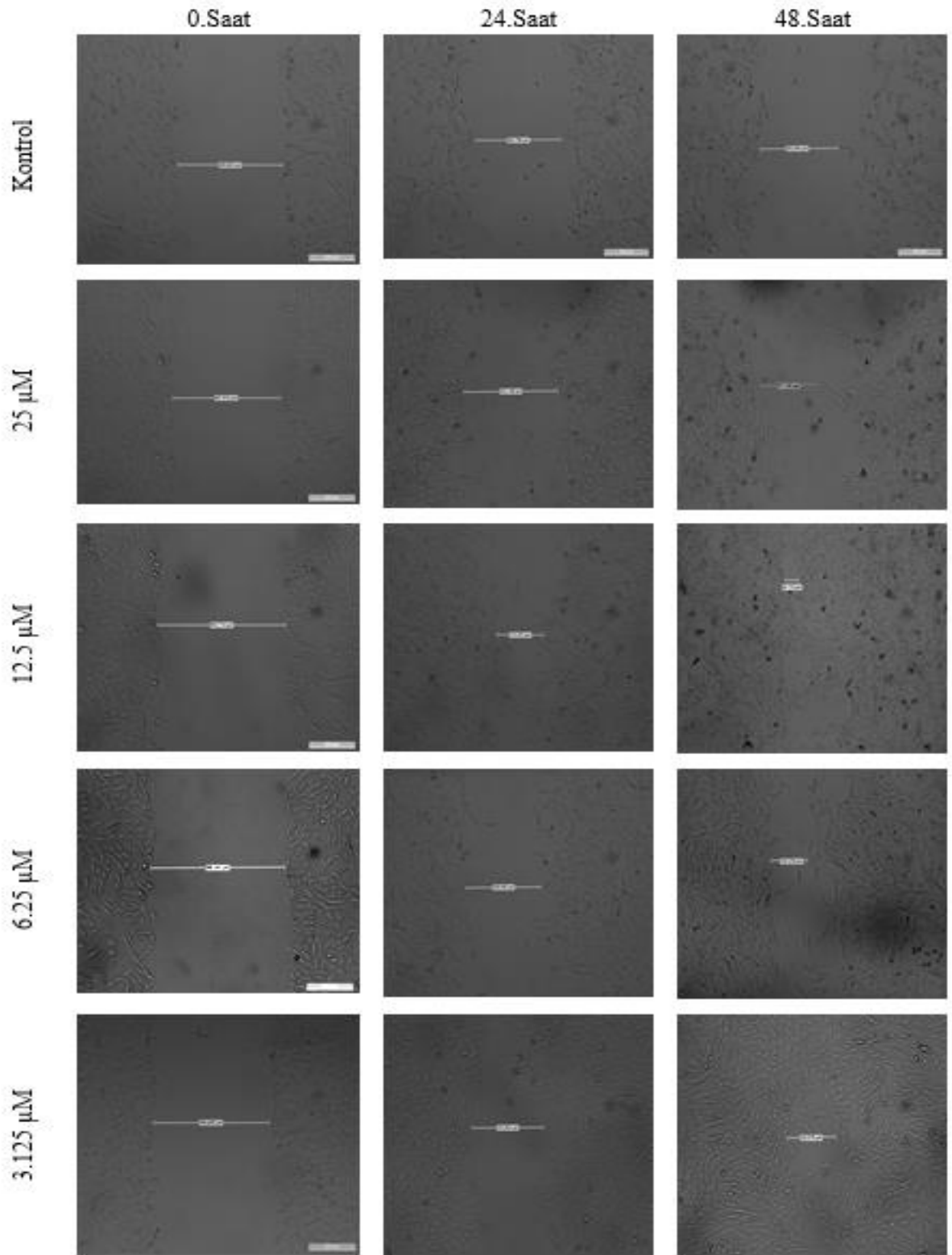
uygulamasının kontrol grubuna göre proliferasyonu düşürdüğü; 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM konsantrasyonlarında proliferasyonu yükselttiği görülse de bütün konsantrasyonlarda çok fazla bir değişiklik gözlenmemiş ve bu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). İkinci 24 saatte konsantrasyonlardaki değişiklikler görülmeye başlanmıştır; 400 μM , 200 μM oksiresveratrol konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre proliferasyon düşmüştür; 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM konsantrasyonlarında proliferasyon yükselmiştir. Üçüncü 24 saatte konsantrasyonlardaki değişiklikler daha da görülür hale gelmiştir; 400 μM , 200 μM oksiresveratrol konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre proliferasyondaki düşüş çok fazla değişmemiş; 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM konsantrasyonlarındaki proliferasyondaki yükselişler öncekilere nazaran daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmamızda kullanılan en küçük konsantrasyona tekabül eden 12.5 μM , L929 hücrelerdeki proliferasyonda en üst düzeye ulaştırmış ve yükselen konsantrasyona nazaran fibroblast hücre proliferasyonlarını ilerleyen zamana oranla düşürmüştür.



