



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE
(ARPE-19) HİDROJEN PEROKSİT İLE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE
PİNOSEMBRİN VE PİNOSTROBİNİN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DERYA KILIÇASLAN

DOKTORA TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE
(ARPE-19) HİDROJEN PEROKSİT İLE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE
PİNOSEMBRİN VE PİNOSTROBİNİN HÜCRE
CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

DERYA KILIÇASLAN

Bu tez,
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Derya KILIÇASLAN tarafından hazırlanan “*Retina Pigment Epitel Hücrelerinde (ARPE-19) Hidrojen Peroksit ile Oluşturulan Oksidatif Streste Pinosembrin ve Pinostrobinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması*” adlı bu tez, jürimiz tarafından 02/07/2018 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. A. Hakan KURT (DANIŞMAN)

Farmakoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Atilla YOLDAŞ (ÜYE)

Anatomi Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Lokman AYZAZ (ÜYE)

Biyokimya Anabilim Dalı

Trakya üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuba ÖZCAN METİN (ÜYE)

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yahya NURAL (ÜYE)

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Mersin Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)

Derya KILIÇASLAN

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (KSÜ BAP) tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2017/2-50D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

RETİNA PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE (ARPE-19) HİDROJEN PEROKSİT İLE OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRESTE PİNOSEMBRİN VE PİNOSTROBİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

DERYA KILIÇASLAN

ÖZET

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen görme kaybının önde gelen sebeplerinden biridir. Temel ve klinik çalışmalardan elde edilen verilerin artması, oksidatif hasarın yaşa bağlı makula dejenerasyonunun patogenezinde önemli rol oynadığını ve dolayısıyla, antioksidatif özelliklere sahip maddelerin yaşa bağlı makula dejenerasyonu için umut verici terapötik seçenekler olabileceğini göstermektedir. Son yıllarda önemi giderek artan ve doğal bir ürün olan propolis; bitki ve ağaçların yaprak ve sürgünlerinden bal arıları tarafından toplanan, reçine içeren karışık bir maddedir. Propolisin yapısında bulunan pinosembirin ve pinostrobin propoliste yüksek konsantrasyonda bulunan flavonoidlerdir. Biz bu çalışmamızda hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksidatif strese maruz kalan retina pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) pinosembirin ve pinostrobinin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda hücre kültürü olarak, retina pigment epitel hücre serilerinden biri olan ARPE-19 hücre serisi seçildi. ARPE-19 hücre serisinde oksidatif stres hasarını oluşturmak için, 500 μM H_2O_2 'nin 20 saat uygulama süresi esas alınarak inkübasyon uygulandı. Çalışmada H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif streste pinosembirin ve pinostrobinin koruyucu etkisini araştırmak için 4 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Öncelikle ARPE-19 hücre serisinde pinosembirin ve pinostrobinin hücre canlılığına etkisine bakıldı. Sonrasında ise ARPE-19 hücre serisinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif hasar oluşumunda, pinosembirin ve pinostrobinin öncesi, sonrası ve birlikte uygulamalarıyla etkin dozu belirlendi. Bu uygulamanın ardından hücre canlılık testi için hücre serilerine Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) analizi yapıldı. Pinosembirin ve pinostrobinin, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini belirlemek için 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST1) analizi kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Hücre

canlılığının gruplar arasındaki farklılığının incelenmesinde One-Way Anova (tek yönlü varyans analizi) yöntemi uygulandı.

Pinosembrin tek başına ARPE-19 hücre serisine uygulandığında hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etki oluşturmadı. Pinosembrinin ARPE 19 hücre serisine, H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşturulmadan 4 saat önce uygulandı ve hücre canlılığını düşük konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde arttırdı. Pinosembrin uygulamasının H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşumuyla birlikte yapıldığında ise hücrede aynı etki görülmedi. Diğer bir uygulama olan pinosembrinin H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşumu sonrasında hücreye uygulanmasının ise hücre canlılığına anlamlı etkisinin olmadığı ve H₂O₂ ile benzer etki gösterdiği görüldü. Çalışma sonuçlarına göre, pinostrobin üç farklı uygulama olan tek başına, H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşumu öncesi ve sonrası uygulamalarında hücre canlılığını artırarak hücrede oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdi. Pinostrobinin oksidatif hasar oluşumu öncesi ve sonrası yüksek konsantrasyonda uygulanması antiproliferatif etki gösterdi.

Bulgularımız sonucunda pinosembrin ve pinostrobinin oksidatif stres kaynaklı hücre hasarında koruyucu veya tedavi edici etkileri görülmektedir. Hücre hasarındaki koruyucu ve tedavi edici etkileri SOD aracılı olabilir. Ayrıca pinosembrin ve pinostrobinin yüksek konsantrasyonda uygulanması antiproliferatif etki gösterdiğinden dolayı, gelecekte kanser çalışmalarında terapötik ajan olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Pinosembrin, pinostrobin, oksidatif stres, retina pigment epiteli

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Bilimi Anabilim Dalı, Temmuz/ 2018

Danışman: Doç. Dr. A. Hakan KURT

Sayfa sayısı: 88

**INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF OXIDATIVE STRESS
PINOCEMBRIN AND PINOSTROBIN ON CELL VIABILITY OF HYDROGEN
PEROXIDE IN RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS (ARPE-19)**

(Ph. D. THESIS)

DERYA KILIÇASLAN

ABSTRACT

Age-related macular degeneration is one of the leading causes of vision loss affecting millions of people worldwide. Increased data from baseline and clinical trials indicate that oxidative damage plays an important role in the pathogenesis of age-related macular degeneration and therefore substances with antioxidative properties may be promising therapeutic options for age-related macular degeneration. In recent years, propolis, a natural and growing product, is a mixed material containing resin, collected by the honey bees from the leaves and shoots of plants and trees. Pinocembrin and pinostrobin, which are found in the structure of propolisine, are flavonoids found in high concentrations. Pinocembrin and pinostrobin, which are found in propolisine structure, are flavonoids found in high concentration in propolis. In this study, we aimed to investigate the protective effect of Pinocembrin and pinostrobin in retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to oxidative stress by hydrogen peroxide (H₂O₂).

In our study, ARPE-19 cell line, one of the retinal pigment epithelial cell lines, was selected as cell culture. In order to generate oxidative stress damage in the ARPE-19 cell line, incubation was carried out based on a 20-hour application period of 500 µM H₂O₂. The study was carried out with 4 different study groups to investigate the protective effect of Pinocembrin and pinostrobin on the oxidative oxidative damage formed with H₂O₂. First, the effects of Pinocembrin and pinostrobin on cell viability were examined in ARPE-19 cell series. Subsequently, in the formation of oxidative damage caused by H₂O₂ in the ARPE-19 cell line, the effective dose was determined by pre-, post- and co-administration of pinocembrin and pinostrobin. Following this procedure, Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) analysis was performed on the cell lines for cell viability test. Pinocembrin and pinostrobin were used for 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST1) analysis to determine superoxide dismutase (SOD) activity. The normal distribution of the variables was evaluated by the Shapiro-Wilk test in

the evaluation of the data. One-way ANOVA (one-way ANOVA) was used to examine the differences in cell viability between groups.

Pinocembrin alone did not have a significant effect on cell viability when applied to the ARPE-19 cell line. Pinocembrin was administered to the ARPE-19 cell line four hours prior to the formation of oxidative damage with H₂O₂ and significantly increased cell viability at low concentrations. When the application of pinocembrin was performed together with the formation of oxidative damage with H₂O₂, the same effect was not observed in the cell. According to the results of the study, pinostrobin showed protective effect against oxidative damage in the cell by increasing cell viability before and after the formation of oxidative damage with H₂O₂ alone in three different applications. The application of pinostrobin at high concentration before and after the formation of oxidative damage showed an antiproliferative effect.

As a result of our findings, protective or therapeutic effects of pinocembrin and pinostrobin in oxidative stress induced injury are seen. The protective and therapeutic effects of cell damage can be mediated by SOD. In addition, administration of Pinocembrin and pinostrobin at high concentration may have antiproliferative effect and may be considered as a therapeutic agent in future cancer studies.

Key Words: Pinocembrin, pinostrobin, oxidative stress, retinal pigment epithelium

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Bioengineering and Sciences, July / 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Hakan KURT

Page number: 88

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi birikimini, desteklerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her konuda destek olan tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Akif Hakan KURT'a,

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü imkânı sağlayan ve desteklerini esirgemeyen, sayın hocam Biyomühendislik ve Bilimleri AD. Başkanı Doç. Dr. Hasan SERİN'e,

Tez çalışmalarım sürecinde değerli destekleri için sayın hocam Anatomi AD. öğretim üyesi Doç, Dr. Atilla YOLDAŞ'a,

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında katkılarını esirgemeyen değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji AD. öğretim üyesi Tuba ÖZCAN METİN'e,

Süperoksit dismutaz enzim aktivite çalışmalarına katkılarından dolayı sayın hocam Anorganik Kimya AD. öğretim üyesi Doç. Dr. Muhammet KÖSE'ye,

İstatistiksel analiz hesaplamalarını yaparak tezime katkılarından dolayı sayın hocam Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD. öğretim üyesi Adem DOĞANER'e,

Tüm tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Biyomühendislik ve Bilimleri doktora öğrencisi Bilge ALLI'ya,

Hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan, bugünlere gelmemde sonsuz emekleri olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme,

Her türlü fedakârlığı ve destekleri için eşim Ferhat, kızım Müzeyyen Ela ve oğlum Mehmet'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Propolis	1
1.2. Flavonoidler	2
1.2.1. Flavonoidlerin kimyası.....	3
1.2.2. Serbest Radikaller	4
1.2.3. Oksidatif stres	5
1.2.4. Antioksidanlar	6
1.2.5. Süperoksit ve süperoksit dismutaz.....	9
1.3. Pinosembrin	13
1.3.1. Pinosembrinin farmakokinetiği	15
1.3.2. Pinosembrin analoglarının sentezi ve biyosentezi	15
1.3.3. Potansiyel terapötik uygulamalar ve etki mekanizması	15
1.4. Pinostrobin.....	21
1.4.1. Pinostrobin kimyası, sentezi ve analogları	22
1.4.2. Farmakokinetik çalışmalar	23
1.4.3. Farmakolojik aktiviteler	23
1.5. Gözün Genel Yapısı	26
1.6. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu	31
1.6.1. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunun sınıflandırılması.....	32
1.6.2. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda risk faktörleri	34
1.6.3. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda tedavi.....	35
1.6.4. Yaşa bağlı makula dejenerasyon ve oksidasyon.....	35
2. MATERYAL VE METOT	38
2.1. Materyal.....	38

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	38
2.2. Metot	39
2.2.1. SOD aktivite	39
2.2.2. Hücre kültürü uygulamaları.....	41
3. BULGULAR	50
3.1. Moleküllerin süperoksit dismutaz aktiviteleri	50
3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları	53
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR.....	65



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Propoliste bulunan temsili kimyasal bileşenler.....	2
Şekil 1. 2. Temel flavonoid yapısı	3
Şekil 1. 3. Flavonoidlerin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 1. 4. SOD'lar ile radikal oksijen türlerinin üretimi ve değişimi	10
Şekil 1. 5. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile O_2^- üretimi ve O_2^- ile WST1 reaksiyonu...	12
Şekil 1. 6. WST1 dolaylı analiz yönteminin şematik gösterimi	13
Şekil 1. 7. Pinosembrin kimyasal yapısı	14
Şekil 1. 8. Pinosembrinin potansiyel terapötik uygulamaları.....	14
Şekil 1. 9. Pinosembrinin ana mekanizmaları.	16
Şekil 1. 10. Pinosembrinin potansiyel terapötik uygulamaları.....	22
Şekil 1. 11. Pinostrobin kimyasal yapısı	22
Şekil 1. 12. Gözün genel yapısı	28
Şekil 1. 13. İleri yaşa bağlı makula dejenerasyonunun tipleri vardır: grafik atrofi ve koroidal neovaskülarizasyon.....	33
Şekil 1. 14. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu sınıflandırmasının gösterilmesi	33
Şekil 1. 15. Retinada meydana gelen oksidatif süreçler.....	36
Şekil 2. 1. ARPE-19 hücre hattı üzerinde H_2O_2 uygulaması.	44
Şekil 2. 2. ARPE-19 hücre serisine pinosembrin ve pinostrobin uygulanması.....	46
Şekil 2. 3. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrin ve pinostrobin uygulaması.....	47
Şekil 2. 4. MTT'in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.	48
Şekil 3. 1. Süperoksitin değişmesi	50
Şekil 3. 2. Blank 1, blank 2 ve blank 3'ün 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği.....	51
Şekil 3. 3. Pinosembrinin ve blank 1'in 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği	51
Şekil 3. 4. Pinostrobinin ve blank 1'in 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği	52
Şekil 3. 5. ARPE-19 hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi	53
Şekil 3. 6. ARPE-19 hücrelerinde pinosembrinin hücre canlılığına etkisi	54
Şekil 3. 7. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrinin hücre canlılığına etkisi	55
Şekil 3. 8. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrinin hücre canlılığına etkisi	56

Şekil 3. 9. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrinin hücre canlılığına etkisi	57
Şekil 3. 10. ARPE-19 hücrelerinde pinostrobinin hücre canlılığına etkisi	58
Şekil 3. 11. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşum öncesi pinostrobinin hücre canlılığına etkisi	59
Şekil 3. 12. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinostrobinin hücre canlılığına etkisi	60
Şekil 3. 13. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu sonrası pinostrobinin hücre canlılığına etkisi	61



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	8
Çizelge 2. 1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	38
Çizelge 2. 2. Kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları.....	39
Çizelge 2. 3. SOD aktivite testi prosedürü	40
Çizelge 3. 1. H ₂ O ₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar	53
Çizelge 3. 2. Pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri	54
Çizelge 3. 3. Oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	55
Çizelge 3. 4. Oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	56
Çizelge 3. 5. Oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri	57
Çizelge 3. 6. Pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri	58
Çizelge 3. 7. Oksidatif hasar oluşum öncesi pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	59
Çizelge 3. 8. Oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri.....	60
Çizelge 3. 9. Oksidatif hasar oluşumu sonrası pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri	61

