

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



LAWSONE MOLEKÜLÜNÜN ANTIOKSİDAN AKTİVİTE,
PHENOLİK İÇERİK VE İNDİRGEYİCİ GÜÇ KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Enayatullah RAHMANY

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Mart, 2022

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**LAWSONE MOLEKÜLÜNÜN ANTIOKSİDAN AKTİVİTE,
PHENOLİC İÇERİK VE İNDİRGEYİCİ GÜÇ KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Enayatullah RAHMANY

(Y1713.040007)

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Avni ÇAKICI

Mart, 2022

ONAY FORMU



YEMİN METNİ

Yüksek lisans olarak sunduğum “Lawsone Molekülünün Antioksidan Aktivite, Fenolik İçerik ve İndirgeyici Güç Kapasitesinin Belirlenmesi” adı çalışmanın, tezin proje sayfasını sonuçlanmasına kadar bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim (03/02/2022)

Enayatullah RAHMANY

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin planlanması ve yürütülmesi aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, değerli tavsiyeleri ile çalışmaya farklı pencerelerden bakmamı sağlayan, sabır ve özveriyle çalışmalarına destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Avni Çakıcı'ya teşekkürlerimi sunarım. Tüm bu süreç içerisinde tezimin oluşumunda ve analiz aşamalarında desteklerini esirgemeyen başta olmak üzere Prof. Dr. Yasin Bayır olmak üzere, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi çalışanlarına ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, zorluklar karşısında pes etmemeyi öğreten, başarılı olacağıma inanan, aldığım tüm kararlarda bana güvenen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen anneme ve babama teşekkür ederim.

Mart, 2022

Enayatullah RAHMANY

Gıda Mühendisi

İÇİNDEKİLER

YEMİN METNİ	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Lawson Molekülü	3
2.2. L929 Hücre Hattı	5
2.2.1. Hücre Kültürü Şartları	6
2.2.2. Kaynağına Göre Hücre Kültürü Sistemleri	7
2.2.3. Büyüme Şekillerine Göre Hücre Kültürü Sistemleri	7
2.3. Antioksidan Kapasite	8
2.3.1. Antioksidanlar ve Etki Mekanizması	8
2.3.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	9
2.3.3. Antioksidan Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri	10
2.4. Fenolik Bileşikler	10
2.4.1. Flavonoidler	11
2.4.2. Fenolik Asitler	12
2.4.3. Fenolik Polimerler	12
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Metot	13
3.2.1. L929 Hücre Hattı ve Lawson Molekülünün Hazırlanması, Canlılık Oranının Belirlenmesi Hücre Kültürü Şartları	13
3.2.2. Total Fenolik Madde (TFM) İçeriği Belirlenmesi	14
3.2.3. İndirgeyici Güç Tayini (İGT) Tayini	15
3.2.4. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini	15

3.2.5. İstatistiksel Analiz	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	17
4.1. L929 Proliferasyonu ve Canlılık Analizi	17
4.2. Total Fenolik Madde (TFM, TFC) İçeriğinin Belirlenmesi	18
4.3. İndirgeyici Güç Tayini (İGT)	20
4.4. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini	21
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	25
KAYNAKÇA	26
ÖZGEÇMİŞ.....	29

KISALTMALAR

DHP	: Dihidrojen Fosfat
GR	: Glutasyon Redüktaz
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
DMBA	: Dimetilbenzanthracene
EAC	: Elrich Ascites Carcinoma
HAT	: Hidrojen Atom Transferine
AOK	: Antioksidan Kapasitesi
SET	: Singlet Elektron Transferine
TOCS	: Toplam Oksidan Yakalama Aktivitesi
CL	: Kemiluminesans
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Oksidasyonu
FRAP	: Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Aktivitesi
TFM	: Total Fenolik Madde
İGT	: İndirgeyici Güç Tayini
TAS	: Total Antioksidan Kapasitesini

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Numunelerin fenolik madde içeriği	7
Tablo 2. Numunelerin indirgeyici güç özelliği	17
Tablo 3. Numunelerin antioksidan aktivitesi	19



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Lawson fragmanını içeren doğal ve sentetik biyoaktif naftokinonlar	9
Şekil 2. Lawson molekülünün kimyasal yapısı	9
Şekil 3. Düşük ve yüksek yoğunluklu L929 hücreleri	14
Şekil 4. Lawson'un L929 hücreleri üzerine 24. saat testi	15
Şekil 5. Lawson'un L929 hücreleri üzerine 48. saat testi	40
Şekil 6. Lawson'un L929 hücreleri üzerine 72. saat testi	40
Şekil 7. Lawson'un total fenolik madde içeriği	40
Şekil 8. Lawson'un indirgeyici güç tayini	40
Şekil 9. Lawson'un total antioksidan kapasitesi	40

LAWSONE MOLEKÜLÜNÜN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN, PHENOLİK İÇERİĞİNİN VE İNDİRGEYİCİ GÜÇ KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Lawsone, kına *Lawsonia inermis* L. yapraklarında bulunan kırmızı-turuncu renkli bir pigmenttir. Bu molekülün antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle sağlığı korumak amaçlı uygulamaları yaygındır. Bu çalışmada Lawson molekülünün, L929 hücreleri üzerindeki proliferasyon etkisi incelenmiş, ayrıca total antioksidan kapasitesi, indirgeyici güç özelliği ve toplam fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Lawson'un L929 hücre hattı üzerinde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri kontrol grubuna kıyasla inhibitör etkili olduğu bulunmuştur. 24. saatteki IC50 değeri 24.13 μ M, 48. Saatteki IC50 değeri 11.55 μ M ve 72. Saatteki IC50 değeri 63.95 μ M bulunmuştur. Lawsonun tüm konsantrasyonlarının, C vitamini ve troloksa göre kıyaslanırsa fenolik içeriğinin anlamlı bir biçimde oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Lawson'un azalan konsantrasyonda su ekstrelerinin indirgeyici güçlerinin doza bağlı olarak arttığı ve en yüksek indirgeyici gücün 0.625 mg/ml konsantrasyona ait olduğu tespit edilmiştir. Lawson'un 0.625 mg/ml konsantrasyonunda, en yüksek antioksidan kapasite tespit edilmiştir. En düşük aktivite ise 10 mg/ml'lik konsantrasyonda tespit edilmiştir. Sonuç olarak Lawson'un düşük dozlarda hücre canlılığı üzerinde proliferasyonu artırıcı, antioksidan kapasite artışı, total fenolik içeriği ve indirgeyici güç arttığı belirlenmiştir. Lawsone molekül in-vivo yara iyileştirme ve oksidan hasarı üzerine diğer modeller üzerine koruyucu potansiyel etkileri mümkün olabilir.

Anahtar kelimeler: *Lawsone, L929 hücresi, proliferasyon, antioksidan kapasite, indirgeyici güç, fenolik madde.*

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHENOLIC CONTENT AND REDUCTIVE POWER CAPACITY OF LAWSONE MOLECULE

ABSTRACT

Lawsonic acid is a red-orange pigment found in the leaves of henna *Lawsonia inermis* L. is widely used to protect health due to its antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory properties. The proliferation effect of Lawsonic acid on L929 cells was investigated, in addition, total antioxidant capacity, reducing power and total phenolic content were determined. The effects of Lawsonic acid on the L929 cell line at 24, 48 and 72 hours were found to be inhibitory compared to the control group. The IC₅₀ value at the 24th hour was found to be 24.13 μ M, the IC₅₀ value at the 48th hour was 11.55 μ M and the IC₅₀ value at the 72nd hour was 63.95 μ M. It was determined that all concentrations of Lawsonic acid had significantly lower phenolic content when compared to vitamin C and Trolox. It was determined that the reducing power of Lawsonic acid's water extracts increased with decreasing concentration, and the highest reducing power belonged to 0.625 mg/ml concentration. The highest antioxidant capacity was determined at Lawsonic acid's concentration of 0.625 mg/ml. The lowest activity was found at a concentration of 10 mg/ml. As a result, it was determined that Lawsonic acid increased proliferation, antioxidant capacity, total phenolic content and reducing power on cell viability at low doses. The potential protective effects of the Lawsonic acid molecule on other models of in-vivo wound healing and oxidant damage may be possible.