Şekil 5. xCELLigence ölçüm grafikleri ($p < 0.001$).

Scratch Tayini Proliferasyon Verileri

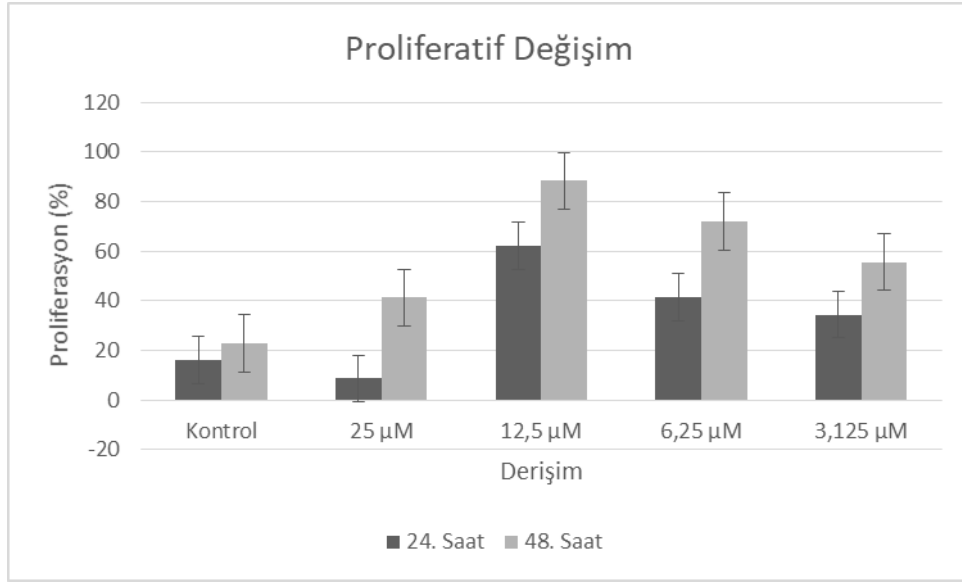
L929 hücreleri mikropalaklara ekilmiş ve 24 saat sonra mikropalak kuyucuklarına paralel şekilde çizgiler yapılmıştır. Dört ayrı oksiresveratrol konsantrasyonu kullanılmış ve hücrelerin değişik zamanlardaki migrasyonlarının mikroskopik görüntüleri Şekil 6'da sunulmuştur. Hasarlı hücrelerde değişik oksiresveratrol konsantrasyonu için proliferatif davranışları sunulmuştur (Şekil 7, Tablo 4). 12.5 μM oksiresveratrol konsantrasyonu için 24. saatteki %62, 48. saatteki %88'lik hücre proliferasyonu ile önceki numunelerden daha yüksek iyileşme görülmüştür. Oksiresveratrolün 25 μM konsantrasyonu ise 24. saatteki %8, 48. saatteki %41'lik hücre proliferasyonu ile görece daha düşük düzeyde bir proliferasyon düzeyine ulaşılmıştır. Araştırmamızdaki tayin işlemleri sırasında istatistiksel olarak eşleştirilmiş örneklem t-Testi'nden faydalanılarak istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir (Şekil 7, $p < 0.01$). 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM oksiresveratrol konsantrasyonlarının yükselişleriyle beraber hücrelerdeki proliferasyon inhibisyonuna dönüşmüştür.