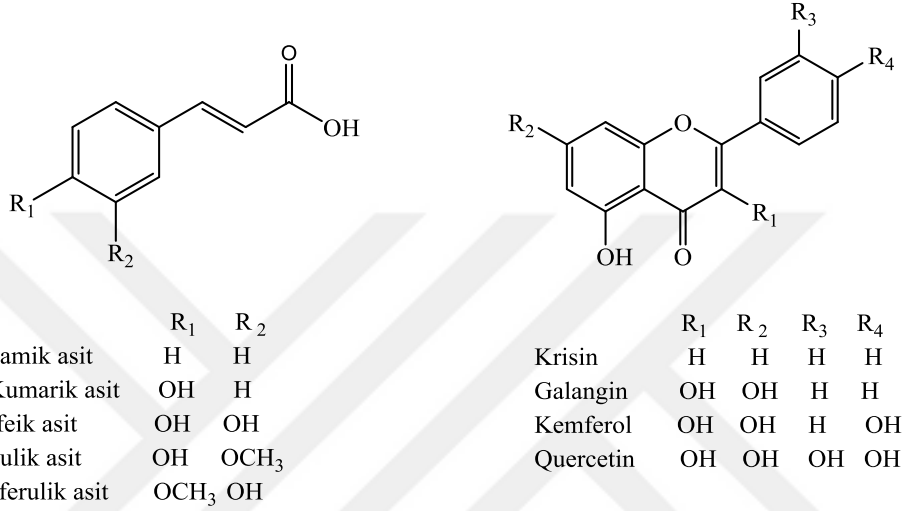
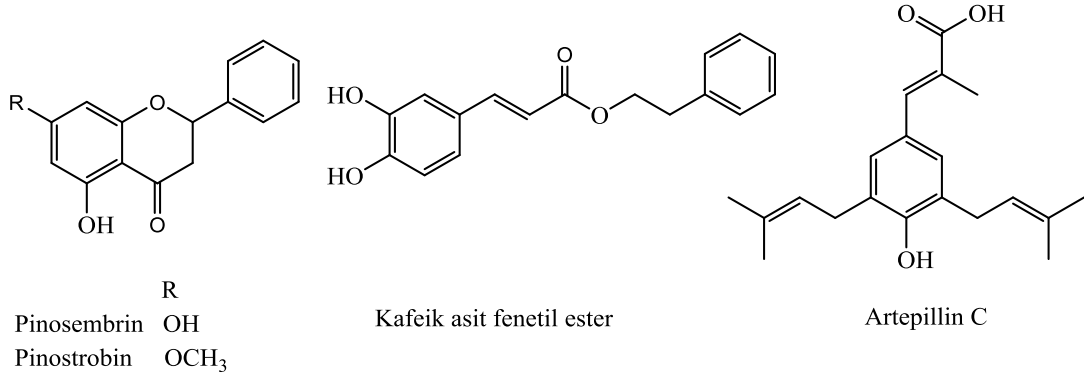
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AREDS	: The Age-Related Eye Disease Study
ARPE-19	: İnsan Retinal Pigment Hücre Dizisi
ATP	: Adenozin Trifosfat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbend Assay
EtOH	: Etilalkol
FBS	: Fetal Bovine Serum
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
Kcat	: Katalitik hız sabiti
M	: Molarite
mL	: Mililitre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
NO	: Nitrik Oksit
O₂⁻	: Süperoksit Anyonu
OH⁻	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphate Buffered Saline)
ROO⁻	: Peroksil Radikali
ROS:	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygene Species)
RPE	: Retina Pigment Epiteli
SOD	: Süperoksit Dismutaz
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WST	: 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol

1.GİRİŞ

1.1. Propolis

Propolis, ağaçlar ve çalılar gibi çeşitli bitki kaynaklarından bal arıları tarafından toplanan polifenol bakımından zengin reçineli bir maddedir. Rengi, toplanan bitkiye bağlı olarak değişkendir, kokusu yoğun ve aromatiktir (Pietta ve ark, 2002). 2000 yılına kadar propoliste flavonoidlere, terpenlere ve fenoliklere ait 300'den fazla kimyasal bileşen tanımlanmıştır. Bazı temsili kimyasal bileşikler Şekil 1.1'de özetlenmiştir. Ilıman bölge propolisindeki karakteristik bileşenler, krisin, galangin, pinosebrin, pinostrobin gibi kroman halka sisteminin ikinci pozisyonunda fenil sübstitüenti içermeyen flavonoidlerdir (Huang ve ark., 2014). Kimyasal bileşimi çok karmaşık olan propolis; üretildiği yerel floraya (Daugusch ve ark, 2008) ve toplanan arı türlerine bağlı olarak coğrafi orijine göre değişir (Silici ve Kutluca, 2005). Bu değişkenlik, farklı ekstraktların gösterdiği biyolojik özellikler arasındaki farklılıklarla sonuçlanır (Bankova ve ark., 2000). Propolis eski zamanlardan beri tamamlayıcı bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Castaldo ve Capasso, 2002). Propolisin önemli bir bileşeni olan flavonoidlerin, anti-inflamatuar, antioksidan, serbest radikal temizleyici, antitümoral, hepatoprotektif, vasküloprotektif, antiülser, intestinal motilite ve sekresyon inhibisyonu, antiosteoprotik, antialerjik, antimikrobiyal ve immünomodülatuar özellikleri yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Giulia ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Propoliste bulunan temsili kimyasal bileşenler (Huang ve ark., 2014)

Propolisinin farmakolojik etkinliğinin dört farklı mekanizmayla ortaya çıktığı belirtilmiştir. Serbest radikalleri yakalama kabiliyeti, biyolojik polimerlere ve ağır metal iyonlarına bağlanması ve elektron taşıma hızının artırılması ile etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir. Propolis bu özellikleri nedeniyle; antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan, antiülseratif, immünostimülan ve lokal anestezi etkiler göstermektedirler. Propolis içinde bulunan en etkili antioksidanın flavonoidler olduğu bilinmektedir (Mirzoeva ve Calder, 1996).

1.2. Flavonoidler

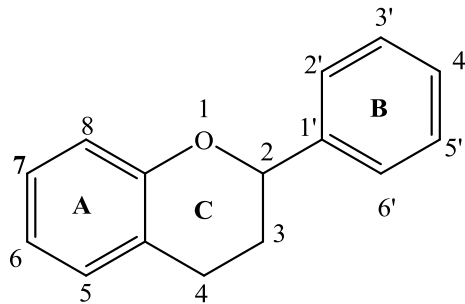
Flavonoidler, bitkilerde en karakteristik bileşik sınıflarından birini oluşturur. Çeşitli meyve ve sebzelere ek olarak, tohum, kuruyemiş, tahıl, baharat ve farklı şifalı bitkilerin yanı sıra şarap, çay ve bira gibi içeceklerde flavonoidler bulunur (Yang ve ark., 2001). Pek çok geleneksel ilacın terapötik etkilerinin flavonoidlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Van Acker ve ark., 1996).

Flavonoidler, ana iskelet olarak kroman halka sisteminin iki, üç veya dördüncü pozisyonuna fenil halkasının süstituent olarak bağlandığı polifenolik bileşiklerdir (Kumar ve Pandey, 2013). Bunlar ayrıca, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavanonlar, antosiyanidinler ve kateşinler dahil olmak üzere çeşitli alt sınıflara, alt kategorilere ayrılır. Pinosembrin ve pinostrobin, bunlara karşılık gelen glikozitler flavanon familyasına aittir (Sayre ve ark., 2015). Flavonoidler geniş farmakolojik aktiviteleri ve beslenme alanında uygulamaları nedeniyle ilgi görmüştür. Ayrıca antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-trombosit, anti-osteoporotik, anti-hepatotoksik, anti-viral, anti-diyabetik ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi gibi önemli etkileri vardır (Peng ve ark., 2003).

Antioksidanlar, önemli biyolojik süreçlere ve endüstriyel uygulamalara katılımları nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Dünya çapında, doğal bir ürünün sentetik bir kaynaktan daha sağlıklı olduğu kabul edilir. Bu görüş hala tartışmaya açıktır ve bu konuyla ilgili birçok çalışma yürütülmektedir (Lim ve ark., 1995).

1.2.1. Flavonoidlerin kimyası

Kimyasal olarak flavonoidler, bir heterosiklik tetrahidro-2*H*-piran halkasına (C) fused yapıda bir benzen halkasının (A) bağlanmasıyla oluşan kroman yapısının ikinci pozisyonuna bir fenil halkasının (B) da bağlanmasıyla oluşmuş on beş karbonlu bir iskelete dayanır (Kumar ve Pandey, 2013) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Temel flavonoid yapısı (Kumar ve Pandey, 2013)

Bunlar, flavonlar (apigenin ve luteolin), flavonoller (kuersetin, kaempferol, mirisetin ve fisetin), flavanonlar (hesperetin ve naringenin) ve diğerleri gibi çeşitli sınıflara ayrılabilirler. Flavonoidlerin halka yapılarının ve hidroksil gruplarının antioksidan olarak fonksiyon yapabilme potansiyeli vardır. Bu, flavonoidlerin hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayıları ile ilişkilidir (Kumar ve Pandey, 2013).

Flavonoidler aglikonlar, glikozitler ve metillenmiş türevler olarak ortaya çıkar. Temel flavonoid yapısı aglikondur. Benzen halkası ile yoğunlaştırılmış altı üyeli halka ya p-piron (flavonoller ve flavanonlar) ya da dihidroderivatif (flavonoller ve flavanonlar) 'dır. Benzenoid grubunun pozisyonu flavonoid sınıfını flavonoidlere (2-pozisyon) ve izoflavonoidlere (3-pozisyon) ayırır. Flavonoller flavanonlardan 3- pozisyonda hidroksil grubu ve bir C2-C3 çift bağı ile ayrılır. Flavonoidler genellikle hidroksile pozisyonları 3, 5, 7, 2, 3', 4' ve 5' 'dir. Metil eter ve alkol grubunun asetil esterlerinin doğada oluştuğu bilinmektedir. Glikozitler oluşturulduğunda, glikosidik bağlantı normal olarak pozisyon 3 veya 7'de bulunur ve karbonhidrat L-ramnoz, D-glikoz, glukaminozoz, galaktoz veya arabinoz olabilir (Middleton, 1984).

1.2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektronlara sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır. Serbest radikaller pozitif, negatif veya nötr yüke sahip olabilir. Bazı istisnalar dışında, eşleşmemiş elektronlar, radikallerin kimyasal olarak reaktif olmasına neden olurlar (Maiko, 2010). Eşleşmiş elektronları ayırıp onlardan elektron alabilir ya da elektron verebilirler. Bu şekilde başka moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yapan ve onların yapısını bozan moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROS: reactive oxygen species)” adı verilmektedir. Doku hasarına yol açan ROS'un aşırı üretimi de oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oluşan serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucunda protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi vücuttaki önemli moleküllerin yapılarının bozulmasına ve bununla birlikte pek çok biyolojik soruna neden olmaktadır (Gedikli, 2013). En önemli iki oksijen merkezli serbest radikaller süperoksit ve hidroksil radikalidir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle serbest radikaller, hücre hasarına yol açan istenmeyen yan reaksiyonlara katılabilirler. Bu serbest radikallerin aşırı miktarları, kanser, inme, miyokardiyal enfarktüs, diyabet ve majör bozukluklar gibi birçok hastalığa yol açan hücre hasarı ve ölümüne yol açabilir. Serbest radikaller yaşam için gereklidir ve vücut, serbest radikal kaynaklı hasarı en aza indirmek ve bunlardan kaynaklanan hasarları onarmak için süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri gibi bir dizi mekanizmaya sahiptir. Bu savunma mekanizmalarında antioksidanlar kilit rol oynar (Maiko, 2010).

1.2.3. Oksidatif stres

Oksidatif stres esas olarak ROS üretim düzeyinin anti-oksidanlardan daha yüksek olduğu biyolojik sistemlerde endojen oksidatif enzimler (NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, ya da mitokondriyal solunum zinciri gibi) ile anti-oksidan enzimlerin (SOD, glutatyon peroksidaz, hem oksijenaz, tiyoredoksin peroksidaz/peroksiredoksin, katalaz ve paraoksonaz gibi) aktivitesi arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (Förstermann, 2010).

Reaktif Oksijen Türleri

ROS, yüksek reaktiviteleri nedeni ile oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılım eğilimli olan oksijen metabolitleridir. Bazı ROS'lar dış yörüngelerinde aşırı kimyasal reaktivitelere neden olan eşleşmemiş elektronlara sahiptir [örneğin, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}), nitrik oksit (NO), peroksil radikali (ROO^{\cdot}) vb.]. Diğer ROS'lar, eşleşmemiş elektron içermezler ve bu nedenle radikal değildirler. Ancak diğer moleküllerle elektron alışverişi yapmaya meyillidir. Bunlar, hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), hipokloröz asit (HOCl) ve lipid peroksitleri (LOOH) içerir (Guzik ve ark., 2014). ROS, vasküler duvarın tüm katmanlarından, endotelyumdan, ortamdaki vasküler düz kas hücrelerinden, fibroblastlardan ve adventisyadan gelen inflamatuvar hücrelerden üretilir (Berry ve ark., 2000). ROS'lar endotel fonksiyonu ve NO üzerine etki ederler ve vasküler tonusu düzenleyen birçok biyolojik mediyatör ile etkileşirler.

ROS'ların biyolojik sistemlerde hem zararlı hem de yararlı etkilere sahip olabileceği iyi bilinmektedir. ROS'lar düşük konsantrasyonlarda, hücresel sinyalizasyon, vasküler tonus, bağışıklık tepkileri, inflamasyon ve hücre fonksiyonunu düzenleme gibi (örneğin, hücre farklılaşması ve büyümesi) birçok önemli fizyolojik role sahiptir. ROS molekülleri, çok sayıdaki biyolojik ve fizyolojik tepkilere etki eden redoks sinyallerini kontrol etme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, ROS'lar sinyal bileşiklerinin reaktif türler tarafından spesifik oksitleme-indirgeme reaksiyonlarının modifiye edicileri olarak bilinmektedir (Touyz ve ark., 2011). Diğer yandan, ROS'un yüksek konsantrasyonları, biyolojik sistemde hasar verici eylemleri (DNA'nın, lipidlerin ve proteinlerin oksidatif hasarları) teşvik eder ve birçok patolojik hastalıklara neden olmaktadır (Brieger ve ark. 2012).