Keywords: *Lawsonic acid, L929 cell, proliferation, antioxidant capacity, reducing power, phenolic substance.*

1. GİRİŞ

Kinonlar ve özellikle de 1,4-naftokinon bileşikleri, doğada yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Doğal naftokinon türevleri, fonksiyonel metabolitler olarak çeşitli bitkilerden, mikroorganizmalardan, deniz organizmalarından vb. geniş çapta tanımlanmıştır (Babula vd., 2009). Doğal naftokinonların önemli hücre biyolojik ve farmakolojik özellikleri, çok sayıda çalışma ile kabul edilmiş durumdadır. Örneğin bitki ve bağırsak bakterileri kaynaklı vitamin K1 ve K2, kan pıhtılaşma tepkisinde hayati faktörlerdir ve eksikliği koagülopati riskini önemli ölçüde artırır. Özellikle genel olarak kullanılan bazı şifalı bitkilerde, shikonin ve plumbagin gibi naftokinonlar antimikrobiyal, böcek öldürücü, antiflojistik, yara iyileşmesi ve diğer etkileri uygulayan başlıca etkinlik bileşenleri olarak onaylanmıştır (Qiu vd., 2016; Raghu ve Karunakaran, 2014). Naftokinon bakımından zengin bitki özleri, dünya çapında halk hekimliğinde iyi bilinen antibakteriyel ve anti-inflamatuar preparatlardır (Qiu vd., 2018). Son yıllarda, özellikle 1,4-naftokinonlara karşı artan bir ilgi söz konusudur.

Lawson, *Lawsonia inermis* L. (kına) yapraklarında bulunan kırmızı-turuncu renkli bir pigmenttir. Kına bitkisinin özleri ve saflaştırılmış bileşeni, kozmetik ve tıbbi alanda yaygın olarak tercih edilmektedir. Halk hekimliğinde, antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve anti-inflamatuar dahil olmak üzere çeşitli aktiviteler için kullanılmaktadır (Pradhan vd., 2012). Farklı kanser hücre hatları üzerinde yapılan in vitro çalışmalar, lawson'un HCT-15'in büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Kamei vd., 1998). Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada sıçanlara 8 hafta süreyle ağızdan Lawson (200 mg/mL) verildiğinde, normal kolon mukozasının hücrelerini etkilemeden, kolon tümörlerinin hücre proliferasyonunu baskıladığını gösterilmiştir (Wang vd., 2017). Doğal olarak elde edilmiş Lawson'un antikanser aktivitesi hakkında çok az çalışma vardır. Çoğu araştırma, Lawson'un sentetik türevleri üzerinde yapılmakta ve çalışma sonuçları Lawson'un antikanser etkisinin olduğunu göstermektedir (Hamdoun vd., 2017; Oliveira vd., 2017).

Lawson'un hayvan çalışmasındaki etkinliğine bakılacak olursa, Lawson gastrointestinal kanalda bakteri aracılı ya da spontane bozunmaktadır. Bu da potansiyel antikanser özellikleri olan bir ajan olabilmesine işarettir (Yang vd., 2017).

Yapılan bazı çalışmalarda da 10-200 μM konsantrasyonlarda uygulanan Lawson'un, oksidatif fosforilasyon oranlarını arttırdığı bulunmuştur. Oksidasyon ve fosforilasyon süreçlerinin hafif ayrışmasının, ROS üretiminin sınırlandırılması nedeniyle hücreler için faydalı olabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, Lawson'un antioksidan etkisi, ROS'un doğrudan nötralizasyonu yoluyla ve mitokondriyal ROS üretimini modüle ederek meydana gelebilir. Son yıllarda, saflaştırılmış naftokinonlarla ilgili çalışmalar, bileşiklerin antikanser aktiviteye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Majiene vd., 2019).

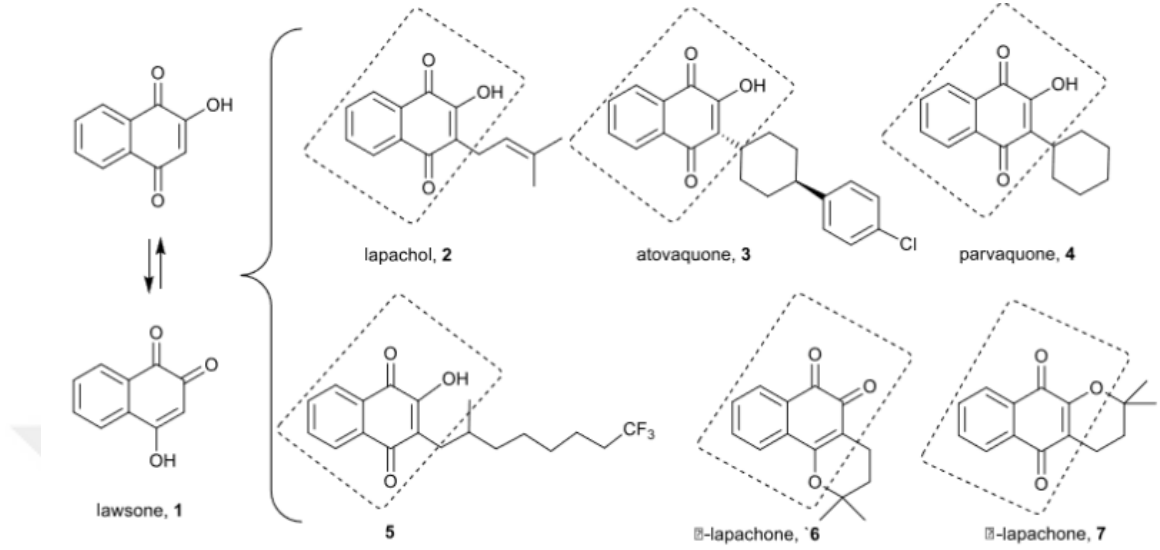
Yapılan bu çalışmada antioksidan etkileri bulunan Lawson'un L929 hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiş olup Lawson'un total antioksidan kapasitesi ve indirgeyici gücü ile ilişkidi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. lawson molekülü

Kinonlar doğada geniş bir dağılıma sahiptir ve sentetik ve doğal ürünlerinden bazıları kimya ve biyokimyanın birçok farklı alanında çok önemlidir. Solunum zincirinde elektron taşıyıcıları olarak birçok canlı hücrede, ayrıca kan pıhtılaşmasında ve glutamatların karboksilasyonunda temel bir rol oynamaktadır. Kinonlar antitümör, mollusisidal, antiparazitik, leishmanicidal, antiinflamatuvar, antifungal, antimikrobiyal ve tripanosidal özellikleri nedeniyle biyoaktif bileşiklerin sentezinde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Çeşitli çalışmalar, bu moleküllerin biyolojik aktivitelerinin, in situ karşılık gelen radikal anyon veya dianyon türlerini oluşturmak için bir ve/veya iki elektronu (redoks döngüsü) kabul eden orto veya para-kinonoid gruplarından kaynaklandığını belirtmektedir. Böylece yarı kinon radikalleri, süperoksit anyonları üreterek hücre içi hipoksik koşulların oluşumunu hızlandırır. Bu mekanizma yoluyla kinonlar, muhtemelen hücrelerde DNA replikasyonu için kritik olan bir grup enzim olan topoizomeraazlar gibi enzimleri etkileyerek memeli hücrelerinde sitotoksite gösterebilir (Jordão vd., 2015).

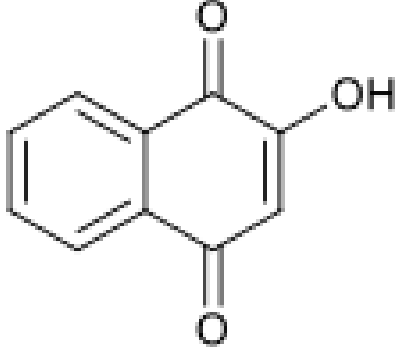
Kinon sınıfı, kinon halkası üzerinde bir hidroksi grubu taşıyan birkaç önemli sentetik ve doğal bileşik içerir. Spesifik olarak, Lawson (1) motifi ve onun izomerik formu olan 4-hidroksi-1,2-naftokinon, bir dizi değerli biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin ortak alt birimleridir ve örnekleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Lawson fragmanını içeren doğal ve sentetik biyoaktif naftokinonlar

Türevlerinin çoğu bitkilerde ve mantarlarda bulunan 1,4-naftokinon, insanlar tarafından da kullanılan bir maddedir. Örneğin, bitki metaboliti lawson (2-hidroksi-1,4-naftokinon), kınanın sarıdan turuncuya boyama özelliklerinden sorumlu malzemedir (Rahmoun vd., 2012).