Şekil 6. Scratch tayinindeki mikroskop görüntüleri

Tablo 4. Hasarlı hücrelerdeki proliferatif değişme

Derişim (μM)	0. Saatteki Hasarın Mesafesi (μm)	24. Saatteki Hasarın Mesafesi (μm)	48. Saatteki Hasarın Mesafesi (μm)	24. Saatteki Proliferasyonu (%)	48. Saatteki Proliferasyonu (%)
Kontrol	456.60	382.75	352.64	16.17	22.76
3.125	496.88	325.92	220.57	34.40	55.60
6.25	580.44	339.04	162.22	41.58	72.05
12.5	553.71	210.32	64.11	62.01	88.42
25	461.91	422.10	271.10	8.61	41.30

**Şekil 7.** Oksiresveratrolün proliferatif değişimi

Araştırmamızda farklı konsantrasyonlardaki oksiresveratrolün, H_2O_2 'e maruz kalmasıyla hücrelerde hasar oluşturulmuş; L929 hücre hattındaki proliferatif, sitotoksik etkilerin kıyaslanması hedeflenmiştir. Yapılan araştırmanın birisinde; viral enfeksiyonda, yara iyileşmesinde oluşan inflamatuvar yanıt oksidatif stres düzeyinin indirilmesinin ilk emarelerinin antioksidan seviyesindeki artış olduğu gözlenmiştir [33]. Çalışmamızda da, yukarıdaki çalışmaya benzer bir yara iyileşme durumu tıpkı enfeksiyon iyileşmesindeki gibi oksiresveratrolün antioksidan kabiliyetinden yararlanılarak oksidatif stresin azaltılabileceği düşünülmektedir.

Bir başka çalışmada; TFM ile TAS değerleri arasında doğru orantı bulunduğu ifade edilirken; [34,35] bir başka araştırmacı grubu ise TFM ile TAS arasındaki bağda doğru orantının bulunmayacağını belirterek öngörülenden daha karmaşık bir sistemi olduğunu belirtmişlerdir [36,37]. Araştırmamızda oksiresveratrolün 10 mg/ml'den 0.625 mg/ml'ye kadar farklılaşan konsantrasyonlardaki TFM içeriği düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara doğru daha yüksek TFM'si gözlemlenmiş, bu istatistiksel olarak ($p < 0.001$) ve ulaşılan veriler TFM miktarı yüksek numunelerin yüksek antioksidan kapasitesi olacağı görüşüne katkı sağlamaktadır.

Oksiresveratrolün literatürde; TOS, TAS, OSİ değerleri çalışmamız öncesinde araştırılmamıştır. Farklı bitkilerdeki araştırmalarda TAS verileri; *Silybum marianum*, *Allium calocephalum*, *Rhus coriaria* var. *zebaria*, *Mentha longifolia*, *Rosa canina*, *Salvia multicaulis* ve *T. spicata* sırasıyla 5.767; 5.853; 7.342; 3.628; 4.602; 6.434 ve 8.39 mmol/l şeklinde gösterilmiştir. TOS verileri sırayla 12.144; 16.288; 5.170; 4.046; 6.294; 22.441 ve 6.53 $\mu\text{mol/l}$ şeklinde gösterilmiştir. OSİ verileri sırayla 0.211; 0.278; 0.071; 0.112; 0.138; 0.349 ve 0.07 şeklinde gösterilmiştir [38-43]. Araştırmamızdaki OSİ verileri yukarıdaki araştırmalara nazaran daha düşük seviyede olduğu gözlemlenmektedir. Bu kapsamda, oksiresveratrol yukarıdaki bitkilere göre endojen antioksidan moleküllere karşı direncinin fazla