1.2.4. Antioksidanlar

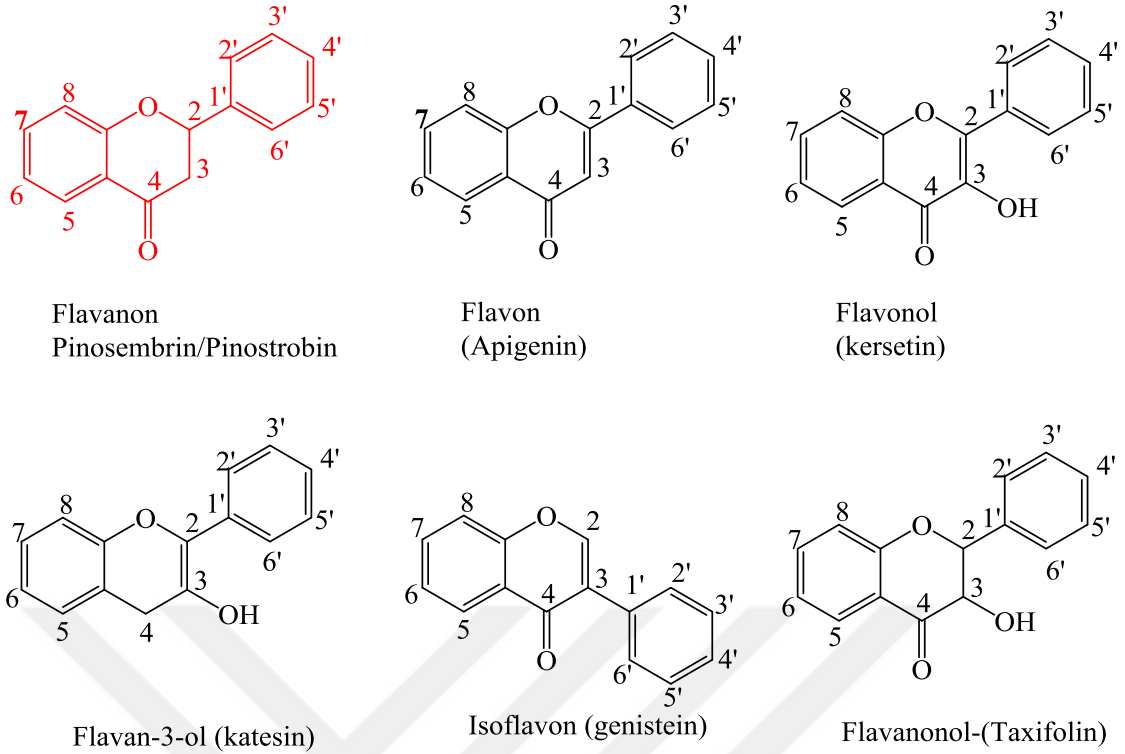
Antioksidanlar, hücreleri radikal olarak bilinen tekli oksijen, $O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , OH^{\cdot} ve $ONOO^-$ gibi ROS'zararlı etkilerine karşı koruyan bileşiklerdir. Antioksidanlar ve ROS arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur ve bu da hücrel hasara yol açar. Oksidatif stres, kanser, yaşlanma, ateroskleroz, inflamasyon, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Flavonoidler, antioksidan vitaminler ve enzimlerle birlikte insan vücudunun toplam antioksidan savunma sistemine katkıda bulunarak bu hastalıklara karşı koruma sağlamaya yardımcı olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, flavonoid alımının, koroner kalp hastalığından ve kalp krizlerinin insidansından kaynaklanan mortalite ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Heim ve ark., 2002). Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir (Gutteridge, 1995):

- Metal iyonlarını şelatlayarak radikal oluşumunu önleyebilir
- Daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürebilir (süpürme aktivitesi)
- Radikalleri yakalayıp bağlayarak nötralize edebilir (zincir kırma reaksiyonları)
- Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive edebilir (söndürme etkisi)
- Oksidatif hasar görmüş molekülleri onarabilir.
- Gerçek antioksidanların aktivitesini arttırabilir (sinerjistler)

Antioksidanlar olarak flavonoidler

Flavonoidler C6–C3–C6 difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır (flavan halkası). Flavonoidler, yapısal olarak altı gruba ayrılırlar (Ergin, 2015) (Şekil 1.3):

- Antosiyanidinler
- Flavonoller
- Flavonlar
- Flavanonlar
- Kateşinler (flavanoller)
- İzoflavonoidler



Şekil 1.3. Flavonoidlerin kimyasal yapıları (Ergin, 2015)

Flavonoidler antitoksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidler, LOOH zincirini kırabilen, $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} radikali gibi radikalleri sönmümlendirebilir, demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlayabilirler (Ergin, 2015).

Flavonoidlerin kimyasal yapısındaki OH^{\cdot} ve diğer fonksiyonel grupların konumu antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri için etkilidir. Polifenollerin fenolik hidrojenin hidrojen-verici radikal toplayıcılar olarak mevcudiyeti açısından kimyasal özellikleri, antioksidan aktiviteye sahip olacağını göstermektedir. Bir antioksidan olarak tanımlanmak için bir polifenol iki temel koşulu karşılamalıdır (Janeiro and Brett, 2004),

- Oksitlenecek olan substrata göre düşük konsantrasyonda mevcut olduğunda, ootoksidasyon veya serbest radikal aracılı oksidasyonu önlemeli
- Süpürme işleminden sonra oluşan radikal, moleküller arası hidrojen bağı ile stabil olmalıdır (Long ve ark. 1999).

Antioksidanlar ve oksidatif hasarın önlenmesi

Serbest radikal yakalayıcıları koruma sağlayabilmek için hücre içinde bölümlere ayrılmıştır. Lokalizasyonlarına göre intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Percival ve ark. 1998). Bunlardan SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz sadece

sitozolde dağılmayıp hücre içinde en fazla serbest radikalın üretildiği mitokondride lokalize olurlar. Hücre içi sitozolik savunmanın entegrasyonu yanı sıra plazmadaki çeşitli antioksidanların etkileşimi ekstraselüler kompartımandaki serbest radikal reaksiyonlarının baskılanması için önemlidir. En önemli biyolojik ekstraselüler antioksidanlar, glutatyon, E vitamini, glutatyon peroksidaz, SOD, katalaz ve seruloplazmindir.

Vücuttaki etki mekanizmalarına göre antioksidan mekanizmalar farklı gruplara ayrılmıştır. Bu sınıflandırma (Mazen, 2016),

- **Önleme:** Reaktif türlerin üretimini minimum düzeye indirirler, örneğin, desferrioksamin
- **Durdurma:** Katalitik ve katalitik olmayan molekülleri kullanarak reaktif türleri süpürürler, kendi elektronlarını ROS'a aktararak, ROS'un advers etkilerini nötralize ederler, örneğin, askorbik asit ve alfa-tokoferol
- **Onarım:** Hasarlı hedef molekülleri onarırlar, örneğin, glutatyon olarak yapılmaktadır.

Antioksidan sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (Heffner ve ark., 1989)

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik olmayan radikal yakalayıcı antioksidanlar	
	Suda çözünenler	Yağda çözünenler
SOD		
Katalaz	C vitamini	E vitamini
Glutatyon peroksidaz	Ürik asit	Bilirubin
Glutatyon-S-transferaz	Sistein	β karoten
Glutatyon redüktaz	Glutatyon	Flavanoidler Lipoik asit

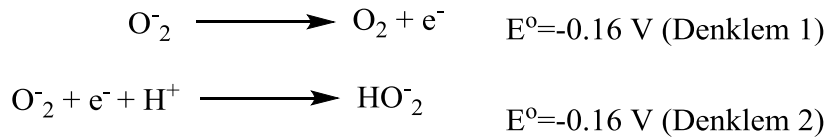
1.2.5. Süperoksit ve süperoksit dismutaz

Süperoksit

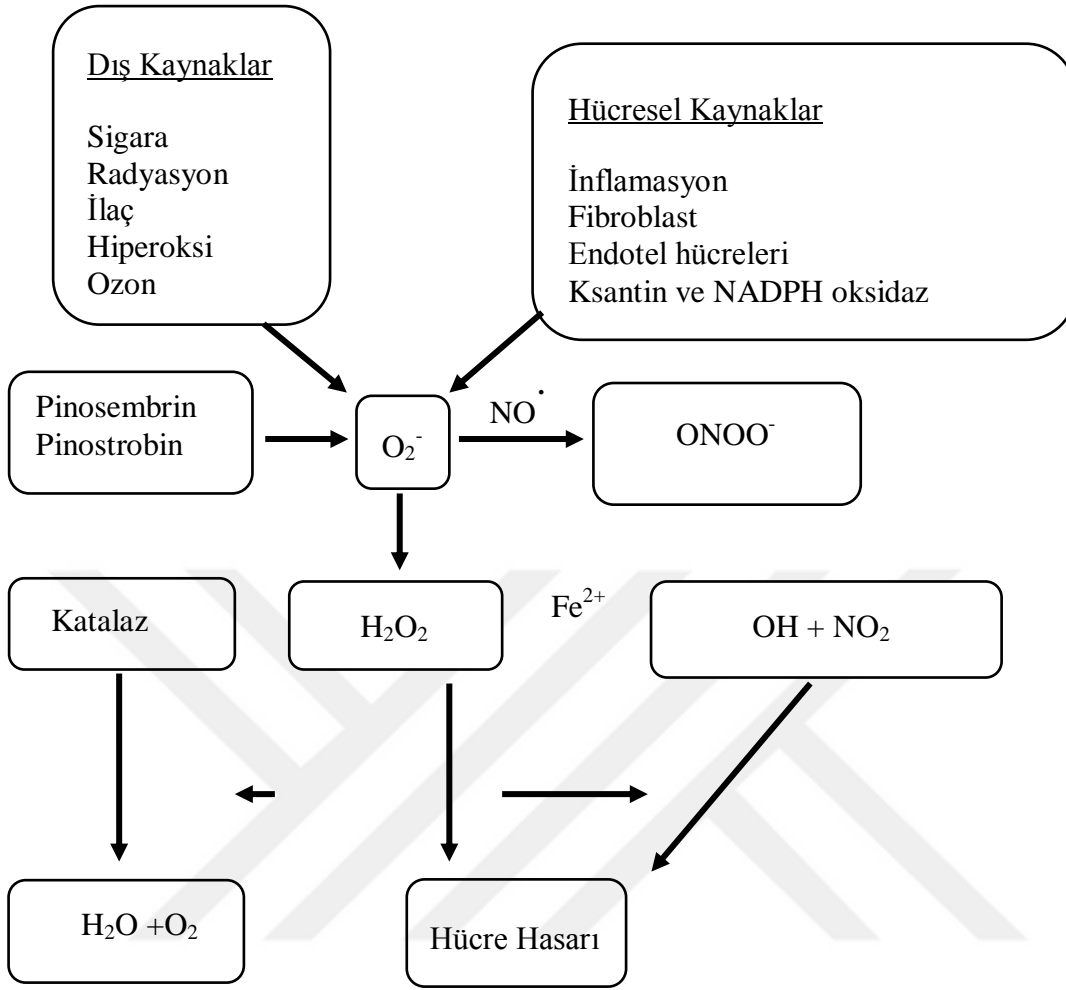
Aerobik olmayan fotosentetik organizmalar, güçlü dioksijen molekülünün suya enzimatik olarak indirgenmesi yoluyla enerji elde ederler. Hücreleri yeniden canlandırmak için dioksijen çok önemlidir ve sürekli olarak sağlanmalıdır. Tek hücreli ve diğer küçük organizmalar tarafından dioksijenin difüzyonu, hayatta kalmak için yeterli miktarda dioksijen sağlayabilir. Ancak daha büyük çok hücreli organizmalar için, oksijen difüzyonu her bir hücrenin yardımsız olarak beslenmesi için yeterince hızlı değildir (Valentine, 2007). Hemoglobin ve miyoglobin, omurgalılarda oksijenin hızlı bir şekilde verilmesine yardımcı olmak için dioksijeni bağlayan, depolayan ve salgılayan proteinlerdir. Oksijen respiratuar elektron transfer zincirinde terminal alıcıdır ve sitokrom C oksidaz ile indirgenerek, dört elektron oksijen ve suya dönüşür. Bununla birlikte, bu oksijenle kullanılan işlemler %100 verimli değildir ve potansiyel olarak zararlı O_2^- ve $ROO\cdot$ türleri olarak önemli miktarda oksijen kaybolur. Oksijen nadiren diğer elektron taşıma bileşenleri ile reaksiyona girer (Valentine, 2007).

Süperoksit (O_2^-), bir elektron dioksijenin indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikaldir (Stoys ve Bagchi, 1995).

O_2^- hem indirgeyici (Denklem 1) hem de oksitleyici bir maddedir (Denklem 2).



Süperoksidin oksidan ve indirgeyici özellikleri, H_2O_2 , hidroksil radikalleri, hipoklorür iyonları ve peroksinitrilleri içeren diğer tehlikeli reaktif türlere neden olur (Şekil 1.4) (Fridovich, 1989).



Şekil 1.4. SOD'lar ile radikal oksijen türlerinin üretimi ve değişimi (Köse, 2012)

Süperoksidin, Parkinson (Kocatürk ve ark., 2000) ve Alzheimer (De Leo ve ark., 1998) hastalıkları gibi birçok nörolojik bozukluğun bir nedeni olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bazı kanser türlerinin $O_2^{\cdot-}$ ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Toh ve ark, 2000). Oksidatif stres esas olarak ROS'un aşırı üretimine bağlıdır. Belirtilen nedenlerden dolayı, fizyolojik koşullar altında $O_2^{\cdot-}$ ve ROS'un seviyesini kontrol etmek için bir biyokimyasal savunma sistemi gereklidir (Köse, 2012).

Süperoksit dismutaz aktivitesi

SOD aktivitesini ölçme

Süperoksit serbest radikali nötr sulu solüsyonda kısa bir yarı ömre sahip olduğundan SOD aktivitesinin ölçülmesi oldukça zordur. SOD aktivitesini ölçmek için çok sayıda doğrudan ve dolaylı yöntem bildirilmiştir (Köse, 2012).

Doğrudan analiz

SOD aktivitesinin doğrudan ölçümü iki kategoriye ayrılır; durdurulan akış kinetik analizi ve pulse radiolizis'dir (Riley, 1999). Bu yöntemler, $O_2^{\cdot-}$ anyonunun spektrofotometrik bozulmasını doğrudan tampon çözeltisinde gözlemleyerek $O_2^{\cdot-}$ in değişme oranının hassas bir şekilde ölçülmesini sağlar. Pulse radyoliz metotları genellikle su içinde çözülmüş oksijenin (25 °C'de 1 atm altında yaklaşık 100 μ M olan) başlangıç konsantrasyonunun $O_2^{\cdot-}$ için sınırlayıcı faktör olduğu sabit durumdaki $O_2^{\cdot-}$ üretimine dayanır. Bu yöntemde, $O_2^{\cdot-}$, format varlığında oksijenle doymuş sulu çözeltilerin pulse ışınlanması ile üretilir. Maliyet ve ekipman ile ilgili problemler, bu yöntemin yaygın kullanımını sınırlandırmaktadır (Riley, 1999). Riley ve ark. (1991) 245-270 nm'de süperoksidin spektrofotometrik absorbansı ile $O_2^{\cdot-}$ bozulma kinetiklerini ölçmek için durdurulmuş akış kinetik yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, katalizsiz $O_2^{\cdot-}$ (ikinci derece kinetikler) bozunması, taranan kompleksin üzerinde büyük bir fazla $O_2^{\cdot-}$ varlığında $O_2^{\cdot-}$ (birinci mertebeden kinetikler) bozunmasından ayırt edilebilir. Değerlendirilmekte olan çeşitli metal kompleks konsantrasyonlarında süperoksidin birinci mertebeden bozulmasını değerlendirmek suretiyle gerçek katalitik SOD aktivitesine sahip bir ajan için ikinci dereceden bir katalitik hız sabiti (k_{cat}) elde edilebilir. Gerçek bir k_{cat} doğrudan değerlendirilmesi, belirli koşullar altında enzimlerin ve SOD aktivitesi gösteren bileşiklerin aktivitelerini doğrudan karşılaştırabilir (Riley ve ark., 1991).