Lawson (Şekil 2), 100 yılı aşkın bir süredir, çeşitli biyolojik olarak aktif bileşiklerin ve ilginç özelliklere sahip malzemelerin sentezi için başlangıç malzemesi olarak kullanılmaktadır (Jordão vd., 2015).



Şekil 2. Lawson molekülünün kimyasal yapısı (Jordão vd., 2015).

2- Hidroksi-1,4-naftokinon (1) veya Lawson veya hennotannik asit, doğal olarak oluşan en basit naftokinonlardan biridir. Doğal Turuncu 6 (C.I. 75480) olarak sınıflandırılan bu kırmızı-turuncu pigment, kurutulmuş toz haline getirilmiş kına (*Lawsonia* spp., Lythraceae familyası), yani dallı bir çalı veya grimsi kahverengi kabuğu olan küçük bir ağacın özünden elde edilebilir. En yaygın türleri %0.5-1.5 oranında Lawson içeren *Lawsonia alba*, *Lawsonia spinosa* ve *Lawsonia inermis* Linn'dir (mignonette ağacı). Bu bileşik ayrıca mücevher otu *Impatiens balsamina*'da ve *Juglans regia*'da (veya cevizde) bulunur. Lawson'un önemli bir izomeri, *Juglans nigra*, *J. cinerea* ve *J. regia* gibi Juglandaceae familyasının çeşitli türlerinde bulunan doğal bir 1,4-naftokinon olan, 5-hidroksi-1,4naftokinondur (veya juglon). Bu bileşiklerdeki hidroksil grubunun konumu, redoks potansiyellerini ve prooksidan aktivitelerini etkilediği için biyolojik aktiviteleri için çok önemlidir (Jordão vd., 2015).

2.2. L929 Hücre Hattı

Yapılan bilimsel deneylerde memeli canlıların kullanılmasından mümkün olduğunca kaçınılması gerekmektedir. Bu amaçla biyomedikal çalışmalar için pek çok farklı alanda hücre kültürleri geliştirilmiş ve bilimin kullanımına sunulmuştur. Hücre kültürleri mikrobiyoloji alanında çalışılması güç virüs gibi mikroorganizmaların

tanımlanması, üretilmesi virüs aşularının geliştirilmesi için kullanılmaktadırlar. Günümüzde kanser araştırmaları ve ilaçlarının geliştirilmesi, etkinliğinin belirlenmesi için de hücre kültürleri ile yapılan çalışmalara önem verilmektedir (Akçalı, 2010).

Hücrelerin kontrollü şartlar içinde yetiştirilme süreci, hücre kültürü olarak tanımlanmaktadır. İnsan ve hayvanların organizmasından doku ve hücre kültürü yapılabilir ve kimyasal ya da mekanik işlemlerle besi agarına yerleştirilebilir.

Hücre kültürlerinin çok geniş alanda çeşitli çalışmalarda kullanım alanları söz konusudur. Örnek olarak;

- viral teşhis ve aşı üretimi
- gen ve tümör edavisi
- Hormon, monoklonal antikor, aşı, enzim, interferon, büyüme faktörü, interlekin gibi immun sistem düzenleyicileri üretimi
- Canlı hücrelerin farklı amaçlarla kullanılması (transfüzyon amaçlı eritrositlerin kullanılması, kemik iliği nakli, Parkinson çalışmaları için beyin hücrelerinin kullanılması)
- Kıkırdak, yapay deri, karaciğer ve yapay pankreas, kompleks dokular üretimi

verilebilir (Ilgım, 2011).

2.2.1. Hücre Kültürü Şartları

Kullanılan hücre ve kültür tipine göre Hücre kültür ortamı değişebilir. Ancak kültür şartlarının eksiksiz sağlanması, hücrelerin canlılığı ve çoğalması için gereklidir.

Kültür ortamında enerji kaynağı (osmotik dengesi sağlanmış), kofaktörler, vitaminler, mineraller tuzlar, büyüme faktörü iz elementler ve aminoasitler bulunmaktadır. Bunun yanı sıra kültür ortamı üzerinde nemlilik, gaz fazı bileşenleri, sıcaklık, pH, ışık ve ozmolarite faktörleri doğrudan etkildir. Hayvan hücre kültürü için optimum pH 7.2-7.5, sıcaklık 35-37°C ve karbondioksit gazı % 2-5 olmalıdır. Tamponlayıcılar (bikarbonat gibi), glutamin, antibiyotik ve kan serumu kültür

ortamına sonradan eklenmelidir. Her bir hücre kültürü için farklı özelliklere sahip ayrı bir kültür ortamı gerekmektedir. Buna örnek olarak memeli hücre kültürü için optimum pH değerini 7.4 olması gerektiği verilebilir (Ilgım, 2011).

2.2.2. Kaynağına Göre Hücre Kültürü Sistemleri

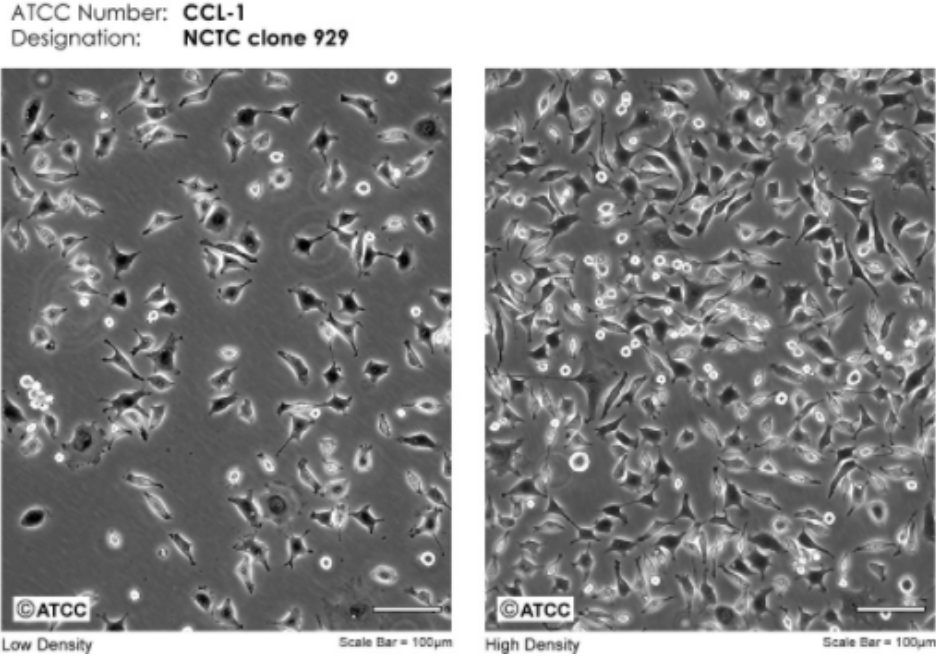
Bitki ya da hayvan hücreleri izole edilmesinin ardından kültüre edilirse, “primer kültür” elde edilmiş olur. Bu durumda hücre soyu sonsuz değildir, pasajlamaların sonunda hücreler yaşlanarak canlılığını yitirir, ölür. Dolayısıyla primer hücreler belirli sayıda pasajlanabildiğinden, deneylerin de bu esnada yapmak önemlidir. Bu hücreler pasajlamaların sonunda, ölümsüz olabilmekte ve bir hücre soyu elde edilebilmektedir. Hücre soyları, primer hücrelerde kendiliğinden mutasyonla elde edilebileceği gibi, virüsler ya da kimyasallar eklenerek veya tümörlerden alınan hücrelerden oluşturulabilmektedir. Primer kültürlerden farklı olarak hücre soyları, kültür ortamında yoğunluğunun artması, serum ya da büyüme faktörüne daha az gereksinim, sonsuz çoğalma kabiliyetlerinin olması ve üremek için zemine tutunma ihtiyacının az olmasıdır (Ilgım, 2011).