olduğunu düşündürmektedir. Oksiresveratrolün; güçlü antioksidan olması düşük OSİ düzeylerine neden olduğunu düşündürmektedir. Yukarıdaki araştırmalarla kıyaslandığında oksiresveratrol için TAS, TOS değeri; *S. marianum*, *A. calocephalum*, *R. coriaria*, *M. longifolia*, *R. canina*, *S. multicaulis*, *T. spicata*, *B. rapa*. vb. bitkilerden düşüktür. Araştırmamızda oksiresveratrolün 0.5 mg/ml derişiminde yüksek TAS değerine ulaşırken; daha yüksek derişimlerde ise belkide yapısında meta-hidroksi fonksiyonel grubu barındırmasından dolayı TAS değerinde düşüş gözlenmiştir. Oksiresveratrol konsantrasyon değışıyle, antioksidan nitelikten oksidan niteliğe geçışı görülmüştür. Oksiresveratrolün özelliğindeki bu değışim molekül yapısında orto-hidroksi fonksiyonel gruba sahip olmayan oksiresveratrolün; ABTS radikalini indirgeme yeteneğı yukarıdaki bitkilerden daha düşük olabileceğinin bir göstergesi olduğunu düşündürmektedir. Araştırmamızdaki TOS ve OSİ verileri ise yukarıdaki araştırmalarla paralellik göstermektedir.

Yapılan araştırmaların bazılarında, resveratrolün IC₅₀ değerinin 10 - 100 nmol/l olduğu ve bu değerin kanserler arasında farklı olabileceğini göstermiştir [44]. Diğer bir araştırmada; resveratrolün IC₅₀ değeri, 24 saat inkübasyonda 87.5 µM, 48 saat inkübasyonda 85.5 µM konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir [45]. Araştırmamızda hücre hattına sadece oksiresveratrol uygulandığında; IC₅₀ değeri sırayla 24 saatte 151.2 µM, 48 saatte 192.8 µM ve 72 saatte 214.2 µM bulunmuş; H₂O₂'e maruz kalan hücre hatlarında oksiresveratrol uygulandığında, IC₅₀ değeri sırayla 24 saatte 101.7 µM, 48 saatte 90.1 µM ve 72 saatte 109.7 µM bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında resveratrolle benzer özellikler içermesi nedeniyle oksiresveratrolün de antikanserojen etkili olabileceğini düşündürmektedir.

xCELLigence cihazıyla proliferasyon ölçümünde; hücre ekiminin ardından 24 saat sonra H₂O₂'e üç saat maruz bırakılarak hücreler hasarlanmış ve sonrasında 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM oksiresveratrol konsantrasyonları L929 hücre hatlarına uygulanarak 48 saat proliferasyon takip edilmiştir. 400 µM ve 200 µM oksiresveratrol uygulanması kontrol grubunda 48 saat proliferasyonu düşürdüğü gözlemlenmiştir. 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM konsantrasyonları kıyasla diğer yüksek konsantrasyonlara nazaran oksiresveratrol uygulandığında ise kontrol grubunda 48 saat proliferasyonu yükselttiği gözlemlenmiştir. Araştırmamızdaki 12.5 µM konsantrasyonu, L929 proliferasyonunda en yüksek düzeye ulaştırmıştır. 12.5 µM'lık konsantrasyon; xCELLigence cihazındaki ölçümde ve scratch analizinde en yüksek proliferasyonu oluşturmuştur.

Yapılan bir araştırmada; antioksidan özellikteki *A. Speciosa* uygulanan L929 fibroblast hücreleri 3.125-1.56 µg/ml derişimlerinde proliferasyonun araştırmamızdaki gibi 72. saatte de devam ettiği bulunmuştur [46]. Araştırmamızdaki 12.5 µM oksiresveratrol konsantrasyon yüksek proliferasyonu işaret ederek L929 hücre hatlarında da uyumlu neticelere ulaşılmıştır. Bundan dolayı da oksiresveratrolün de resveratrol benzeri antikanserojen olabileceğı yeni araştırmalarla desteklenebilecektir.

Duman'ın yaptığı araştırmada, yara iyileşmesinde HEC1A hücrelerinde D vitamininin migrasyona etkisi alfa-kalsidolün, kalsitriolün yüksek konsantrasyonları için yara mesafesini ilk 24 saate düşürmüştür [47]. Pereira ve arkadaşlarının araştırmasında; *L. Pacari* yaprağının HELp 0.1-0.03 mg/ml konsantrasyonlarında L929 hücre hatlarındaki migrasyonu hızlı hale getirerek proliferasyonu arttırmıştır [48]. Araştırmamızda da; 12.5 µM oksiresveratrol konsantrasyonunda 24. saatteki %62, 48. saatteki %88'lik proliferasyonla öteki numunelerden daha çok iyileşmeye sebep olmuştur. 25 µM oksiresveratrol konsantrasyonunda ise 24. saatteki %8, 48. saatteki %41'lik proliferasyonla diğer konsantrasyonlara göre daha düşük proliferasyon düzeyine ulaşılmıştır.