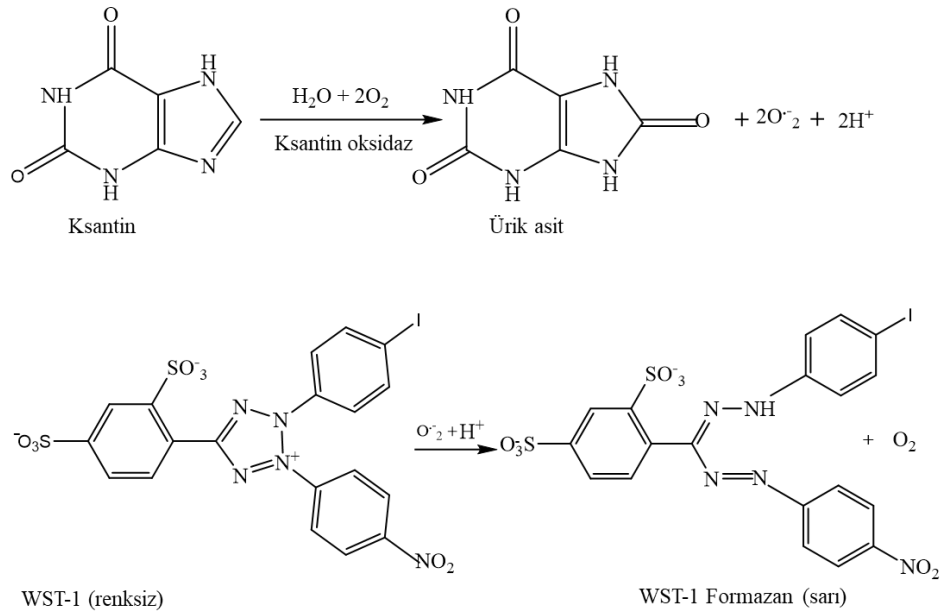
İndirekt analiz

İndirekt yöntemlerde, $O_2^{\cdot-}$, serbest radikali temizleyen gösterge molekülleri ile reaksiyona girecek şekilde enzimatik veya kimyasal olarak üretilmektedir. Fridovich ve McCord (1969)'un, sitokrom C 'yi kullanarak bir analiz geliştirmesinden sonra, SOD aktivitesini ölçmek için bu yöntemeye dayanan birtakım indirekt analizler başlatılmıştır. Sitokrom c ve nitroblue tetrazolium (NBT), kararlı durum düşük seviyelerde $O_2^{\cdot-}$ oluşturmak için ksantin/ ksantin oksidaz kullanan bir sistemde en yaygın kullanılan redoks indikatörleridir (Riley, 1999; Goldstein ve Czapski, 1991). $O_2^{\cdot-}$, indikatörü azaltır ve bu, spektral bir değişim sağlar. Eklenen bir reaktif $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerse, bu, $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonunu azaltarak indikatörün azalmasını engeller ve bu da SOD aktivitesinin bir ölçüsünü verir. İndirekt analiz, test edilen SOD aktivitesi gösteren bileşiklerin $O_2^{\cdot-}$ üretimini inhibe etmesi veya stokiyometrik olarak $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girmesi durumunda SOD aktivitesi için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Ek olarak, yan reaksiyonlar

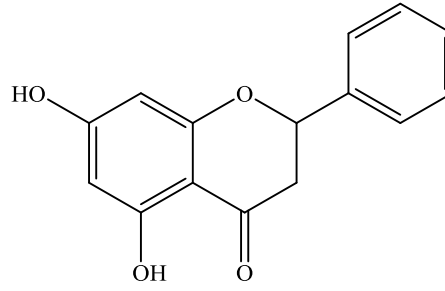
meydana gelebilir ve ölçümlere müdahale edebilir. Dolayısıyla, gerçek bir katalitik oranın belirlenemediği ve dolaylı analizlerden elde edilen *kcat* değeri ile aktivite arasında doğrudan karşılaştırma yapılamayacağı sıklıkla tartışılmaktadır (Riley, 1999).

NBT, kolaylık ve kullanım kolaylığı nedeniyle genellikle bir indikatör molekülü olarak kullanılır. Öte yandan, NBT'nin formazan boyasının suda az çözünürlüğü ve indirgenmiş ksantin oksidaz ile etkileşimi gibi bazı dezavantajları vardır. Yapılan çalışmalarda, O_2^- anyonu ile indirgendikten sonra suda çözünebilir bir formazan boya üreten 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST1) kullanmıştır. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi bir O_2^- kaynağı olarak kullanılmıştır (O_2^-) (Peskin ve Winterbourn, 2000).

Bu yöntemde, ksantin oksidaz aerobik oksidazlar ksantin üre haline gelmesi, bu işlemde O_2^- üretilmesidir. WST1, reaksiyonda oluşan O_2^- 'yi sarar, bu da Şekil 1.5'de gösterildiği gibi renksiz WST1'in sarı WST1 formazan'a indirgenmesine neden olur. WST1 formazan 440 nm'de karakteristik bir absorbans değerine sahip olduğundan, WST1'in WST1 formazanının O_2^- ile nicel olarak azaltılması spektrofotometrik olarak 440 nm'de ve 25 °C'de 20 dakika boyunca izlenmiştir. Test edilen kompleksin varlığında WST1 formazan'ın absorbans değerleri azalır. Bunun nedeni kompleksin WST1 ile yarışarak O_2^- 'yi yok etmesidir (Valentine, 2007).

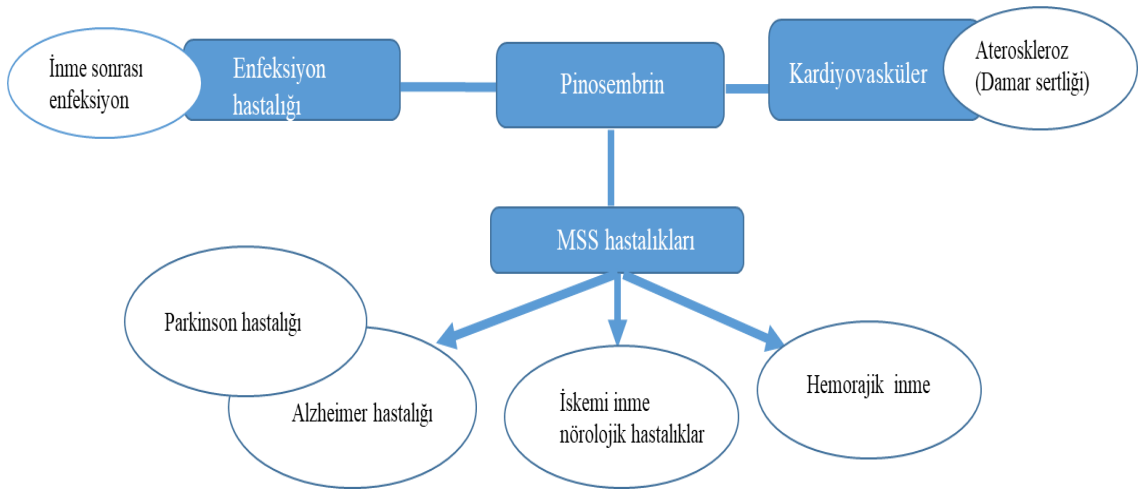


Şekil 1.5. Ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile O_2^- üretimi ve O_2^- ile WST1 reaksiyonu (Goldstein ve Czapski, 1991).



Şekil 1.7. Pinosembrian kimyasal yapısı (Rasul ve ark., 2013)

Farmakolojik çalışmalarda endotoksin şoku, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıkların tedavisi için çeşitli özellikler göstermiştir (Rasul ve ark., 2013). Oral uygulamadan sonra bu bileşiğin iyi metabolize edildiği ve absorbe edildiği dikkat çekicidir (Sayre ve ark., 2013). *İn vitro* olarak, kısmen p-glikoprotein tarafından yürütülen bir pasif nakil işleminde kan-beyin bariyerinden (KBB) geçtiği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2012). Bu bulgu, pinosembrianın, merkezi sinir sistemindeki (MSS) hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Önceki çalışmalar pinosembrianın antiinflamatuvar ve nörokoruyucu etkilere ve ROS azaltma, KBB'yi koruma, mitokondriyal fonksiyonu modüle etme ve apoptozu düzenleme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar, pinosembrianın beyni iskemik inme hasarına karşı koruyabileceğine göstermiştir (Şekil 1.8). Bu nedenle, 2008 yılında, pinosembrian iskemik inme geçiren hastalarda klinik araştırmalar için Çin Devlet Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmış ve Faz II klinik denemeleri yapılmaktadır (Anonymous, 2018a).



Şekil 1.8. Pinosembrianın potansiyel terapötik uygulamaları (Lan ve ark.,2016).

1.3.1. Pinosembrinin farmakokinetiği

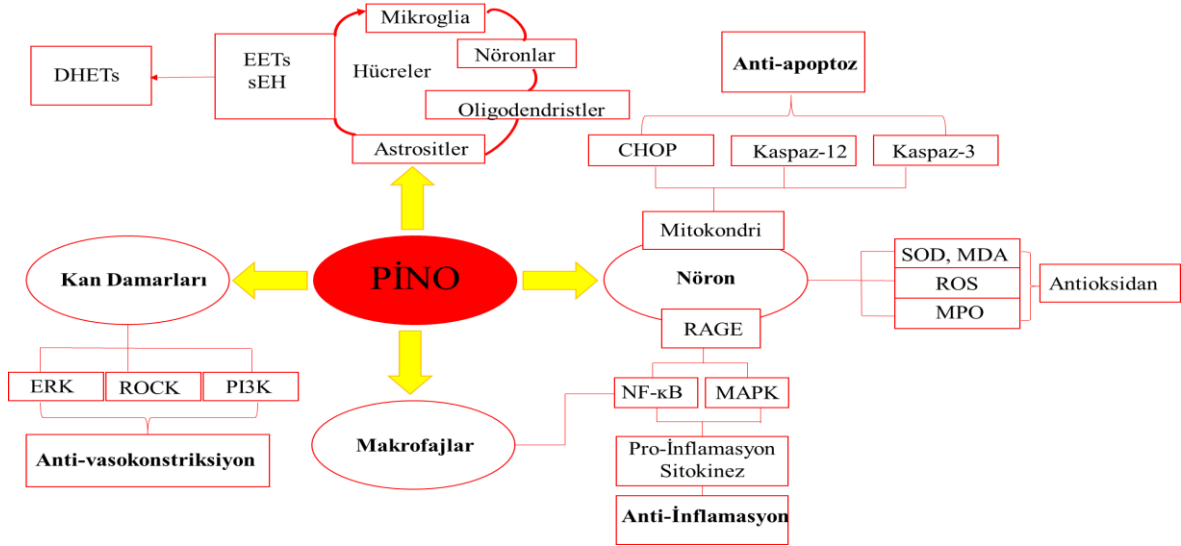
Klinik öncesi çalışmalarda, sıçan plazmasında pinosembrini saptamak için iki yöntem kullanılmıştır. İlk olarak, araştırmacılar intravenöz enjeksiyonla (i.v.) sıçanlara 22,5 mg/kg veya 67,5 mg/kg pinosembrin uygulamışlar ve daha sonra ultraviyole tespiti ile ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisini kullanmışlardır (Yang ve ark., 2009). İkinci çalışmada, sıçanlara i.v. 10 mg/kg pinosembrin ile yüksek performanslı sıvı kromatografik-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi, plazmadaki S-pinosembrin ve R-pinosembrini tespit etmek için kullanılmıştır (Sayre ve ark., 2013). Klinik çalışmalarda, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi, sağlıklı gönüllülerin plazmasında pinosembrini ölçmek için kullanılmıştır (Anonymous, 2018a).

1.3.2. Pinosembrin analoglarının sentezi ve biyosentezi

Pinosembrin ilk olarak 1992 yılında *Eriodictyon californicum*'dan izole edilmiştir (Liu ve ark.,1992). Bitkilerde pinosembrin, fenilalanin amonyak liyaz, 4-kumarat-CoA ligaz ve kalkon sentaz enzimi olmak üzere üç enzimin etkisiyle fenilalaninden sentezlenmektedir. (Weisshaar ve Jenkins, 1998). Bu bulguya dayanarak, büyük miktarlarda pinosembrin, rekombinant *Escherichia coli* (Kaneko ve ark., 2003) ve bir yapay gen kümesi içeren *Saccharomyces cerevisiae*'den (Yan ve ark., 2005) biyosentezlenmiştir. Yuan ve ark. (2008), pinosembrin endüstriyel üretimini elde etmek için, bir kiral primer amin veya bir kiral sülfenamidi çözücü olarak kullanarak uygun bir sentez yöntemi geliştirmişlerdir.

1.3.3. Potansiyel terapötik uygulamalar ve etki mekanizması

Doğal bileşiklerin biyolojik aktivitesi genellikle, aktivitelerin mekanizmalarına vurgu yaparak incelenmektedir. Pinosembrinin biyolojik özelliklerini belirlemek ve aktivite mekanizmalarını aydınlatmak için *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu durumda, bazı araştırmacılar, OH' grubunun pinosembrinin ve onun analoglarının biyolojik aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için fonksiyonel grupların bazı moleküllerin biyolojik aktivitesi üzerindeki etkisini ortaya koymuştur (Rasul ve ark., 2013) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Pinosembriin ana mekanizmaları (Lan ve ark.,2016).

1.3.3.1. İnme

Geçtiğimiz on yılda, çeşitli çalışmalar pinosembriin serebral iskemik hasara karşı koruyabildiğini göstermiştir (Shi ve ark., 2011). Nöro-koruyucu (Izuta ve ark., 2008), antioksidan (Liu ve ark., 2008) ve anti-inflamatuar etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir. Pinosembriin, iskemik inme geçiren sıçanlarda koruyucu etki gösterir (Shi ve ark., 2011). Bu tür bulgular, yeni ve etkili ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için umut verici bir bileşik olduğunu göstermektedir (Lan ve ark.,2016).

Pinosembriin orta serebral arter tıkanıklığı (MCAO) hayvan modellerinde etkileri

Pinosembriin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan ilk inme modeli MCAO dur. Gao ve ark. (2008), kalıcı serebral iskemi (pMCAO) olan sıçanlarda, pinosembriin (10 mg/ kg, i.v.) beyin şişmesini azaltabildiğini göstermiştir; davranışsal açıkları iyileştirmek ve nöronal apoptoz, astrositik son ayakların ödemi ve endotelial hücrelerin ve kılcal damarların deformasyonunu hafifletir. Ayrıca, pinosembriin aynı zamanda matriks metalloproteinaz-9 protein ekspresyonunu azaltarak ve sıkı birleşme proteini zonula tıkanıklığının mRNA seviyesini azaltarak KBB'yi korumuştur. Nörovasküler ünite üzerinde hareket eden pinosembriin, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi proinflamatuar sitokinlerin, hücreler arası adezyon molekülü-1 ICAM-1 gibi kemokinlerin, vasküler hücre seviyesini azaltır. Pinosembriin adezyon molekülü-1 (VCAM-1), indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ve akuaporin-4 üzerindeki etkilerinden dolayı da güçlü bir anti-inflamatuar etkiye sahip ajan olduğunu düşündürmektedir.