2.2.3. Büyüme Şekillerine Göre Hücre Kültürü Sistemleri

Büyüme şekillerine göre hücre kültürü sistemleri yüzeye tutunarak büyüyen ve süspansiyon hücreleri olarak iki sınıfta incelenmektedir. Kemik iliği, dalak, kan, kültürleri ile olgunlaşmamış hücreler bu yolla üretilmektedir. Ektoderm ve endoderm kökenli hücreler (epitel ve fibroblast) tutunarak büyüyen hücrelerdir. Bu hücreler proteoglikanla, kollojen, laminin benzeri makromoleküllerin karışımından oluşan kompleks yapı (ekstraselüler matriks) üzerinde ve bu yapının moleküler membran reseptörleriyle etkileşimleri sonucu gelişmektedirler (Ilgım, 2011).

L929 fibroblast hücreleri (Şekil 3), oksidatif stres kaynaklı sitotoksiteyi araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Anon., 2022). Bu nedenle reaktif radikal üretiminin inhibisyonu; onarım veya yara iyileşme sürecinin proliferatif fazını

başlatmak için bölgeye çekilen fibroblast alımı için önemli bir husustur (Çınar, 2020).



Şekil 3. Düşük ve yüksek yoğunluklu L929 hücreleri (Anon., 2022).

2.3. Antioksidan Kapasite

2.3.1. Antioksidanlar ve Etki Mekanizması

Antioksidanlar (H_2) atomu verme kabiliyetine sahip, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi baskılayan bileşiklerdir (Çalışkan2020).

Serbest radikaller, bir veya birden çok eşlenmemiş elektrona sahip oldukça kararsız yapıdaki bileşiklerdir. Serbest radikaller hücrelerde endojen veya eksojen olarak meydana gelebilen düşük molekül ağırlıklı, kısa ömürlü moleküllerdir.

Reaktif Oksijen türleri (ROS) ile oluşan bu moleküller aerobik organizmaların fotositoz ya da elektron taşıma zinciri gibi metabolik faaliyetler sonucunda sürekli

oluşmakta, hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyon (O₂⁻), hidroksil radikali (HO⁻), alkoksil radikali (RO⁻), hidroklorikasit (OHCl⁻), peroksinitri (ONOO⁻) peroksil radikali (ROO) gibi ROS'lar oluşabilmektedir.

Antioksidanlar, serbest radikallerin organizmalarda neden olduğu oksidatif stresin ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bileşiklerdir. Flavonoidler, flavonlar, isoflavonlar, lignanlar, antosiyaninler, kumarin, isokateşin ve kateşinler En fazla antioksidan kapasitesine sahip olan bileşiklerdir. En güçlü doğal antioksidanlar çoğunlukla bitkisel kaynaklı olup; stibenler, alkoller, tokotrienoller ve tokoferoller buna örnek verilebilir. Antioksidanca zengin bitki florasına ülkemizde Karadeniz Bölgesi öne çıkmaktadır. Türkiye'deki tıbbi, aromatik, soğanlı ve bitki florasının ¾'ü Karadeniz Bölgesi'nde bulunmaktadır (Okan, vd. 2013).

2.3.2. Antioksidanların Sınıflandırılması

Enzimatik ve enzimatik olmayan olarak antioksidanlar iki sınıfta incelenmektedir. ayrılırlar. Bazı antioksidanlar, enzimatik kofaktörler gibi bazı enzimleri içeren ve düşük molekül ağırlığına sahiptir. Bazı antioksidanlar da enzimatik olmayıp, besinlerden elde polifenolik bileşenlerdir. Ayrıca yine besin alımı ile sağlanabilen karotenoidler, organosülfür bileşenleri, vitaminler, ve mineraller de antioksidan özelliktedir.

Antioksidanlar sentetik ve doğal olarak da bir sınıflandırılabilir. Sentetik antioksidanlara örnek olarak butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) verilebilir. antioksidanlar, tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyum da en önemli doğal antioksidanlar arasında yer almaktadır (Madhavi, 1996).

2.3.3. Antioksidan Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri

Antioksidan aktivite ölçüm koşullarındaki basınç, sıcaklık gibi parametrelerden etkilenmektedir (Huang ve diğ., 2005). Ölçüm yöntemleri iki grup altında sınıflandırılmaktadır.

Hidrojen Atom Transferine Dayanan Metot (HAT): Antioksidan kapasitesi (AOK), Serbest radikallerin antioksidan maddenin hidrojeni ile etkisiz hale gelmesinin ölçülmesi ile tayin edilir.

Singlet Elektron Transferine Dayanan Metot (SET): Potansiyel antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerin indirgenmesine dayanan metottur (Prior ve diğ., 2005).

Başlıca antioksidan aktivitesi hesaplama yöntemleri aşağıdaki gibidir.

- Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi
- Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre (TRAP) Yöntemi
- Krosin Beyazlatma Yöntemi
- Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi
- Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi
- Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC veya ABTS) Yöntemi
- 2.2.-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi
- Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi
- Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi
- Folin-Ciocalteu Ayracı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi (Okan vd., 2013).

2.4. Fenolik Bileşikler

Gıdalarda olan fenolik maddeler ise renk, acılık, burukluk, tat, koku veren özellikte maddeler olup, ürünlerin oksidatif stabilitesine etki edebilmektedir (Naczki ve Shahidi, 2004).

Fenolik bileşikler, bitkilerin sekonder metabolitleri olarak değerlendirilmektedir. Polifenolik bileşikler, fitokimyasallar içinde en geniş sınıflardandır. Yapılarındaki hidroksil grupları, fonksiyonel özellik gösteren gruplarıdır ve güçlü antioksidan aktivite gösterirler. Singlet oksijeni süpürücü, indirgeyici ve hidrojen atomu verici gibi fonksiyonlara sahiptir. Fenolikler; fenolik asitler, flavonoidler ve fenolik polimerler (tanenler) olara üç sınıfta incelenir (Kaya vd., 2016).

2.4.1. Flavonoidler

Bitkilerin ortak bileşenleri olan flavonoidler, bitkilerin kök, tohum , yaprak, gövde ve meyvelerinde bulunmaktadır. Bilinen 8000'den fazla polifenolik bileşik mevcut olup, 4000'den fazlasını flavonoidleri içermektedir. Flavonoidlerin yapısında, 15 karbona sahip flavan bulunur. Molekül yapılarında, aromatik A halkasına birleşik bulunan heterosiklik C halkası ve buna 2, 3 veya 4 pozisyonundan bağlı bir aromatik B halkası bulunur. Söz konusu halkalara bağlanan fenolik OH grupları, yapının antioksidan aktivite göstermesini sağlar.

Flavonoidlerin, antioksidan, antiinflamatuvar yanında, farklı enzimlerin aktivitesini artırmak ve spesifik reseptörlerle etkileşme suretiyle insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri vardır. Ayrıca flavonoidler, antiviral, antitrombotik, antialerjik ve vazodilatör etkilere ve bakır, demir gibi metaller ile şelat oluşturma özelliğine sahiptirler. Bunun yanı sıra literatürde flavonoidlerin LDL peroksidasyonunu önlediği, antikanserojen ve kalp hastalıklarını önleyici özelliğe de sahip olduğu ifade edilmektedir.

Başlıca flavonoid bileşikleri şunlardır: flavonlar, flavononlar, flavonoller, izoflavonoidler, antosiyaninler, antosiyanidinler, biflavonoidler, oligomerik flavonoidler, izoflavonlar), auronlar ve kalkonlar (Kaya vd., 2016).

2.4.2. Fenolik Asitler

Benzoik asiti ve sinnamik asidin hidroksi türevleri olmak üzere fenolik asitler, iki sınıfa ayrılır. Hidroksibenzoik asitler, genelde bitkisel gıdalarda eser miktarda bulunup, C6-C1 fenilmetan yapısındadır. Hidroksisinamik asitler ise C6-C3 fenilpropan yapısında bulunmaktadırlar. Ferulik asit, kafeik asit, o-kumarik asit ve p-kumarik asit en yaygın bulunanlarıdır.

Hidroksisinamik asitler, bu iki grup arasında en fazla bulunanıdır. Bitkilerdeki (serbest, glukozidleri veya esterleşmiş halde) fenolik bileşiklerin % 30'u, fenolik asit olarak gıdalarla alınır. Hidroksi- metoksi gruplarının çeşitleri ve yerleşimine göre farklı şekilde isimlendirilirler. Yapılarındaki halkaya bağlı hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısına göre antioksidan aktivitesi ve kararlılığı değişebilmektedir. Fenolik asitler, anyon radikallerini (hidroksi, peroksil, süperoksit ve peroksinitrit) giderme ve metal şelatlama etkilerine sahiptir (Kaya vd., 2016).