TFM ile TAS arasındaki bağ TFM içeriğı yüksek numunelerin yüksek TAS değeri olacağını desteklediğı belirlenmiştir. Oksiresveratrolün sitotoksitite analizleriyle etkili konsantrasyonları, IC₅₀ değeri bulunmuş ve elde edilen veriler oksiresveratrole antioksidan özellik yüklediğı belirlenmiştir.

Araştırmamızdaki 12.5 µM oksiresveratrol konsantrasyonu; hem xCELLigence cihazı ölçümünde hem de scratch analizinde en yüksek proliferasyona ulaştırmıştır. MTT hücre canlılık analizlerinde ise 640 µM oksiresveratrol konsantrasyonu proliferasyonda daha yüksek bir seviyeye ulaştırmıştır. Proliferasyonların belirlenmesinde; anlık ölçüm alınabilmesi, kontaminasyon riskinin düşük seviyede oluşu ve sürecin kontrolünün mümkün oluşu sebebiyle xCELLigence cihazıyla tayinlerin ileride MTT metoduna nazaran daha çok kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bundan dolayı da oksiresveratrolün hücre proliferasyonunda kullanımında gerekli konsantrasyonları daha ideal değerlerde belirlenebilecektir.

Oksiresveratrolün, L929 hücre hatlarında ROT oluşturabilecek maddelerin toksisitesini düşürmede yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ancak bunun oluşturulabilmesinde sitotoksitenin meydana geliş süreçlerinin incelendiği daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulabilecektir. Aynı zamanda oksiresveratrolün antioksidan, oksidan özellikleri *in-vivo* araştırmalarla desteklenmeli ve etki mekanizmaları da aydınlatılmalıdır. Oksiresveratrolün bu özellikleri; antioksidan yokluğunda meydana gelebilen rahatsızlıklar için geliştirilecek kişiye özgü tedavilerde, bu tedavilere katkı sağlayan tamamlayıcı terapötik bir maddede olarak yararlanılabileceği düşünülmektedir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: F.M.A., Y.B.; Tasarım: F.M.A., Y.B.; Denetim: F.M.A., Y.B.; Kaynaklar: F.M.A., Y.B.; Malzemeler: F.M.A., Y.B.; Veri Toplama ve/veya İşleme: F.M.A., Y.B.; Analiz ve/veya Yorumlama: F.M.A., Y.B.; Literatür Taraması: F.M.A., Y.B.; Makalenin Yazılması: F.M.A., Y.B.; Kritik İnceleme: F.M.A., Y.B.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Makale yazarları için gerçek, potansiyel ya da algılanan çıkar çatışması bulunmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışmamızın deney protokolü Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Birim Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar tarihi: 10/03/2021; Karar No: 2021/3).

KAYNAKLAR

1. Yan, L.J., Sohal, R.S. (1998). Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 12896-12901. [CrossRef]
2. Yan, L.J. (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology*, 2, 165-169. [CrossRef]
3. Dokuyucu, R., Karateke, A., Gokce, H., Kurt, R.K., Ozcan, O., Ozturk, S., Tas, Z.A., Karateke, F., Duru, M. (2014). Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 183, 23-27. [CrossRef]
4. Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316. [CrossRef]
5. Motor, S., Öztürk, S., Özcan, O., Gürpınar, A.B., Can, Y., Yuksel, R., Yenin, J.Z., Seraslan, G., Öztürk, O.H. (2014). Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(4), 1089-1093.
6. Aydın, M., Selcoki, Y., Nazlı, Y., Çolak, N., Serkan Yalçın, K., Canbal, M., Demirçelik, B., Yiğitoğlu, R., Eryonucu, B. (2012). Relationship between total antioxidant capacity and the severity of coronary artery disease. *Journal of Clinical & Experimental Investigations*, 3(1), 22-28. [CrossRef]
7. Şahin, D.Y., Elbasan, Z., Gür, M., Türkoğlu, C., Özalton, B., Sümbül, Z., Çaylı, M. (2012). Relationship between oxidative stress markers and cardiac syndrome X. *Journal of Clinical & Experimental Investigations*, 3(2), 174-180. [CrossRef]
8. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. [CrossRef]
9. Kay, C.D. (2010). The future of flavonoid research. *British Journal of Nutrition*, 104(S3), 91-95. [CrossRef]
10. Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38-50. [CrossRef]
11. Güvenç, M. (2008). PhD Thesis. The effects of resveratrol, lipoic acid and vitamin C on lipophilic vitamins, cholesterol and fatty acid composition in liver, kidney and erythrocytes of type-1 diabetic rats. Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Science, Fırat University, Elazığ, Turkey.
12. Altınışık, M., (2000). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Erişim adresi <https://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>. Erişim tarihi: 05.04.2023.