Pinosembrin (10 mg / kg) da MCAO-reperfüzyon hayvan modelinde iskemik sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2008). Pinosembrinin, MCAO sıçanlarında protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6), ökaryotik başlangıç faktörü (eIF2 α) sinyal yoluyla C/EBP homolog protein (CHOP)/GADD153 ve kaspaz-12 ekspresyonunu azaltarak endoplazmik retikulum stresi ve apoptozu azalttığı öne sürülmüştür (Wu ve ark., 2013).

***İn vitro* çalışmalar**

Pinosembrinin nöronal canlılığı arttırdığı, laktat dehidrojenaz salınımını azalttığı, NO ve ROS üretimini inhibe ettiği, glutasyon düzeylerini artırdığı ve oksijen-glikoz yoksunluğuna maruz kalan birincil kortikal nöronlarda nöronal NO sentezinin (nNOS) ve iNOS gen ekspresyonunu down regüle ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar pinosembrinin *in vitro* nöroprotektif olduğunu göstermektedir (Liu ve ark., 2008).Yapılan başka bir çalışmada, pinosembrin ayrıca mitokondriyal fonksiyonu ve apoptozu düzenleyebildiği bildirilmiştir. Oksijen glikoz yoksunluğu / reperfüzyon (OGD/R)'ye maruz kalan birincil nöronlarda pinosembrin, kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2008). Kaspaz-3 aktivitesindeki azalma, SH-Sy5y hücrelerinde de gösterilmiştir (Izuta ve ark., 2008).

Glutamat ile indüklenen SH-Sy5y hücre dizisinde pinosembrinin sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını azalttığı ve pro-apoptotik Bax'ın sentezini azalttığı gösterilmiştir (Gao ve ark. 2008).

Pinosembrin ayrıca KBB'yi *in vitro* koruduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Ma ve ark., 2018). Meng ve ark. (2011), pinosembrinin OGD/R hasarı ve artmış mitokondriyal membran potansiyelinden kültürlenmiş sıçan serebral mikrovasküler endotelial hücreleri koruduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar pinosembrinin sadece nöroprotektif değil, aynı zamanda vasküler koruma sağladığını ve inme sırasında terapötik uygulamasını desteklediğini düşündürmektedir (Lan ve ark., 2016).

In vivo ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen verilerin artması, pinosembrinin iskemik inmeyi tedavi etmek için bir aday ilaç olabileceği fikrini desteklemektedir. Pinosembrinin nöroprotektif etkileri doğrudan diğer bitkisel ürünlerle karşılaştırılmamasına rağmen, akut toksisite testleri farelerde i.v pinosembrinin LD50'sinin 700 mg/kg'dan daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

1.3.3.2. Nörodejeneratif hastalıklar

Pinosembrinin Alzheimer hastalığı üzerindeki etkisi *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda mevcuttur. Liu ve ark. (2012), *in vitro* çalışmalar için gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) için reseptör ile transfekte edilen hücreler, amiloid öncü proteinini İsveç mutasyonu (APP^{sw}) ile aşırı ifade eden bir SH-Sy5y hücre hattı ve amiloid-b peptid (A β)₂₅₋₃₅ ile indüklenen nöronlar olmak üzere üç tip hücre hattı kullanmışlardır. Pinosembrinin (10 μ M) RAGE ve downstream sinyal yollarını inhibe ettiğini, RAGE proteininin pinosembrin hedefi olabileceğini ve pinosembrinin APP^{sw} SH-Sy5y hücre hattında mitokondriyon aracılı apoptosisi düzenlediğini göstermişlerdir. Liu ve ark., (2014), ayrıca APP/PS1 transgenik farelerde, pinosembrinin oral uygulamasının, esas olarak glial aktivasyonu inhibe ederek ve APP/PS1 transgenik farelerde RAGE ile indüklenmiş p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ekspresyonunu down regüle ederek öğrenme ve bellek eksikliklerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu veriler pinosembrinin nöroinflamasyonunu hedefleyerek beyni koruyabileceğini göstermektedir. Pinosembrinin nörotoksitesiteyi azalttığı ve 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP (+)) ile tedavi edilen SH-Sy5y hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyonu inhibe ettiği ve 6-hidroksi dopamin (6-OHDA)'da tedavi edilen SH-Sy5y hücreleri Nrf2/ARE yolunda nöronal ölümün azaldığı bildirilmiştir (Jin ve ark., 2015). Parkinson hastalığında potansiyel bir uygulama olduğunu düşündürmektedir (Lan ve ark., 2016).

1.3.3.3. Kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz

Pinosembrinin kardiyovasküler hastalıkları ApoE'yi düzenleme ve rho kinaz (ROCK) azaltma yeteneğine bağlı olarak etkilediği düşünülmektedir (Li ve ark., 2013). Li ve ark. (2013), yaptıkları bir çalışmada pinosembrinin, MYPT1/Thr696 ve ROCK1'in fosforilasyonundaki anjiyotensin II ile indüklenen artışı inhibe ettiğini göstermiştir. Pinosembrinin neden olduğu vasküler kontraksiyonun inhibisyonu, MYPT1/Thr696 fosforilasyonunun ve ROCK1 ekspresyonunun azaltılması ile gerçekleşir. Ayrıca, pinosembrinin Ca²⁺ konsantrasyonu ve ERK1/2 aktivasyonundaki artışı baskılayarak ve aortunda anjiyotensin II tip I reseptörünü (AT1R) bloke ederek anjiyotensin II ile indüklenen vazokonstriksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2013). Sang ve ark. (2012), 14 hafta boyunca Simvastatin ve pinosembrin ile kombine tedavinin, ApoE^{-/-} farelerde serum lipid seviyelerini, gelişmiş endotel fonksiyonlarını ve azalan ateroskleroz semptomlarını anlamlı düzeyde azalttığını belirlemişlerdir. Kombinasyon tedavisinin etkisi,

tek başına Simvastatin'den daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgularda, pinosembrinin diğer ilaçlar ile kombine edildiğinde ateroskleroza tedavi etmek için kullanılabileceğini belirtmemişlerdir. Yang ve ark. (2013), pinosembrinin PI3K/AKT/eNOS yolu ile kemik iliği kaynaklı endotelial progenitor hücrelerin (EPC) biyolojik fonksiyonlarını geliştirdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, pinosembrinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak ateroskleroz dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkilerini doğrulamak için daha fazla bilgi gerektiğini bildirmişlerdir (Yang ve ark., 2013).

1.3.3.4. İnflamatuar ve bulaşıcı hastalıklar

Yukarıda belirtildiği gibi, anti inflamasyon, pinosembrinin ana mekanizmalarından biridir. Bu nedenle, birçok deney, inflamatuvar hastalıkların tedavisinde pinosembrin olası uygulamalarını araştırılmıştır. Soromou ve ark. (2012), *in vitro* bir çalışmada, pinosembrinin, murin makrofaj ve endotoksin kaynaklı akut akciğer hasar modelinde proinflamatuvar sitokinleri inhibe ettiğini, kısmen de MAPK ve NF- κ B aktivasyon düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir. *In vivo* olarak, pinosembrin ile ön tedavi (intraperitoneal, 50mg/kg), lipopolisakkarid (LPS) ile indüklenen iltihaplanmanın bir murin inflamasyon modelinde ve akciğer hasarını azalttığı bildirilmiştir. Soromou ve ark. (2014), diğer bir çalışmada pinosembrin ile ön tedavinin (intraperitoneal, 20mg/kg veya 50mg/kg) farelerde LPS ile indüklenen endotoksin şokundan mortaliteyi azalttığını; bununla birlikte, pinosembrin ile tedavi sonrası herhangi bir terapötik etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Pinosembrinin ilk olarak 1977'de anti-fungal özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir Metzner ve ark., 1977). On yıllardan beri çalışmalar, pinosembrinin *Penicillium italicum* (Sala ve ark., 2003), *Candida albicans* (Katerere ve ark., 2012), *Staphylococcus aureus* (Katerere ve ark., 2012; Soromou ve ark., 2013), *E. coli* (Katerere ve ark., 2012; Hegazi ve ark., 2000), *Bacillus subtilis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Streptococcus mutans* (Barrientos ve ark., 2013) ve *Neisseria gonorrhoeae* (Ruddock ve ark., 2011) aktivitesini anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Soromou ve ark. (2013), pinosembrinin α -haemolisin üretimini azalttığını ve düşük konsantrasyonlarda α -haemolisin aracılı hücre hasarını zayıflattığını ve *S. aureus* ile indüklenen pnömoniden korunmuş fareleri bildirmiştir. Birlikte, bu bulgular pinosembrinin anti-inflamatuar mekanizmaları hakkında bilgi verir ve anti-enfeksiyöz etkiyi vurgulayarak, pinosembrinin inme sonrası

enfeksiyonları tedavi etmek için bir ilaç adayı olabileceğini düşündürmektedir (Lan ve ark., 2016).

1.3.3.5. Antikanser Etkinliği

Sentetik ilaçların toksik etkilerinden dolayı veriler, mevcut tedavi seçeneklerin kanser hastalıklarında sınırlı terapötik başarıya sahip olduğunu göstermektedir; bu nedenle, normal hücrelerde sitotoksik etki olmadan kanser hücrelerinde apoptoz ve büyüme tutukluğunu selektif olarak indükleyen yeni doğal ürünlerin tanımlanmasına önemli ölçüde vurgu yapılmaktadır. Apoptoz, hücre ölümünde son derece senkronize bir model olarak tanımlanır ve hücre zarı blabbing, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon dahil olmak üzere farklı morfolojik özellikler ile karakterize edilir (S. Elmore, 2007). Normal hücre regülasyonu ve hastalık koşulları sırasında sinyallemenin önemi fark edilmiştir (Evan ve Vousden, 2001) ve kanser hücrelerinin kritik hızlı çoğalması olan sinyalleme düzeylerinde birçok iyi bilinen hedef belirlenmiştir. Normal hücrelerde, bazı hücrel sinyallerin büyümelerini ve tüm büyüme mekanizmalarını kontrol edip düzenlediğine ve hücrelerin apoptosise maruz kalmasını engelleyen çeşitli mutasyonlar nedeniyle bu sinyaller değiştirildiği zaman normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüştüğü ve hiperproliferasiyona uğradığı düşünülmektedir. Bu nedenle, kanserli hücre proliferasyonunu durdurmak için apoptozun düzenlenmesi kritik bir rol oynamaktadır. (Fulda, 2010). Yapılan çalışmalar, çeşitli antikanser kemopreventif ajanların kanserli hücrelerde ölümlere neden olan apoptozisi indükleyebileceğini düşündürmektedir (Rasul ve ark., 2012). Bazı çalışmalar, pinosembrinin inisiyasyonu inhibe edebileceğini, geciktirebildiğini, bloke edebildiğini veya tersine çevirdiği gösterilmiştir (Rasul ve ark., 2013).

Anterior yapılan araştırmaya göre, pinosembrin, insan göbek kordonu endotelial hücrelerine karşı nispeten daha az toksisitesi olan, kolon kanseri hücre hattı (HCT116) gibi belirli kanser hücresi kuşaklarına karşı sitotoksikite göstermiştir (Kumar ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada; HCT116, pinosembrin artmış hem oksijenaz, kaspaz-3, 9 ve mitokondriyal membran potansiyelinin aktivitesini artırdığı ancak sitokrom P450 redüktaz, kinon redüktaz, UDP glukuronosil transferaz ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerini etkilemediği görülmüştür (Kumar ve ark., 2007). Bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara rağmen, pinosembrinin endotelial progenitor hücreler (EPH)'lerin farklılaşmasını destekleyebileceğini ve sıçan karaciğer mikronükleus ve orta dönem

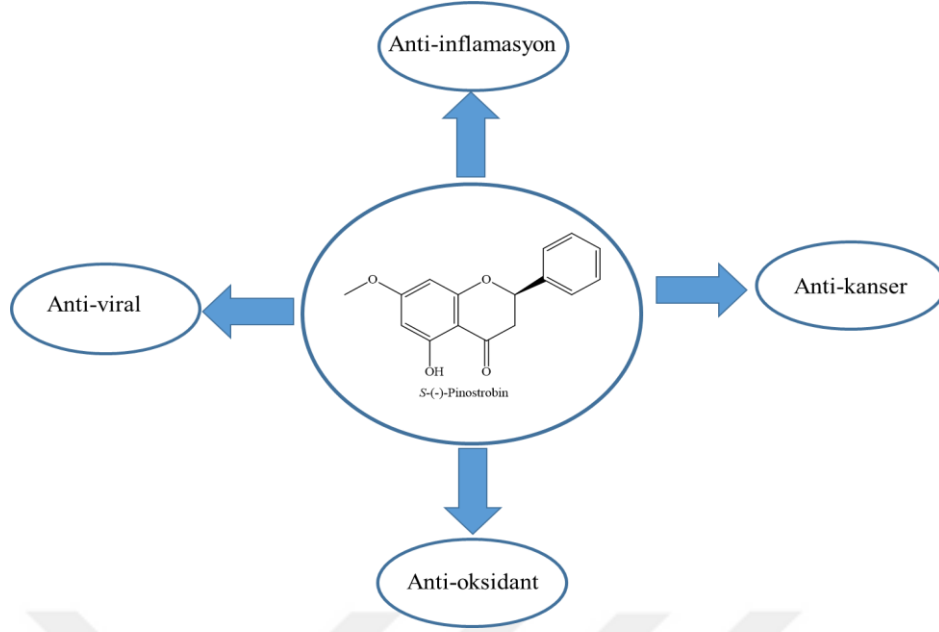
karsinogenisitede biyolojik fonksiyonları iyileştirebileceğini ortaya koymaktadır. Pinosembrin, dietilnitrozamin enjeksiyonundan önce verildiği zaman, GST-P pozitif odakların, PI3KeNOS-NO sinyal yolunun sayısını ve EPH'lerin yapışmasını hafifçe arttırmıştır. Pinosembrinin etkisi, kimyasal kaynaklı hepatokarsinogenezin korunmasına yardımcı olabilir ve bu bileşiğin teşvik edici etkisinin lipit peroksidasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (Punvittayagul ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalar, pinosembrinin potansiyel antioksidatif, antiinflamatuvar, antitümör ve antimikrobiyal özelliklere sahip iyi bir farmakolojik ilaç olabileceğini düşündürmektedir. Birkaç araştırma sonucu pinosembrinin hem *in vitro* hem de *in vivo* potansiyel uygulamalarını göstermiştir. Pinosembrin, küçük moleküler ağırlığa sahip doğal bir üründür, maliyeti ve gelecekteki terapötik potansiyeli ile birleşerek onu ideal bir terapötik madde haline getirir. Geliştirilmiş farmakokinetik ve farmakodinamiğe sahip pinosembrin analogları ayrıca daha ileri ilerlemeleri de teşvik edebilir. Birçok çalışma, pinosembrinin birçok kanser hücresi tipinin apoptozunu indüklediğini, ancak etki mekanizmalarının tam olarak açıklanmadığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar, pinosembrinin bir farmasötik ajan olarak doğrudan tıbbi uygulama oluşturabileceğini ya da hastalıkların tedavisi için yeni maddelerin tasarımı, sentezi ve yarı-sentezi için kimyasal şablonlar olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Rasul ve ark., 2013).

Çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bir tıbbi ajan olarak pinosembrinin medikal uygulamalarını daha fazla doğrulamak ve potansiyel rolünü açıklığa kavuşturmak için anti inflamatuvar, antikanser ve apoptotik etki mekanizmalarını tam olarak anlamak için spesifik hücre içi etki alanı ve türev hedeflerini belirlemek için ek çalışmalar ve klinik çalışmalar gerektiği bildirilmiştir (Rasul ve ark., 2013).

1.4. Pinostrobin

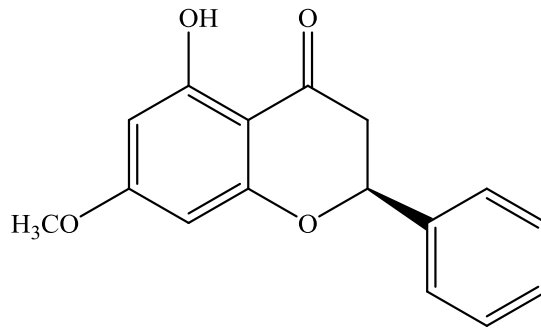
Bir diyet biyoflavonoidi olan pinostrobin (5-hidroksi-7-metoksi flavanon), Tay zencefil (*Boesenbergia pandurata Roxb.*), bal, propolis vb. dahil olmak üzere yenilebilir gıda maddelerinde bulunmaktadır. Pinostrobin, anti-inflamatuvar aktivite, gastroprotektif aktivite, kinon redüktaz indükleyici aktivite, anti-oksidan aktivite, anti-mikrobiyal aktivite, anti-viral aktivite, anti-nosiseptif aktivite, anti-kanser, anti-fungal aktivite gibi birçok farmakolojik aktivite ile ilişkilidir (Şekil 1.10) (Neeraj ve ark., 2016).



Şekil 1.10. Pinosembrinin potansiyel terapötik uygulamaları (Patel ve ark., 2016)

1.4.1. Pinostrobin kimyası, sentezi ve analogları

Pinostrobin ayrıca Pinosembrin-7-metileter ve 5-hidroksi 7-metoksiflavanon olarak da adlandırılır, flavanon sınıfına aittir (Şekil 1.11). Pinostrobin fotokimyasal olarak stabil bulunmuştur (Matsuura ve ark., 1973). Korenaga ve ark. (2011), optik olarak saf (S)-(-) pinostrobin kimyasal sentezini, %90'lık toplam verim ile üç aşamada optik saflık ile doğal formdaki (S)-(-)-pinostrobin veren %90'lık substitue kiral 2-hidroksifenilpropanonun molekül içi mitsunobu reaksiyonu yoluyla elde etmişlerdir. Mashentseva ve ark. (2011), geçiş metalleri ile kompleks veren pinostrobin oksim bileşiklerinin biyolojik aktivitesini değerlendirmiştir. Kul'magambetova ve ark. (2002), γ -piron halkasında değişiklik olmaksızın, pinostrobinleri mukozal oksim ve hidrazonunu hidrosilamin ve hidrazin ile hazırlamıştır. Son zamanlarda pinostrobin bir triazol bağlayıcı içeren kumarin-kalkon melezlerini sentezlemek için bir başlangıç malzemesi olarak kullanılmıştır (Mukusheva ve ark., 2015).



Şekil 1.11. Pinostrobin kimyasal yapısı (Patel ve ark., 2016)

1.4.2. Farmakokinetik çalışmalar

2011 yılında Hua ve ark. sıçan plazmasında pinostrobin tayini için bir iç standart olarak isoliquiritigenin ile sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) kullanılarak hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Pinostrobin farmakokinetiğini incelemek için bu yöntemi uygulamışlardır. Sonuçlar, oral doz 0,5 mg/kg pinostrobin sonrasında C_{max} 615.35 ng/mL, t_{max} = 4 saat ve $t_{1/2}$ = 4,34 dakika olarak bulunmuştur (Hua ve ark., 2011).

1.4.3. Farmakolojik aktiviteler

1.4.3.1. Antioksidan aktivite

Pinostrobin anti-oksidan aktivitesi, *in vitro* 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) süpürme deneyinin araştırılmasıyla belirlenmiştir. Çalışma pinostrobin anti-oksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Kanada'dan propoliste bulunan pinostrobin de DPPH'ye karşı anti-radikal aktivite gösterdiği bulunmuştur (Christov ve ark., 2006). Pinostrobin, askorbik asit ile karşılaştırıldığında, 116.11 ± 0.004 'lük ferrik indirgeme/anti-oksidan gücü (FRAP) değerini göstermiştir (Abdelwahab ve ark., 2011). Bir başka çalışmada, balda bulunan belirgin bir flavonoid olan pinostrobin, memeli faz II enzimlerini indüklediği bildirilmiştir. Murin hepatoma hücrelerinde pinostrobinin kinaz redüktaz (QR) aktivitesini ikiye katlamak için 0.5 μ M olarak bulunmuştur (Fahey ve Stephenson, 2002). Başka bir çalışmada, pinostrobin sülforafan ile karşılaştırılabilir güçlü QR indükleme etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, pinostrobin (>132) kemoprevention indeksi (CI), sülfosfanın (25.0) oranından daha yüksek bulunmuştur (Su ve ark., 2003).

1.4.3.2. Anti-inflamatuar aktivite

Panthong ve ark. (1994), 300 mg/kg'lık bir pinostrobin oral dozunda, %10,3 ödemde bir inhibisyon olduğunu gösterilmiştir. Pinostrobin, sıçanların makrofajlarında ve Sprague Dawley sıçanlarında TNF- α ve IL-1 üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir (Patel ve Bhutani, 2014). NO için pinostrobin yarım maksimum inhibitör konsantrasyonunun 43.2 μ M olduğu bulunmuştur (Lee ve ark., 2013). Pinostrobinin, siklooksijenaz (COX I ve II) enzimleri üzerinde 100 μ g/mL konsantrasyonda zayıf inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2002).

1.4.3.3. Nörodejeneratif bozuklukların nöroaktif özellikleri ve tedavisi

Nicholson ve ark. (2010), pinostrobin anti-depresan ilaçların farmakolojik etkilerini, aynı testte 299 mcM'lik bir IC50 sergileyen anti-konvulsant ve sodyum kanal inhibitörü karbamazepine kıyasla 23 µM'nin maksimum yarım konsantrasyonu ile örneklendirdiğini göstermiştir. Bununla birlikte, pinostrobinlerin sodyum kanal kompleksi üzerindeki spesifik bağlanmasına ilişkin daha fazla araştırmanın gerekli olduğunu ileri sürmüşlerdir (Nicholson ve ark., 2010).

Başka bir çalışmada, pinostrobin (1–40 µM) Alzheimer önleyip, etkilerini gösteren kültürlenmiş sıçan feokromositoma (PC12) hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ 'e bağlı nörotoksositeye karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu nöro-koruma, hücre canlılığının yükselmesi, laktat dehidrojenaz aktivitesindeki azalmanın, $A\beta_{25-35}$ ile tedavi edilen PC12 hücrelerinde hücre içi reaktif oksijen türleri ve kalsiyum seviyelerinin yükselmesiyle teyit edilen oksidatif hasar ve kalsiyum aşırı yüklenmesinin engellenmesiyle kolaylaştırılmıştır. Ayrıca, pinostrobin, hücrel apoptozun mitokondriyal yolunun azalmasını gösteren Bcl-2/Bax oranındaki artışla DNA fragmentasyonunun oluşumunu önemli ölçüde baskıladığı bulunmuştur (Xian ve ark., 2012).

1.4.3.4. Antikanser aktivitesi

Bail ve ark., (2000), pinostrobin ile östrojen reseptörü arasındaki etkileşimi, stabil olarak transfekte edilmiş bir meme kanseri hücre hattında sırasıyla 17p-estradiol (E2) veya dehidroepiandrosteron sülfatın varlığında veya yokluğunda inceleyen ilk çalışmadır. Pinostrobin, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S) veya E2 ile uyarılmış hücre proliferasyonunu azaltmadan ve östrojen reseptörüne bağlanmadan bir anti-aromataz aktivitesini bulmuşlardır (Bail ve ark., 2000). Ayrıca pinostrobin, koryokarsinom insan (JEG-3) hücrelerinde ve Arom+HEK 293 hücrelerinde 17β-estradiol oluşumunun inhibisyonu için 4 µM'lik bir IC50 değeri ve anti-oksidatif kapasite için 29 µM göstermiştir (Saarinen ve ark., 2001). S)- (-)- pinostrobin, resazurin testi ile tayin edildiğinde duyarlı ve ilaca dirençli kanser hücreleri hatlarında ve normal hücrelere karşı orta derecede aktif bulunmuştur (Kuete ve ark., 2014). Pinostrobin ayrıca HeLa ve HepG2 hücre hatlarına karşı anti-tümör aktivitesi göstermiştir (Cao ve ark., 2012).

1.4.3.5. Antimikrobiyal etkinlik

Pinostrobin, 6.94 µg/mL'lik minimum inhibitör konsantrasyonun sahip *Staphylococcus aureus*'a karşı iyi bir anti-bakteriyel aktivite gösterir (Kong ve ark., 2010). Diğer biyokimyasal deneyler, pinostrobinin *Saccharomyces cerevisiae*'de G2/M faz hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolünde yer alan Ca²⁺ sinyalleri üzerinde inhibitör aktiviteye sahip olduğunu doğrulamıştır (Wangkangwan ve ark., 2014). Pinostrobin, mantar *Cytospora personii*'nin misel gelişimini azaltır (Geibel ve ark., 1995).

1.4.3.1. Anti ülser çalışması

20 ve 40 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında pinostrobin, omeprazol ile karşılaştırıldığında Sprague Dawley sıçanlarında sırasıyla etanol ile uyarılan ülser sıklığını %83,40 ve %92.03 oranında azalttığı bildirilmiştir (%76,77, doz 20 mg/kg) (Geibel ve ark., 1995).

1.4.3.2. Antiviral aktivite

Pinostrobin, virüs zarfının dökülmesi ve frenlenmesi yoluyla herpes simplex virus-1 (HSV-1) replikasyonunu 22.71 ± 1.72 µg / mL EC50 ile inhibe etmektedir. Pinostrobin, 400 ppm'de dengue-2 virüs NS3 proteazının %88,7'sini inhibe ederken, Ki 'nin 345 µM olduğu bulunmuştur (Kiat ve ark., 2006).

1.4.3.6. Anti-sıtma aktivite

Çalışma, pinostrobin anti-sıtma aktivitesine sahip olduğunu, ancak anti-sıtma etkisinin kesin mekanizmasının net olmadığını göstermektedir, ancak bazı flavonoidlerin, L-glutamin ve miyoinositolün enfekte eritrositlere akmasını engellediği gösterilmiştir. Pinostrobin zayıf anti-sıtma aktivitesine sahiptir (Kaur ve ark., 2009). Duker-Eshun ve ark. (2004), IC50> 100 µM ile zayıf anti-plasmodial aktiviteyi bildirmişlerdir.

1.4.3.7. Anti-zehir özellikleri

Pinostrobin, sitratlı insan plazmasında test edildiğinde, Herrops asper venomun pıhtılaştırıcı etkisini, 1:20 (venom: pinostrobin) oranında nötralize etmede etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, pinostrobin (4 mg/kg; venom: pinostrobin:1:2), %66,7'lik nötralizasyon yüzdesi olan farelerde venom ile indüklenen lokal hemorajı azaltabildiğini göstermiştir (Gomez-Betancur ve ark., 2014).

1.4.3.8. Toksikite çalışmaları

Pinostrobin, erkek Wistar farelerine 500 mg/kg daha yüksek dozda toksik olmayan ve genotoksik olmayan etkiler göstermiştir. Pinostrobin LD50'si 500 mg/kg'dan fazla bulunmuştur. Albümin, albümin-globulin oranı (A/G), alkalın fosfataz, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve toplam protein ve üre konsantrasyonu gibi nispi organ ağırlıkları ve biyokimyasal parametrelerin pinostrobin tarafından etkilenmediği bulunmuştur (Charoensin ve ark., 2010).

Farmakolojik araştırmalar, intestinal düz kasın kendiliğinden kasılmalarının baskılanması, aromataz aktivitesinin inhibisyonu, östrojen kaynaklı hücrelerde antiproliferasyon, siklooksijenazların inhibe edilmesiyle antiinflamatuvar etkiler ve fare beyin sinaptonurozomlarının sodyum kanalında aktif depolarizasyonunun zayıflatılması dahil olmak üzere pinostrobinin çeşitli biyolojik aktivitelerini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, pinostrobin *in vitro* güçlü antioksidan etkiye sahiptir (Xian ve ark., 2012). Bu nedenle pinosembrin ve pinostrobinin ARPE-19 hücre toksisitesine karşı koruyucu etkiye sahip olup olmadığına dair bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, pinosembrin ve pinostrobinin ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ ile oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

1.5. Gözün Genel Yapısı

Göz küreleri (glob; bulbus, oculi), orbita boşluğu içinde bağ dokusundan zengin bir yağ yastığına yerleşmiş görme fonksiyonu ile görevli bir çift organdır. Yaklaşık 22 mm yarıçapında bir küre olan gözlerimizin yaklaşık 1/5'i görünür haldedir. Göz küresi, göz çukurunun kemik kenarları tarafından çevrenmektedir. Kapaklar, gözyaşı bezleri ve onun drenaj sistemleri; orbita içindeki diğer oluşumlar ve kirpikler gözün yardımcı organlarını oluştururlar. Beyinden çıkan 12 çift kranial sinirden 6' sını gözler ile ilgilidir (Başmak, 2005).

Retinada odaklanan ışık, fotokimyasal reaksiyonla elektrik enerjisine çevrilir ve optik sinir yolu ile beyne iletilir. Beyin ise her iki gözden gelen bilgileri birleştirerek tek bir görüntü elde eder. İnsan retinası tarafından görülebilen en kısa dalga boyu 380 nm (nanometre) iken en uzun dalga boyu ise 760 nm dir.

Yaşayan bir organizmada görerek muayene edilebilen damar sistemi ve sinir sadece retinal damarsal yapılar ve görme siniri (optik sinir)'dir.

Gözün tabakaları

Göz küresi üç yapısal tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1.12):

- Korneoskleral örtü, dış ya da fibröz tabakadır ve beyaz kısım olan skleradan ve şeffaf kısım olan korneadan oluşmaktadır.
- Vasküler örtü (orta tabaka ya da uvea) koroidi ve siliyer cismin ve iris stromasını içerir.
- Retina (iç tabaka) dış pigment epitelini, iç nöral retinayı ve siliyer cismin ve iris epitelini içerir. Nöral retina optik sinir aracılığıyla merkezî sinir sistemi ile devamlılık göstermektedir (Yılmaz ve Aktaş, 2009).