2.4.3. Fenolik Polimerler

Proantosiyandinler veya tanenler yüksek molekül ağırlığına sahip, flavonoidlerin polimeri ya da oligomeridir. Bitkilerin sekonder metabolitleridirler ve bitkileri zararlılar karşısında korurlar. Bazı çilek türleri, nar suyu, elma, beyaz ve kırmızı üzümde, bunlardan üretilen şaraplarda, tarçın, çay, kakao ve Ginkgo bilobada bolca bulunur. Koyu renge ve buruk tada sahip bileşiklerdir. Bazı kanser türleri, enflamasyonun ve ateroskleroz üzerinde sağlık açısından olumlu etileri olduğu bildirilmektedir (Kaya vd., 2016).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan Lawson molekülü ve L929 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)'dan, analizlerde kullanılan kimyasallardan gallik asit, folin ciocalteu, Na₂CO₃, sıvı azot, potasyum difosfat (KH₂PO₄), potasyum ferrisiyanid [K₃Fe(CN)₆], trikloroasetik asit, linoleik asit ve FeCl₃ kimyasalları Sigma Aldric firmasından; etanol, metanol, asetonitril, asetik asit, demir (III) klorür, triloloroasetikasit, potasyum hekzasiyanoferrat, Tween 20, amonyum tiyosiyanat Riedel firmasından; Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-kroman2-karboksilik asit), ABTS, beta karoten Fluka firmasından; L- askorbik asit, demir (II) klorür, potasyum klorür ve sodyum asetat trihidrat ise Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2. METOT

3.2.1. L929 Hücre Hattı ve Lawson Molekülünün Hazırlanması, Canlılık Oranının Belirlenmesi

American Type Culture Collection (ATCC)'dan Cryotube içinde temin edilen L929 hücre hattı (Alfa Aersar (2-Hidroksi-1,4 nafatkinon) A11880, Ma=174,16 g), sıvı azot tankından çıkarılarak %10 FBS içeren ve DMEM besiyeri içeren T75 cm² flaska ekildikten sonra, 37°C'de etüvde (%90 nem, %5 CO₂) inkübe edildi. Hücreler ard arda pasajlanarak dördüncü pasajdan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, 5000 hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi için, 24 saat boyunca CO₂'li etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda ilaç ekimi yapılarak 24, 48, 72. saatler için MTT yöntemi ile mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi.

L929 hücreleri tekrar pasajlandıktan sonra H₂O₂'nin hücrede oluşturduğu oksidatif strese karşı lawsonun koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacı ile H₂O₂ 'nin (0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 mM) konsantrasyonları ile lawsonun (1000 µM-1 µM) konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile incelendi. 96 kuyucuklu plakaya ekim yapıldı. Yirmi dört saat sonra, hücreler farklı konsantrasyonlardaki lawsona maruz bırakıldı ve üç saat sonra da H₂O₂ (0,4 mM) ortama ilave edildi. Sonrasında 24., 48. ve 72. saatlerde hücrelere MTT yöntemi ile mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 570 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi.

Lawson molekülünün hazırlanması için, son konsantrasyon %0.5 olacak şekilde DMSO içinde çözüldürülmüş ve sonrasında gerekli hacimler için tamamlamalar DMEM besiyeri ile yapılmıştır.

3.2.2. Total Fenolik Madde (TFM) İçeriği Belirlenmesi

Lawson ekstraktlarındaki (0.625 -10 mg/ml) total fenolik madde (TFM) miktarı, standart olarak gallik asit kullanılarak belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977). Gallik asit %70'lik metanol içinde (1:10 h/h) çözüldü. 10 mg Lawson ekstraktı ise, 10 ml saf suda çözüldü. Folin ciocalteu's reaktifi: 1:10 h/h seyreltilmiş folin reaktifi hazırlandı. Na₂CO₃ çözeltisi %7.5: 7.5g Na₂CO₃ tartıldı ve 90ml suda çözüldü. Daha sonra su hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Eppendorf tüplerinde bulunan ekstraktlar üzerine, tekrarlı olmak üzere Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek inkübasyona bırakıldı. Tüplere Na₂CO₃ (% 7,5) eklenerek tekrar inkübasyona bırakıldı ve Elisa Reader cihazı ile 765 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar, ekstraktların miligramı başına miligram gallik asit (mg GAE/g lyophylisate) eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

3.2.3. İndirgeyici Güç Tayini (İGT) Tayini

İndirgeyici güç tayini (İGT), Yen vd. (1997) yöntemine göre belirlenmiştir. Lawson'un numuneleri, 10 mg ekstrakt 1 ml saf suda çözülerek ve ardışık seyreltme ile 0.25 mg/ml'ye kadar 5 numune hazırlandı. Fosfat Tamponu için, 0.2M pH=6.6: 2.72 gr KH_2PO_4 tartıldı ve 90 ml saf suda çözüldü. pH 6.6'ya ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Potasyum Ferrisiyanid %1 için, Potasyum ferrisiyanid 0.505 g tartıldı ve 40 ml saf suda çözüldü. Son hacim 50 ml'ye tamamlandı. Trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) % 10 için TCA 5 g tartılarak, 45 ml saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. FeCl_3 % 0.1 için, 0.103 g FeCl_3 tartıldı. 90 ml saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Eppendorf tüplerinde bulunan numuneler üzerine fosfat tamponu eklendi. Ardından eppendorf tüpler içindeki numunelere potasyum ferrisiyanid eklenerek, inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında TCA ve FeCl_3 eklenerek 700 nm'de ölçüm yapıldı. Reaksiyon sonucu oluşan absorbans artışı, artan indirgeme gücü olarak ifade edildi.

3.2.4. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini

Kuvvetli serbest radikaller karşısında vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen ve tam otomatik bir metod olarak Rel Assay Diagnostics TAS kitindeki prosedürler doğrultusunda Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini yapıldı. Bu metotta; Fe^{+2} - o-dianisidin kompleksi, hidrojen peroksid ile fenton reaksiyonu oluşturarak hidroksil radikalini meydana getirir. Bu kuvvetli ROT, indirgenerek düşük pH değerinde, rengi olmayan o-dianisidin molekülüyle etkileşime girer ve sarı-kahverengi dianisidil radikallerini meydana getirir. Dianisidil radikalleri, ileri oksidasyon reaksiyonlarına girerek, renk oluşmasını artırır. Fakat örneklerdeki antioksidanlar, oksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek renk oluşumunu durdurabilmektedir. Bu reaksiyondaki renk değişimleri otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

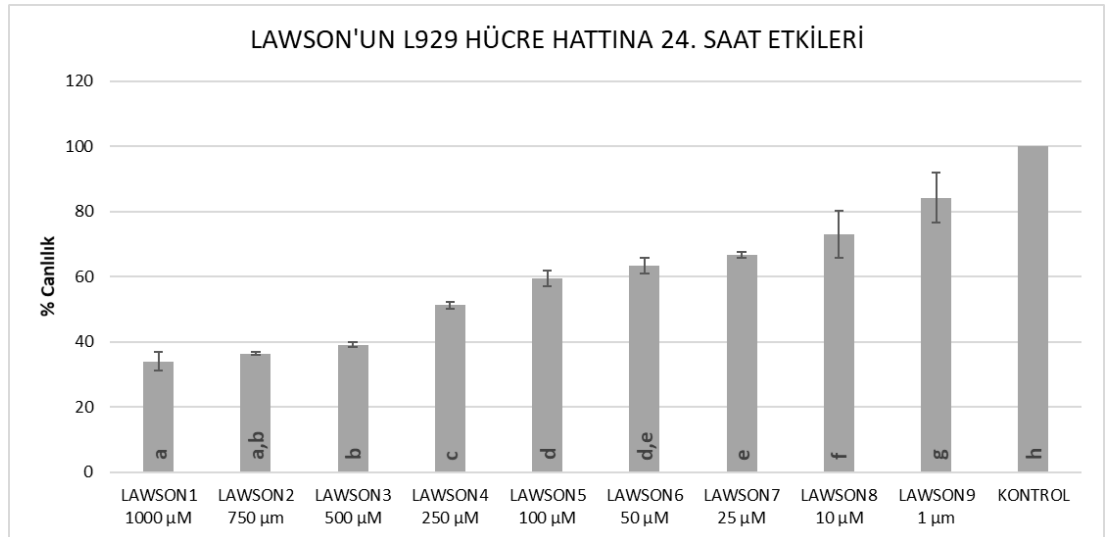
İstatistiksel analiz ortalama \pm standart sapma değerleri hesaplandı. Veri analizi $p < 0,05$ önem düzeyinde, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testi kullanılarak gerçekleştirildi.