13. Gupta, A.K., Rather, M.A., Kumar, J.A., Shashank, A., Singhal, S., Sharma, M., Mastinu, A. (2020). *Artocarpus lakoocha* roxb. and *Artocarpus heterophyllus* lam. flowers: New sources of bioactive compounds. *Plants*, 9(10), 1329. [\[CrossRef\]](#)
14. Maneechai, S., Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Palanuvej, C., Ruangrunsi, N., Sirisa-Ard, P. (2009). Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad'. *Medical Principles and Practice*, 18(3), 223-227. [\[CrossRef\]](#)
15. Wikipedia Web site. (2021). from https://tr.wikipedia.org/wiki/Beyaz_dut. Erişim tarihi: 07.04.2021.
16. Kim, J.K., Kim, M., Cho, S.G., Kim, M.K., Kim, S.W., Lim, Y.H. (2010). Biotransformation of mulberroside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 631-637. [\[CrossRef\]](#)
17. Kim, Y.M., Yun, J., Lee, C.K., Lee, H., Min, K.R., Kim, Y. (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16340-16344. [\[CrossRef\]](#)
18. Hu, S., Chen, F., Wang, M. (2015). Photoprotective effects of oxyresveratrol and Kuwanon O on DNA damage induced by UVA in human epidermal keratinocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 28(3), 541-548. [\[CrossRef\]](#)
19. Radapong, S., Sarker, S.D., Ritchie, K.J. (2020). Oxyresveratrol possesses DNA damaging activity. *Molecules*, 25(11), 2577. [\[CrossRef\]](#)
20. Likhitwitayawuid K., Sritularak B., Benchanak K., Lipipun V., Mathew J., Schinazi R.F. (2005). Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. *Natural Product Research*, 19, 177-182. [\[CrossRef\]](#)
21. Likhitwitayawuid K., Supudompol, B., Sritularak, B., Lipipun, V., Rapp, K., Schinazi, R.F. (2005). Phenolics with anti-HSV and anti-HIV activities from *Artocarpus gomezianus*, *Mallotus pallidus* and *Triphasia trifoliat*. *Pharmaceutical Biology*, 43, 651-657. [\[CrossRef\]](#)
22. Chuanasa, T., Phromjai, J., Lipipun, V., Likhitwitayawuid, K., Suzuki, M., Pramyothin P., Hattori, M., Shiraki, K. (2008). Anti-herpes simplex virus activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous infection in mice. *Antiviral Research*, 80, 62-70. [\[CrossRef\]](#)
23. Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., Horn, T.F.W. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*, 9, 64-76. [\[CrossRef\]](#)
24. Andrabi, S.A., Spina, M.G., Lorenz, P., Ebmeyer, U., Wolf, G., Horn, T.F.W. (2004). Oxyresveratrol (trans -2,3,4,5-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Research*, 1017, 98-107. [\[CrossRef\]](#)
25. Breuer, C., Wolf, G., Andrabi, S.A., Lorenz, P., Horn, T.F.W. (2006). Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. *Neuroscience Letter*, 393, 113-118. [\[CrossRef\]](#)
26. Sunilkumar, D., Drishya, G., Chandrasekharan, A., Shaji, S.K., Bose, C., Jossart, J., Nair, B.G. (2020). Oxyresveratrol drives caspase-independent apoptosis-like cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells through the induction of ROS. *Biochemical Pharmacology*, 173, 113724. [\[CrossRef\]](#)
27. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285. [\[CrossRef\]](#)
28. Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-1111. [\[CrossRef\]](#)
29. Celal, B., Sevindik, M., Akgül, H., Selamoğlu, Z. (2019). Oxidative stress index and antioxidant capacity of *Lepista nuda* collected from Gaziantep/Turkey. *Sigma*, 37(1), 1-5.
30. Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93-103.
31. Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55. [\[CrossRef\]](#)
32. Twilley, D., Lall, N. (2018). The role of natural products from plants in the development of anticancer agents. In: Mandal, S.C., Mandal, V., Konishi, T. (Eds.), *Natural Products and Drug Discovery*, (pp. 139-178). Elsevier. [\[CrossRef\]](#)
33. Sırmatel, F., Duygu, F., Çelik, H., Selek, Ş., Sırmatel, Ö., Gürsoy, B., Eriş, F.N. (2009). Kronik Viral Hepatit Olgularında Total Oksidatif Seviye ve Total Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi. *Klinik Journal/Klimik Dergisi*, 22(3), 92-96.
34. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. [\[CrossRef\]](#)