Kornea, gözün ön kısmının altıda birini kaplar. Kornea, sklera ile devam eder. Sklera gözün ekstrinsik kaslarının tutunmasını sağlayan sıkı fibröz bağ dokusundan oluşmaktadır. Sklera gözün beyazını oluşturur. Çocuklarda ince olduğu için hafif açık mavi renktedir; yaşlılarda stromal hücrelerinde lipofuskin birikimi nedeniyle sarımsıdır. Korneoskleral tabaka, optik sinirin penetre olduğu yer dışında daha içteki iki tabakayı çevreler. Uvea esas olarak, retinanın beslenmesini sağlayan vasküler tabaka olan koroidden oluşmaktadır (Yılmaz ve Aktaş, 2009).

Kan damarları ve melanin pigmenti koroide yoğun koyu kahverengi renk verir. Pigment, göz içinde parlamayı azaltmak için, saçılan ve yansıyan ışığı absorbe eder. Retinaya sıkıca tutunan koroid birçok venöz pleksus ve kapillerlerin oluşturduğu tabakaları içermektedir. Uveal tabakanın anterior kenarı ileriye doğru devam ederek siliyer cismin ve iris stromasını oluşturur (Yılmaz ve Aktaş, 2009).

Siliyer cisim, korneoskleral bileşke seviyesinin hemen posteriyöründe, içe doğru uzanan halka benzeri kalınlaşmadır. Siliyer cisimde lens akomodasyonundan sorumlu olan ve siliyer kas denen düz kas bulunmaktadır. Siliyer kasın kasılması lensin şeklini değiştirir, bu değişiklik, lensin farklı mesafelerden gelen ışık ışınlarını retina üzerinde odaklayabilmesini sağlar (Yılmaz ve Aktaş, 2009).

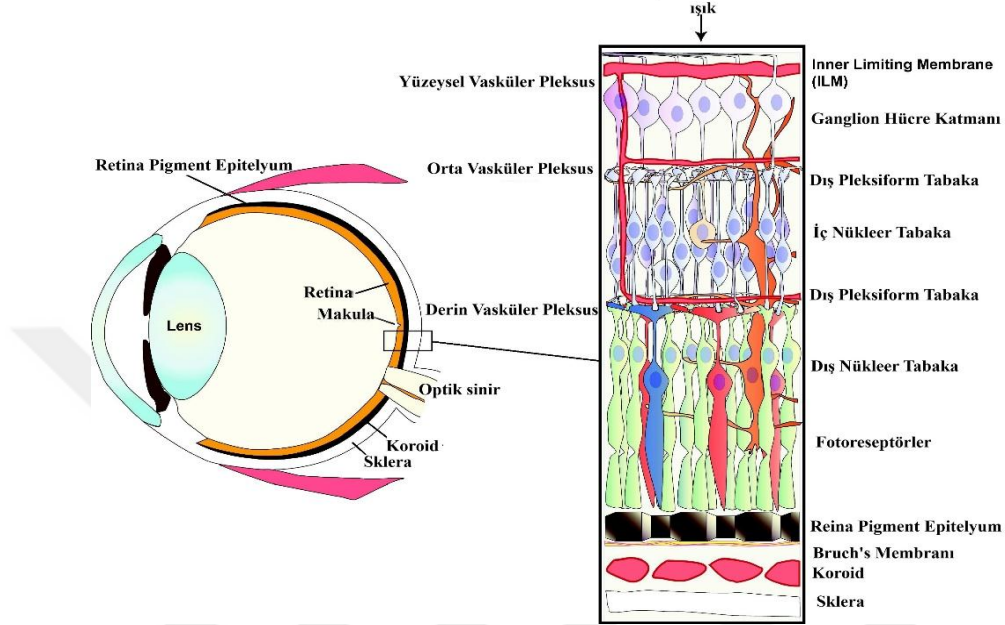
İris, lensin ön yüzeyinin üzerine uzanan kasılabilen bir diyaframdır. Bağ dokusu içinde saçılmış, melanin içeren pigment hücrelerini ve düz kas hücrelerini içermektedir. Pupil, iris merkezî dairesel açıklığıdır. Lensin içinden gözün yoğun miktarda pigment içeren arka duvarı görüldüğü için pupil siyah renkte görülür. Adaptasyon sürecinde pupilin boyutu, lensi geçip retinaya ulaşan ışığın miktarını kontrol etmek amacıyla değişir.

Retina iki komponentten oluşmaktadır: nöral retina ve pigment epiteli.

- Nöral retina, ışığa duyarlı reseptörler ve karmaşık nöronal ağlar içeren iç tabakadır.

- RPE, melanin içeren tek katlı kübik hücrelerden oluşan dış tabakadır.

Retina dıştan koroid ile çevrilidir; içte ise vitröz cisim ile ilişki halindedir. Nöral retina büyük oranda retinal rod (çubuk-basil) ve koni deneni fotoreseptör hücrelerden ve internöronlardan oluşmaktadır. Rodlar ve koniler tarafından kodlanan görsel bilgi, optik sinir boyunca iletilen impulslar aracılığıyla beyne iletilir (Yılmaz ve Aktaş, 2009).



Şekil 1.12. Gözün genel yapısı (Jarrett ve Boulton, 2012).

Retina (Tunika Nervoza)

Retina, optik sinir yakınında 0,56 mm, ora serratada 0,1 mm, ekvatorunda 0,2 mm kalınlığı olan ince bir dokudur. Retinanın iç yüzeyi vitreus ile temastayken dış yüzeyi potansiyel bir boşluk ile retina pigment epitelinden ayrılmıştır. Bütün retina tabakaları arkadaki sinir lifi tabakası haricinde optik sinir başında sonlanır. Periferde sensoryel retina ora serrataya uzanır ve pars plana nonpigmente siliyer epiteli ile devam eder. Sadece optik disk ve ora serratada retina pigment epiteline sıkı yapışıklık mevcuttur (Solmaz ve ark., 2010). Retina pigment epiteliyle sensoryel retina arasında anatomik bağ yoktur, birbirlerine yalnızca yaslanmış vaziyettedirler. Retina dekolmanı, santral seröz koryoretinopati gibi hastalıklarda sensoryel retina pigment epitelinden ayrılır (Albert ve Jakobiec, 1994).

Retina oftalmoskopik olarak 3 bölgeye ayrılır:

- Makula (santral retina, arka kutup)
- Ekvator
- Ora serrata

Makula, papillanın temporalinde, temporal vasküler arkuatların içinde kalan 5.5mm lik alandır. Bu bölgede bir katmandan fazla sayıda ganglion hücresi mevcuttur. İç retina tabakalarında bulunan karotenoid (ksantofil) lipofuksin granülleri nedeniyle bu bölge sarı nokta olarak da bilinir.

Topografik olarak 4 kısma ayrılır

Fovea, makulanın santralindeki 1.5mm'lik alan olup keskin görmeyi sağlayan bölgedir. Papillanın 4 mm temporalindedir.

Foveola, fovea santralindeki 0.35mm'lik çukur bölgedir. Kapiller ve ganglion hücresi içermez. Burada fotoreseptör hücrelerden sadece kon hücreleri mevcuttur.

Parafovea, Foveayı çevreleyen 0,5 mm genişliğindeki bölgedir. İç retina tabakasında, özellikle iç nükleer ve ganglion hücre tabakasında belirgin artış ile karakterizedir. Bu mesafede 4-6 tabaka ganglion hücreleri ve 7-11 tabaka bipolar hücreler ile retinanın normal yapısı gözlenmektedir. Sinir lifi tabakası özellikle nazal kenar papillomakuler demette relatif olarak kalındır. Koni-basil oranı 1:1' dir.

Perifovea, Makula bölgesinin parafoveayı çevreleyen 1,5 mm genişliğindeki periferik zonudur. Çok sayıda ganglion hücre tabakası ve 6 kat bipolar hücre tabakası içerir. Fovea merkezinden 2,75 mm mesafeye uzanır ve diğer periferik retinada olduğu gibi ganglion hücre tabakası tek nükleuslu tabaka halindedir. Bu bölgede koni-basil oranı 1:2' dir (Solmaz ve ark., 2010).

Ekvator, Basillerin çoğunlukta olduğu makula ile ora serrata arasında kalan bölgedir (Bengisu, 1989). Ekvator ora serratanın 6-8 mm posteriorunda, makulanın 18-20 mm anteriorundadır (Solmaz ve ark., 2010).

Ora serrata, retina ile pars plana arasındaki sınırdır ve limbustan uzaklığı 5.5-6.5mm kadardır.

Retinanın Tabakaları

Retinada dıştaki koroidden içteki vitreye kadar on tabaka mevcuttur:

- Retina pigment epiteli
- Fotoreseptör tabakası

- Dış limitans zarı
- Dış nükleer tabaka
- Dış pleksiform tabaka
- İç nükleer tabaka
- İç pleksiform tabaka
- Ganglion hücreleri
- Sinir lifleri tabakası
- İç limitans zarı

Retina Pigment Epiteli

RPE duyuşsal retina ile Bruch membranı arasında yerleşmiş olup tek sıra küboidal hücrelerden oluşmuştur bu hücreler arasında “junctional kompleks” adı verilen sıkı bağlantılar vardır. Bu bağlantılar dış kan-retina bariyerini oluştururlar. Retina pigment epiteli başlıca dış kan-retina bariyerinden sorumlu olmakla birlikte birçok farklı fonksiyonlara sahiptir. RPE hücrelerinin çok önemli görevleri vardır: Vitamin A metabolizması, fotoreseptörlerin dış segmentlerinin fagositozu ve yenilenmesi, içerdiği melanin pigmentleri ile ışığın absorpsiyonu (ışık saçılımını engelleyerek görüntü netliğinin artması), dış kan-retina bariyerinin sağlanması en önemli görevleridir (Thumann ve ark., 2006; Bron ve ark., 1997). Erişkin gözünde normalde RPE içinde mitotik aktivite bulunmamaktadır. RPE hücrelerinin yoğunluğu fovea merkezinden perifer retinaya doğru giderek azalır (Bron ve ark., 1997). Yaşlanma ile RPE hücrelerinde özel değişimler görülür. Yaş artışıyla apoptotik RPE hücrelerinin oranı artar ve bu apoptotik hücreler başlıca makula bölgesi içindedir. Hücre içinde metabolizma artığı veya sindirilemeyen materyal artar ve bu maddeler Bruch membranında toplanır. Hücre sitoplazmasında ise lipofuskin miktarı artar (Kennedy ve ark., 1995).

Lipofuskin pigment epitelinin ikinci en belirgin pigmenti olup doğumdan sonra yaklaşık 16. ayda görülmeye başlar ve fagositoz artıkları ve hücre metabolizmasından geriye kalan artıklardan oluşur. Lipofuskin granüllerinin sayısı yaşlanma ile artar. Lipofuskin miktarının aşırı artışının yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. RPE hücresinde lipofuskin birikimi en nihayetinde hücre metabolizmasının bozulmasına yol açar. Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinde kayıplar ortaya çıkmakta ve geriye kalan hücrelerin boyutu artmaktadır. Hücrelerin apoptozis ile ölümü çevredeki hücrelerin ölen hücrelerin yerine yayılması ile tamir edilmektedir.

Yaşlanma ile birlikte RPE hücrelerinin proliferasyon kabiliyeti de azalmaktadır. Tüm bu değişiklikler yaşa bağlı makula dejenerasyonu patogenezinde yer almaktadır (Streilein ve ark., 2002).

1.6. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

Yaşlılarda görme bozukluğu, dünya çapında milyonlarca insanın yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Yaşlanan nüfus ve giderek artan sayıda yaşlı birey ile bu konunun önemi daha belirgin hale gelmektedir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, fotoreseptör-retinal pigment epitel kompleksinin geç başlangıçlı nörodejenerasyonu nedeniyle ilerleyici görme bozukluğu ile karakterize edilen makulada edinilmiş bir hastalıktır. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, gelişmiş ülkelerde merkezi görme kaybının ana nedenidir ve 65 yaşından büyüklerin %10'unu ve 75 yaşından büyüklerin %25'ini etkilemektedir (Smith ve ark., 2001). Yaşa bağlı makula dejenerasyonu dünya çapında bir hastalıktır ve küresel olarak 8 milyondan fazla insanı etkilediği düşünülmektedir (Valeria ve ark., 2018) Türkiye’de ise giderek artan yaşlı nüfusta, Yaşa bağlı makula dejenerasyonu havuzuna her sene yaklaşık 300.000 yeni birey katıldığı ve bunların %10'luk bir kısmının ciddi ve hızlı görme kaybına maruz kaldığı ifade edilmektedir.

Bu veriler yeni gelişen tedavi seçeneklerinin hastalığın ilerlemesini önlemede etkili olduğunu, ancak her yıl sayısal olarak yeni bireylerin etkilenmesiyle hala insidansın giderek arttığını kanıtlamaktadır (Vos ve ark., 2012).

Yaşa bağlı makula dejenerasyonunun patofizyolojisi ve risk faktörleri karmaşıktır ve semptomlar birbiriyle ilişkili fakat farklı biçimlerde ortaya çıkmaktadır (Campagne, 2014). Tedavi edilmeyen ve özellikle beyaz tenli erkeklerde veya altmışlı yaşlarda mavi gözlü kadınlarda körlüğe neden olabilir (McConnell ve Silvestri, 2005). Makulada ilerleyici bozulma ile, yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastaları zihinsel sağlıklarını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen çok sayıda görsel problem yaşamaktadır (Yuzawa ve ark., 2013). Görme bozukluğu yaşam kalitesinin azalmasına, genel sağlığın daha kötü olmasına ve artan mortaliteye yol açar (Finger ve ark. 2011). Görme azalması, düşme ve yaralanmaya neden olan denge kaybı için ciddi bir risk faktörüdür (Harwood, 2001).