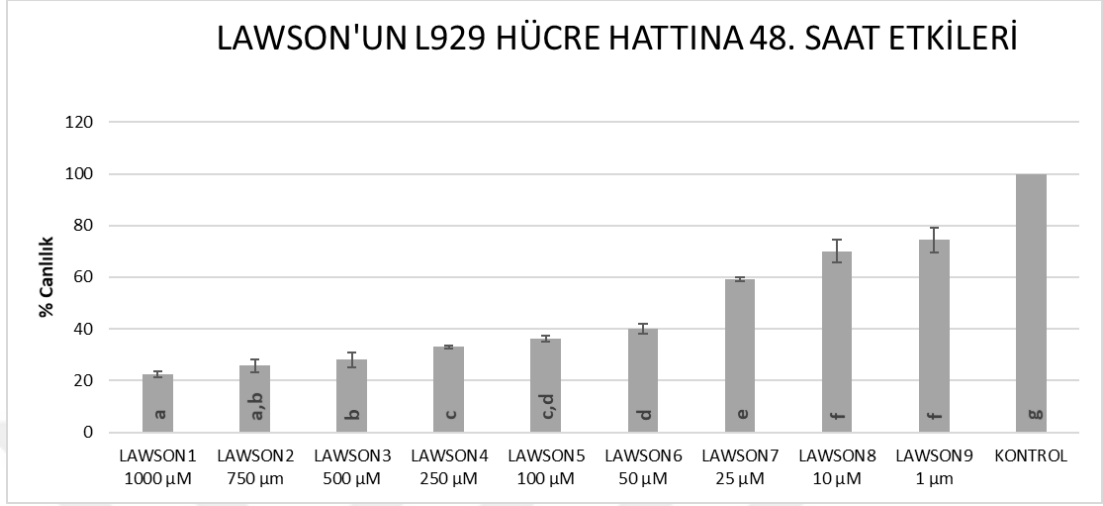
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. L929 Proliferasyonu ve Canlılık Analizi

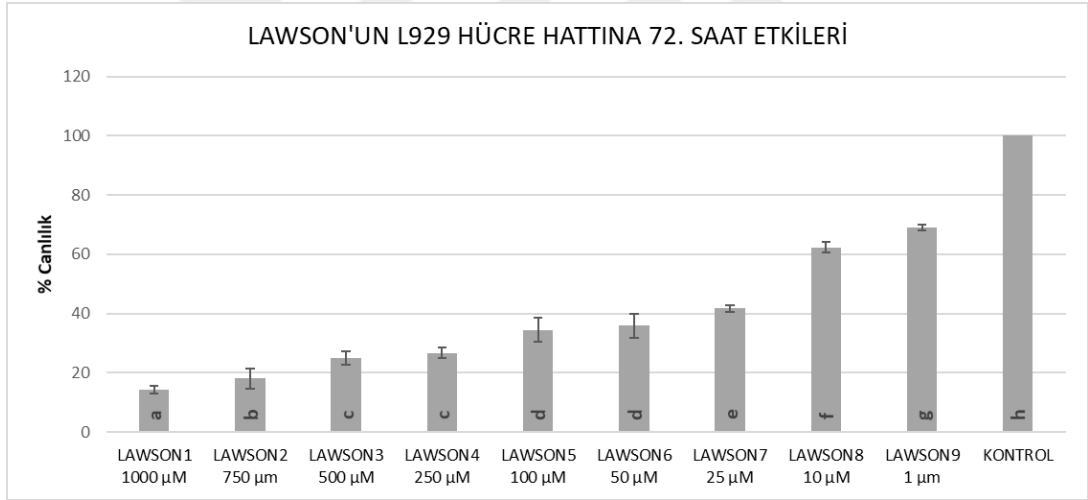
Lawsonun farklı konsantrasyonlarda (1000 μ M -1 μ M), L929 fare fibroblast hücre hattında hem proliferasyon hem de canlılığı üzerindeki etkisi, MTT yöntemi kullanılarak 24., 48. ve 72. saatlerde incelenmiştir Lawsonun tüm saatlerde doza bağımlı olarak, dozların azalması ile proliferatif etki ortaya çıkmıştır (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6). Ancak, Lawson'un kontrol grubuna göre sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler One-way Anova Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ anlam düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Farklı harfler grupların birbirinden istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. 24., 48. ve 72. saatlerin tümünde Lawsonun L929 hücre hattına etkileri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla tüm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlemlenmiştir. 24. Saatteki IC50 değeri 24.13 μ M, 48. Saatteki IC50 değeri 11.55 μ M ve 72. Saatteki IC50 değeri 63.95 μ M bulunmuştur.



Şekil 4: Lawson'un L929 Hücreleri Üzerine 24. Saat Etkileri



Şekil 5: Lawson'un L929 Hücreleri Üzerine 48. Saat Testi



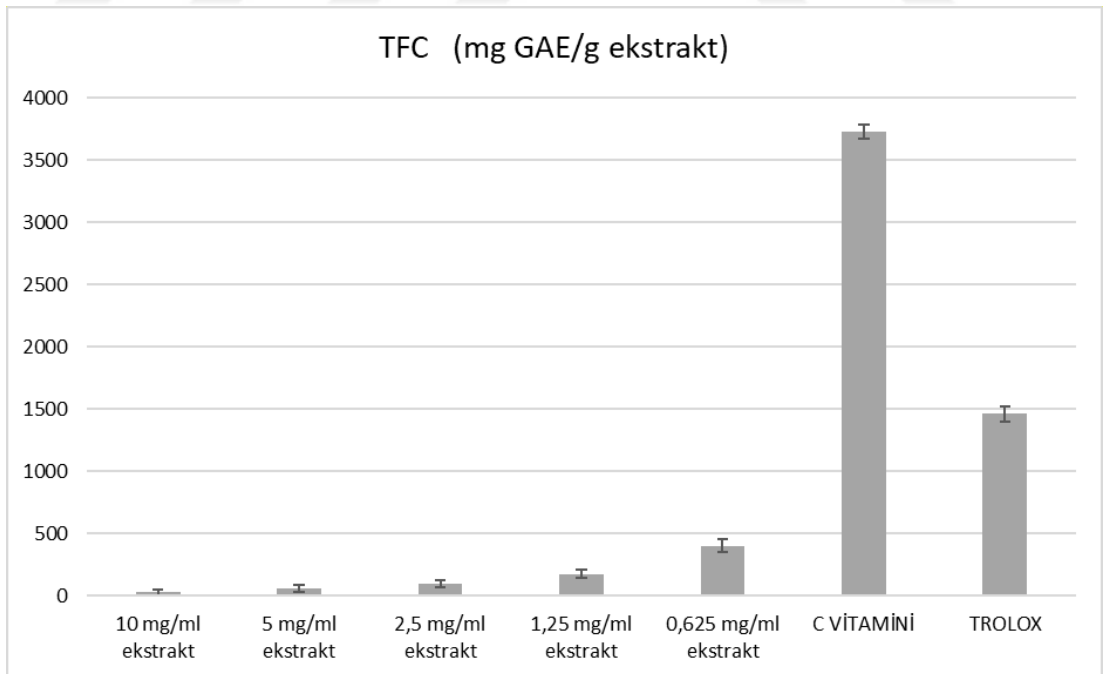
Şekil 6: Lawson'un L929 Hücreleri Üzerine 72. Saat Testi

4.2. Total Fenolik Madde (TFM, TFC) İçeriğinin Belirlenmesi

Yapılan çalışmada toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. En derişik ekstrakt olan 10 mg/ml ekstraktta, en düşük fenolik içerik belirlenmişken, azalan dozlarda daha yüksek fenolik içerik belirlenmiştir. Lawsonun tüm konsantrasyonları, C vitamini (1 mg/ml) ve troloksa (1 mg/ml) göre kıyaslanırsa, fenolik içeriğinin anlamlı bir biçimde oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 7, Tablo 1)