35. Oliveira, A.M.F., Pinheiro, L.S., Pereira, C.K.S., Matias, W.N., Gomes, R.A., Chaves, O.S., Assis, T.S. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. *Antioxidants*, 1(1), 33-43. [\[CrossRef\]](#)
36. Muchuweti, M., Nyamukonda, L., Chagonda, L.S., Ndhkala, A.R., Mupure, C., Benhura, M. (2006). Total phenolic content and antioxidant activity in selected medicinal plants of Zimbabwe. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 33-38. [\[CrossRef\]](#)
37. Kaur, S., Mondal, P. (2014). Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(1), 23-28. [\[CrossRef\]](#)
38. Sevindik, M., Akgul, H., Pehlivan, M., Selamoglu, Z. (2017). Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(7), 4757-4763.
39. Pehlivan, M., Sevindik, M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5), 628-631. [\[CrossRef\]](#)
40. Mohammed, F.S., Akgül, H., Sevindik, M., Khaled, B.M.T. (2018). Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(8), 5694-5702.
41. Mohammed, F.S., Karakaş, M., Akgül, H., Sevindik, M. (2019). Medicinal properties of *Allium calcephalum* collected from Gara Mountain (Iraq). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(10), 7419-7426.
42. Mohammed, F.S., Pehlivan, M., Sevindik, M. (2019). Antioxidant, antibacterial and antifungal activities of different extracts of *Silybum marianum* collected from Duhok (Iraq). *International Journal of Secondary Metabolite*, 6(4), 317-322. [\[CrossRef\]](#)
43. Mohammed, F.S., Şabik, A.E., Sevindik, E., Pehlivan, M., Sevindik, M. (2020). Determination of antioxidant and oxidant potentials of *Thymbra spicata* collected from Duhok-Iraq. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(5), 1171-1173. [\[CrossRef\]](#)
44. Chen, Y., Tseng, S.H., Lai, H.S., Chen, W. J. (2004). Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery*, 136(1), 57-66. [\[CrossRef\]](#)
45. Kara, A. (2012). Doktora Tezi. Resveratrolün Meme Kanseri Hücre Kültüründeki P53 Aracılı Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), İmmüsitokimya ve MTT Yöntemleriyle Araştırılması. Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye.
46. Arat, E. (2012). Yüksek Lisans Tezi. Alchemilla L. Cinsine Ait Bazı Türlerden Elde Edilen Ekstrelerin MCF-7 Kanseri ve L929 Fibroblast Hücrelerine Etkisi. Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, Türkiye.
47. Duman, İ. (2018). Yüksek Lisans Tezi. Endometriyum Adenokarsinoma HEC1A Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon, Migrasyon ve İnvazyon Üzerine Etkisi. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye.
48. Pereira, L.O.M., Vilegas, W., Tangerina, M.M.P., Arunachalam, K., Balogun, S.O., Orlandi-Mattos, P. E., Oliveira Martins, D.T. (2018). *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 337-350. [\[CrossRef\]](#)