Tablo 1. Örneklerin fenolik madde içeriği

Numune	Polifenol miktarları (mg/100x10 ⁻⁶)
1mg/ml	20,43 ± 0,187
2,05 mg/ml	27,92 ± 0,054
2,9 mg/ml	34,39 ± 0,354
4,1 mg/ml	43,29 ± 0,542
5 mg/ml	50,05 ± 0,769
Trolox	3724,52
C vitamini	1460,87



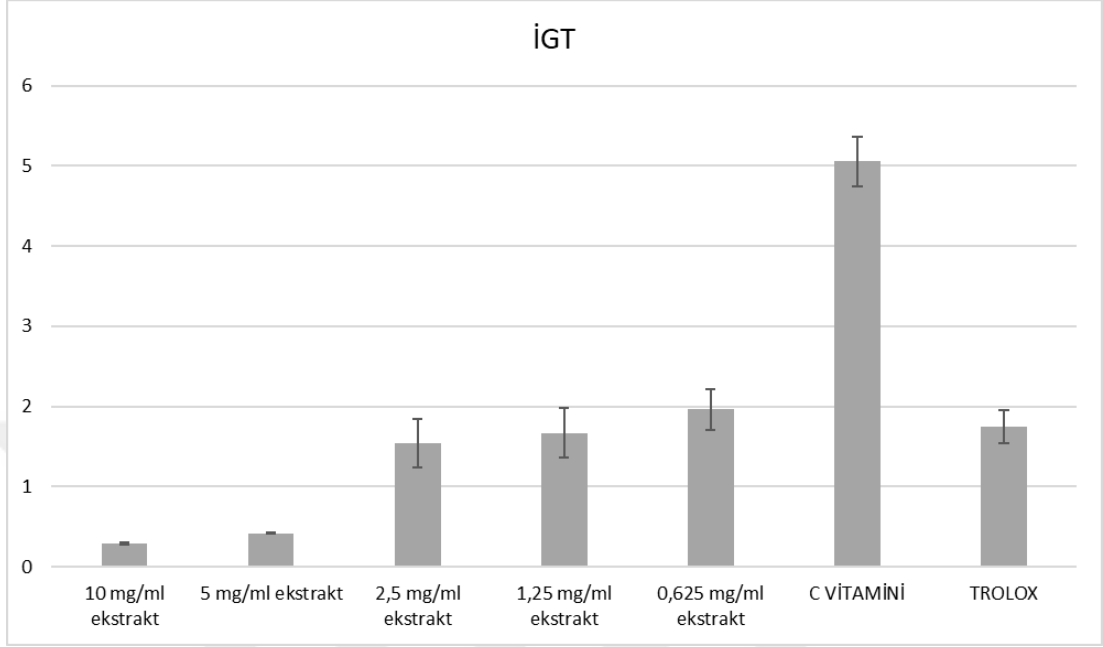
Şekil 7: Lawson'un Total Fenolik Madde İçeriği

4.3. İndirgeyici Güç Tayini (İGT)

Lawsondan hazırlanan değişen konsantrasyonlardaki su ekstralarının indirgeyici güçlerine ait sonuçlar, ortalama absorbans olarak kaydedilerek, C vitamini ve Troloksa göre karşılaştırması yapıldı (Şekil 8, Tablo 2). Total indirgeyici güç, antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemlerden biridir ve yüksek absorbans, yüksek indirgeme potansiyelini göstermektedir (Mathew ve Abraham, 2006). Çalışmanın sonuçlarına göre azalan konsantrasyonda, su ekstralarının indirgeyici güçlerinin, doza bağlı olarak arttığı ve en yüksek indirgeyici gücün 0.625 mg/ml konsantrasyona ait olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. Numunelerin İndirgeyici Güç Özelliği

Numune	İndirgeyici Güç
1 mg/ml ekstrakt	0,272 ± 0,070
2,05 mg/ml ekstrakt	1,358 ± 0,101
2,9 mg/ml ekstrakt	2,065 ± 0,046
4,1 mg/ml ekstrakt	3,103 ± 0,215
5 mg/ml ekstrakt	4,005 ± 0,216
C vitamini	5,416 ± 0,305
Trolox	6,300 ± 0,361



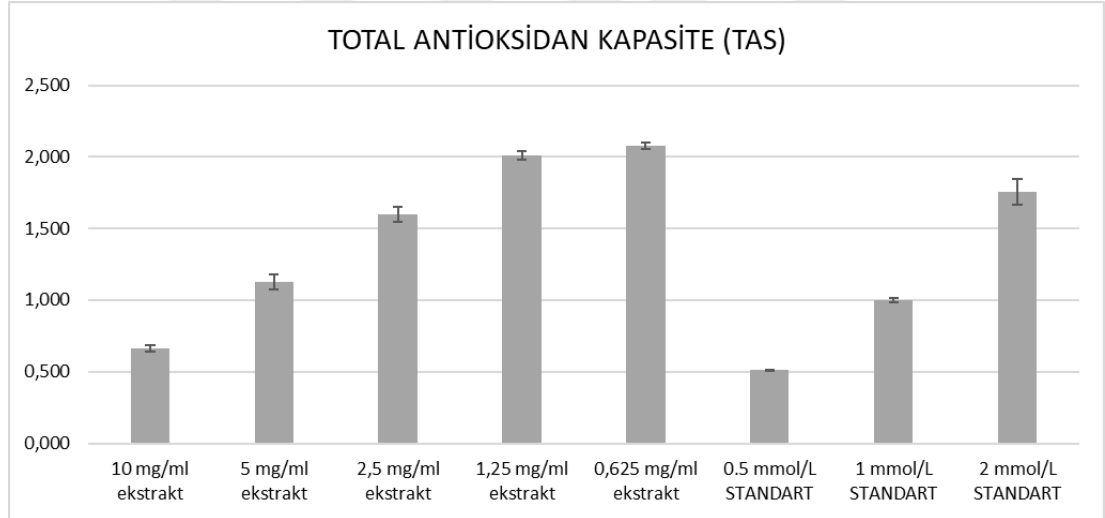
Şekil 8: Lawson'un İndirgeyici Güç Tayini

4.4. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini

Lawson'un farklı konsantrasyonlardaki su ekstrelerindeki total antioksidan kapasitelerini tespit etmek için, standart çözeltiler ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinden faydalanıldı. Sonuçlara göre, aktivitenin doz azalışına bağlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 9, Tablo 3). Bu ekstreler içerisinde en yüksek antioksidan kapasite 0.625 mg/ml'lik konsantrasyon için tespit edilmiştir. En düşük aktivite ise 10 mg/ml'lik konsantrasyon için saptanmıştır. Tüm dozlar standart çözeltiler ile kıyaslandığında 1.25 ve 0.625 mg/ml konsantrasyondaki ekstraktların antioksidan kapasitesinin, 2 mmol/L'lik standardın antioksidan kapasitesinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3. Numunelerin antioksidan aktivitesi

Numune	Antioksidan aktivite
1mg/ml ekstrakt	38,95 \pm 0,06
2,5mg/ml ekstrakt	71,35 \pm 1,24
2,9 mg/ml ekstrakt	99,22 \pm 0,66
4,1 mg/ml ekstrakt	140,18 \pm 1,78
5 mg/ml ekstrakt	166,50 \pm 0,79
0.5 mmol/L stok	21,70 \pm 1,14
1 mmol/L stok	41,25 \pm 2,36
2 mmol/L stok	70,63 \pm 0,36



Şekil 9: Lawson'un Total Antioksidan Kapasitesi

Lawson'un hücre proliferasyonu üzerine etkileri değerlendirildiğinde, L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde Lawson'un en düşük konsantrasyonun etkili olması bu etken maddenin sitotoksikite çalışmalarında yeni bir ajan olduğuna işaret etmektedir. Bu sitotoksik etkinin nedenini incelemek adına fenolik bileşiklerin tayini ve antioksidan kapasitesi değerlendirildi. Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin sağlık üzerine etkilerinin incelendiği *in vitro* çalışmalar serbest radikal süpürücü,

enzimatik aktiviteyi düzenleyici, hücre proliferasyonunu inhibe edici, antibiyotik, antialerjik, antidiareal, antiülseratif ve antiinflamatuvar etki gösterdiklerini belirtmektedir (Bravo, 1998).

Bazı araştırmalar ise diyet fenoliklerinin genel olarak kemopreventif etki gösterdiğini ve antikanser ajan olarak metabolizmada rol aldığını göstermektedir. Fenolik bileşiklerden özellikle flavanoidlerin, kolesterolden zengin beslenen ratlarda süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesini düzenleyerek ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazın gen ekspresyonunu artırarak, antioksidatif kapasiteyi artırdığı belirtilmektedir (Jeon vd., 2001). Çalışmalarda belirlenen antioksidan kapasitesi, total fenolik içerik ve indirgeyici güç profilleri de hücre canlılık testlerini destekler niteliktedir.

Kontrol grupları, yalnızca L929 hücresi içeren lakin Lawson molekülünün maruziyetine bırakmadığımız gruplardır. Sağlıklı hücre grubu olarak da adlandırabiliriz. Tüm Lawson maruziyetine bırakılmış farklı gruplar, bu sağlıklı grup olarak adlandırdığımız kontrol grupları ile kıyaslandı. Sağlıklı hücredeki canlılık miktarları, bize normal hücre sayısındaki değişimi göstermektedir. Lawson maruziyetine bırakılmış gruplardaki canlılık miktarları, Lawsonun sitotoksik özelliğinden dolayı kontrol grubuna kıyasla daha da azalmıştır. Etki aralığında Lawsonun dozu önemli olmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada Lawsonun sitotoksik etkili olduğu dozlar çalışılmıştır. Bu nedenledir ki kontrol grubunda proliferasyon daha fazladır.

Fenolik madde içeriği, bir molekülün antioksidan kapasitesi ile kolerasyonlu bir değerdir. Lawsonun artan dozlarına doğru gidildikçe antioksidan kapasitesi azalmıştır. Bu değerler hücre proliferasyon testinde de etkisini göstermektedir. Artan dozlarda Lawsonun hem oksidan kapasitesi artmış böylece sitotoksik etkisinde artmıştır. Fenolik, antioksidan ve indirgeyici güç analiz sonuçları da molekülün yüksek dozlarda biyoetkililiğinin bir sonucu olarak yüksek çıkmıştır.

Özetle, Lawson'un azalan dozlara doğru hücre canlılığı üzerinde proliferasyonu artırıcı, antioksidan kapasite, total fenolik içeriği ve indirgeyici gücü arttığı belirlenerek Lawson'un düşük dozlarda antioksidan, yüksek dozlarda antitümoral bir bileşik olabileceği görülmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle sağlığı korumak amaçlı uygulamaları yaygın olan Lawson molekülünün, L929 hücreleri üzerindeki proliferasyon etkisi incelenmiş, ayrıca total antioksidan kapasitesi, indirgeyici güç özelliği ve toplam fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Lawson'un L929 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72. saatteki etkileri kontrol grubuna kıyasla inhibitör etkili olduğu bulunmuştur. 24. saatteki IC50 değeri 24.13 μ M, 48. Saatteki IC50 değeri 11.55 μ M ve 72. Saatteki IC50 değeri 63.95 μ M bulunmuştur. Lawsonun tüm konsantrasyonlarının, C vitamini ve Trolox'a göre kıyaslanırsa fenolik içeriğinin anlamlı bir biçimde oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Lawson'un azalan konsantrasyonda su ekstralarının indirgeyici güçlerinin doza bağlı olarak arttığı ve en yüksek indirgeyici gücün 0.625 mg/ml konsantrasyona ait olduğu tespit edilmiştir. Lawson'un 0.625 mg/ml konsantrasyonunda, en yüksek antioksidan kapasite tespit edilmiştir. En düşük aktivite ise 10 mg/ml'lik konsantrasyonda tespit edilmiştir.

Özetle, Lawson'un azalan dozlara doğru hücre canlılığı üzerinde proliferasyonu artırıcı, antioksidan kapasite, total fenolik içeriği ve indirgeyici gücü arttığı belirlenerek Lawson'un düşük dozlarda antioksidan, yüksek dozlarda antitümoral bir bileşik olabileceği görülmüştür.

KAYNAKÇA

Akçalı, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 25(3):119-123

Anonim, 2022. <https://www.atcc.org/products/ccl-1>. Erişim tarihi: 02.02.2022.

Babula, P., Adam, V., Havel, L., Kizek, R. (2009). Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones-their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis, *Current Pharmaceutical Analysis*, 5, 47-68.

Bravo, L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56(11): 317-33.

Çalışkan, B. (2020). Kestanelerde Derim Sonrası Bazı Uygulamaların Meyve Kalitesi Ve Depolama Süresi Üzerine Etkileri (Master's Thesis, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

Çınar, İ. (2020). Gossypin'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Hidrojen Peroksit Hasarına Karşı Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi, *Kafkas J Med Sci* 2020; 10(1):15–23.

Hamdoun S, Fleischer E, Klinger A, (2017). Efferth T. Lawsone derivatives target the Wnt/ β -catenin signaling pathway in multidrug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Pharmacol*. Dec 15;146:63-73.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

İlgım, G., (2011). Acridine Orange İçeren Phema Nanopartiküller İle L929 Fibroblast Hücre Hattının Etkileşimi. Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. (2001). Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci*. Nov 2;69(24):2855-66.

Jordão, A. K., Vargas, M. D., Pinto, A. C., da Silva, F. de C., & Ferreira, V. F. (2015). Lawsone in organic synthesis. *RSC Advances*, 5(83), 67909–67943.

- Kamei H, Koide T, Kojima T, Hashimoto Y, Hasegawa M. (1998).** Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer Biother Radiopharm.* Jun;13(3):185-8.
- Kaya, O. (2016).** Bazı Astragalus L. Taksonlarının Fenolik Bileşik Ve Biyoaktivitelerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. (1996).** Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. Markel Dekker, Newyork, pp 41-50.
- Majiene D, Kuseliauskyte J, Stimbirys A, Jekabsone A. (2019).** Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. *Nutrients.* Jun 7;11(6):1294.
- Mathew, S., Abraham, T. (2006).** Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, **94**: 520-528.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, *1054*(1-2), 95-111.
- Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. (2013).** Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, *13* (1): 48-59
- Oliveira K.M, Liany LD, Corrêa RS, Deflon VM, Cominetti MR, Batista AA. (2017).** Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. *J Inorg Biochem.* Nov;176:66-76.
- Pradhan R, Dandawate P, Vyas A, Padhye S, Biersack B, Schobert R, Ahmad A, Sarkar FH. (2012).** From body art to anticancer activities: perspectives on medicinal properties of henna. *Curr Drug Targets.* *13*(14):1777-98.

- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- Qiu, H.Y., Wang, P.F., Wang, Z.Z., Luo, Y.L., Hu, D.Q., Qi, J.L., Lu, G.H., Pang, Y.J., Wang, R.W., Zhu, H.L., Wang, X.M., Hang, Y.H., (2016).** Shikonin derivatives as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: design, synthesis and biological evaluation. *RSC Advances*, 6(86): 83003-83010.
- Qiu, H.Y., Wang P.F., Lin H.Y., Tang C.Y., Zhu H.L., Yang, Y.H. (2018).** Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chem Biol Drug Des*, 91(3): 681-690.
- Raghu, D., Karunagaran, D. (2014).** Plumbagin Downregulates Wnt Signaling Independent of p53 in Human Colorectal Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 77(5): 1130-1134.
- Rahmoun, N.M., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Benabdallah, M., Villemin, D., Choukchou-Braham, N. (2012).** Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 42, (6), 270-275.
- 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.
- Wang SB, Tao Z, Li P. (2017).** Lawsone suppresses azoxymethane mediated colon cancer in rats and reduces proliferation of DLD-1 cells via NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother*. May;89:152-161.
- Yang, L., Cai, T., Ding, D., Cai, T., Jiang, C., Li, H., Yang, Q., Chen, L. (2017).** Biodegradation of 2-hydroxyl-1,4 naphthoquinone (lawsone) by *Pseudomonas taiwanensis* LH-3 isolated from activated sludge. *Sci Rep* 7, 6795.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Enayatullah Rahmany