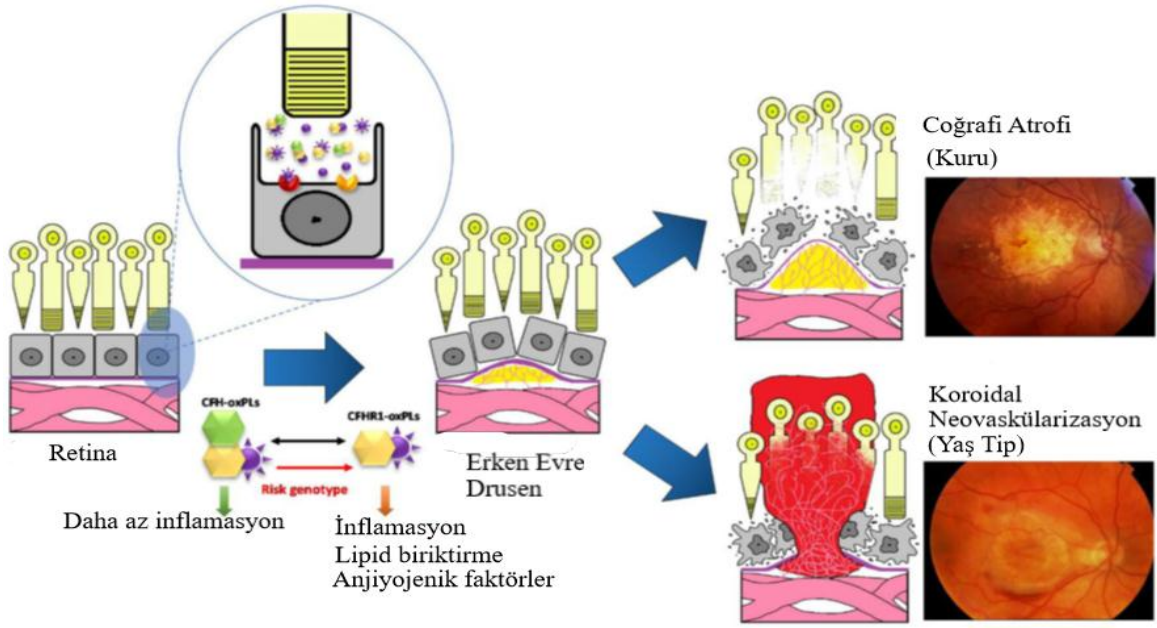
1.6.1. Yaşa bağı makula dejenerasyonunun sınıflandırılması

Yaşa bağı makula dejenerasyonu, yaşlanma ve kronik inflamasyon hastalığıdır. Hastalık durumunun ayırt edici özelliği, esas olarak makula adı verilen retinanın merkezi bölgesinde yumuşak drusen, sarı lipit ve protein birikintilerinin varlığıdır. Ancak, yumuşak drusen varlığı yaşa bağı makula dejenerasyonun klinik tanısı için yeterli değildir (Shaw ve ark., 2016). Hem klinik hem de araştırma amaçlı yaşa bağı makula dejenerasyonunu tanımlamak için çeşitli sınıflandırma sistemleri kullanılmaktadır. Günümüzde, geleneksel olarak, yaşa bağı makula dejenerasyonunun kuru ve ıslak yaşa bağı makula dejenerasyonu olarak bilinen iki ana tipteki makuler dejenerasyona sahip olmasına rağmen, belirli tanımlar üzerinde evrensel olarak kabul edilmiş bir genel görüş yoktur (Al-Zamil ve ark., 2017). Daha ziyade, yaşa bağı makula dejenerasyonun bu erken (ya da orta) evresinde doku kaybı yoktur ve görme genellikle etkilenmez (Jager ve ark., 2008). Yaşa bağı makula dejenerasyon ilerlemesi ve şiddeti, drusen'in sayısı ve büyüklüğü ile doğrudan ilişkilidir. İleri yaşa bağı makula dejenerasyon iki şekilde oluşur:

- (i) RPE'nin ve üstte yatan fotoreseptörlerin (ayrıca "kuru tip" yaşa bağı makula dejenerasyon olarak da adlandırılır) coğrafi atrofisi (GA).
- (ii) Koroidal neovaskülarizasyon ("yaş tip" yaşa bağı makula dejenerasyon olarak da adlandırılan KNV).

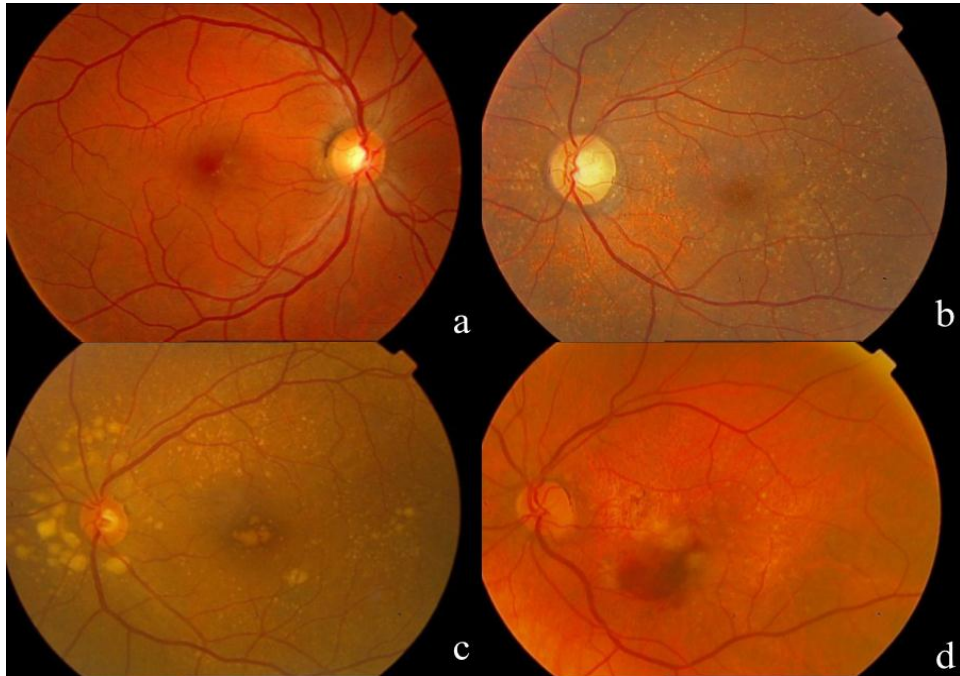
Kuru (GA) yaşa bağı makula dejenerasyon, fotoreseptör ve RPE hücre ölümünün konfluent bölgeleri ile karakterizedir ve yaşa bağı makula dejenerasyonunun neden olduğu yasal körlüğün %10'undan sorumludur (Sunness, 1999). Islak (KNV) yaşa bağı makula dejenerasyon, yaşa bağı makula dejenerasyonun neden olduğu akut körlüğün kalan %90'ını oluşturur ve makula altında anormal kan damarı büyümesi ile karakterizedir. Bu yeni damarlar büyük ölçüde kötü biçimlendirilmiştir, bu da istenmeyen vasküler yapı tarafından sızan bozulmuş doku içinde istenmeyen sıvı sızıntısına neden olan uygun olmayan vasküler bütünlüğe yol açmaktadır (Şekil 1.13) (Sarks ve ark., 1988).

Yaşa bağı makula dejenerasyonu makulanın progresif hasar görmesine neden olan, merkezi ve kesin görme için retinanın merkezine neden olan bir hastalıktır. Çevresel uyarıcılara genetik risk faktörlerinin yanıtı, oksidatif stres gibi drusen oluşumu, inflamasyon ve anormal vasküler büyüme ile sonuçlanmakta (Shaw ve ark., 2016).



Şekil 1.13. İleri yaşa bağlı makula dejenerasyonunun tipleri vardır: grafik atrofi (GA) ve koroidal neovaskülarizasyon (KNV) (Shaw ve ark., 2016).

Drusen, atrofi ve neovaskülarizasyonun ortaya çıkış özelliklerine dayanarak yaşa bağlı makula dejenerasyonu kategorileri tanımlanmıştır. Drusen küçük ($<63 \mu\text{m}$ çapında), orta ($63-124 \mu\text{m}$) veya büyük ($>125 \mu\text{m}$) olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.14) (AREDS-Study-Group, 2001).



Şekil 1.14. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu sınıflandırmasının gösterilmesi (a) Yaşa bağlı makula dejenerasyonu yok; (b) Erken yaşa bağlı makula dejenerasyonu; (c) Orta seviye yaşa bağlı makula dejenerasyonu; (d) Gelişmiş yaşa bağlı makula dejenerasyonu (Khandhadia ve Lotery 2010).

1.6.2. Yaşa bağı makula dejenerasyonunda risk faktörleri

Yaşa bağı makula dejenerasyonu gelişme riskinin artmasıyla bağlantılı olarak değiştirilebilen ve değiştirilemeyen birçok risk faktörü bulunmaktadır (Emma ve ark., 2011).

Değiştirilebilir Risk Faktörleri

- Sigara İçmek
- Alkol Alımı
- Sosyoekonomik Faktörler
- Eğitim
- Beslenme
- Vücut Kitle İndeksi
- Kalp-Damar Hastalığı
- Kolesterol Seviyeleri ve Tedavisi
- Kognitif (Bilişsel) Bozukluk
- Cinsiyet
- Artrit (Eklem İltihabı)
- Etnik köken
- İris Pigmentasyonu
- Hipermetropluk
- İlaç Tedavisi
- Hormonlar
- Tip II Diyabet
- Güneş Işığına Maruz Kalma

Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- Katarakt ve göz içi lensler

Değiştirilemeyen Diğer Risk Faktörleri

Yaşa bağı makula dejenerasyonu ile tutarsız olarak ilişkili olan, değiştirilemeyen risk faktörleri arasında el kavrama gücü, optik disk görünümü ve doğum ağırlığı yer alır (Hall ve ark., 2002).

Değişik derecelerde tutarlılıkla yaşa bağı makula dejenerasyonu gelişimi ile ilişkili birçok risk faktörü vardır. Yaş, sigara ve genetik, hastalığın gelişmesi için artan risk ile uyumlu bir şekilde bağlantılı görünmektedir. Neovasküler yaşa bağı makula dejenerasyonunun maliyetli tedavisi ve kuru yaşa bağı makula dejenerasyonu için sınırlı tedavi ile, yaşa bağı makula dejenerasyonu gelişimi riskini azaltmada çevresel faktörlerin modifikasyonu potansiyeli önemli bir araştırma alanıdır. Yaşa bağı makula dejenerasyonu

etiyojisi için oksidatif stres teorisi, antioksidanların hastalık gelişimindeki rolü ve progresyon riskini azaltmada rolü olabileceği düşünülmüştür (Emma ve ark., 2011).

1.6.3. Yaşa bağlı makula dejenerasyonunda tedavi

Son on yıl içinde majör duyarlılık genlerinin tanımlanması, hastalık patogeneğinde kompleman aracılı inflamasyonun ve oksidatif stresin rolünün anlaşılmasına yönelik yeni anlayışlar ortaya koymuş ve sonuç olarak yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için altta yatan mekanik yolları tanımlamıştır. Yapılan çalışmalar fotoreseptör ve RPE kaybının önlenmesi ve inflamasyonun baskılanması alanlarında yoğunlaşmaktadır. Nöroprotektif ajanlar retinal hücre apoptozisini önlemeyi amaçlar ve bunlar silier nörotrofik faktör, brimonidin tartarat, tansospirone ve anti-amyloid β antikorlarıdır. Oksidatif stres ve temel mikronütrisyonların eksikliği yaşa bağlı makula dejenerasyonu ilerlemesinde önemli faktörlerdir ve AREDS formülasyonu bu amaçla hastalığın ilerlemesini yavaşlatmakta kullanılan ilk tedavidir. Kuru tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastalarında kronik inflamasyonun varlığı gösterilmiş olup bu nedenle kortikosteroidler ve kompleman inhibitörleri de denenmekte olan ajanlar arasındadır (Çömlekoğlu ve Tigrel, 2015).

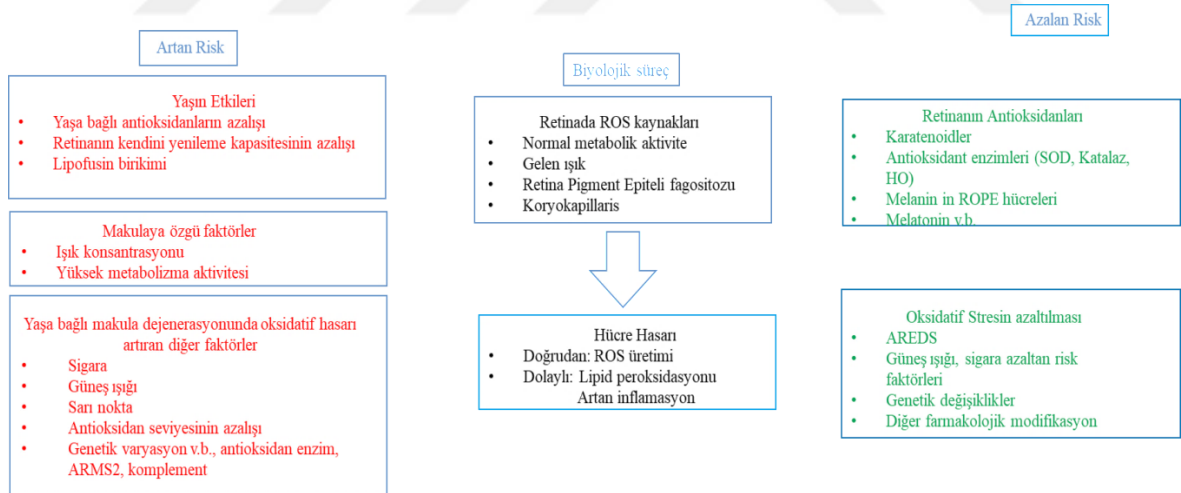
Neovasküler form yaşa bağlı makula dejenerasyonunda birçok tedavi seçeneği denenmektedir. Bunlardan bir kısmı termal lazer fotokoagülasyon ve fotodinamik tedavidir (Ciulla ve ark., 1998). Laser fotokoagülasyon tedavisi, var olan lezyonun yerleşimine ve boyutuna göre değişmekle birlikte hastaların yaklaşık %15'inde etkili bir yöntemdir (Macular Photocoagulation Study Group, 1991).

1.6.4. Yaşa bağlı makula dejenerasyon ve oksidasyon

Oksidatif stresi artıran bazı faktörler de yaşa bağlı makula dejenerasyon riski ile ilişkili olabilir (Klein ve ark., 1993). Drusen, yaşa bağlı makula dejenerasyonun en erken belirtisidir ve aynı zamanda oksidatif hasara da katkıda bulunabilir. Örneğin, drusende bulunan amiloid- β , ROS oluşumunu artırır ve RPE hücrelerinde antioksidan kapasitesini azaltır (Bruban ve ark., 2009). Bununla birlikte, drusen formasyonunun kendisi oksidasyon sürecinden etkilenebilir. Donör retinasından druzenin sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisi analizi, CEP protein katkısı dahil olmak üzere oksidatif protein modifikasyonlarını ve ayrıca doku metalloproteinaz inhibitörü-3 ve vitronektinin çapraz bağlanmasını göstermektedir (Crabb ve ark., 2002).

Makulada oksidatif hasarın bir sonucu olarak, hücrel fonksiyonda lokal değişiklikler meydana gelmektedir. Bunu dengelemek için, retina içindeki kompanseör lokal antioksidan aktivitesinin yaşa bağlı makula dejenerasyonda arttığı görülmektedir. *In vitro* olarak ölçülen SOD seviyeleri, yaşa bağlı makula dejenerasyonlu gözlerde RPE hücrelerinin sitoplazma ve lizozomlarındaki histolojik örneklerde normal gözlerdeki düzeylerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, glutatyon peroksidazı seviyelerinde bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Frank ve ark., 1999). Dahası, yaşa bağlı makula dejenerasyon şiddetiyle antioksidan aktivite artmaktadır (Decanini ve ark., 2007). Bu, ilerleyen yaşa bağlı makula dejenerasyon ile artan ROS aktivitesine lokalize bir telafi edici yanıt olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, ROS aktivitesi, makula içindeki antioksidan kapasitesini aşabilir ve ileri yaşa bağlı makula dejenerasyonun ilerlemesi ile birlikte olabilmektedir (Khandhadia ve Lotery 2010).

Oksidatif hasarın, yaşa bağlı makula dejenerasyon gibi çok faktörlü bir hastalığın patogenezinde yer alan birkaç yoldan sadece biri olması muhtemeldir. Bununla birlikte, antioksidan korumaya dayanan gelecekteki tedavilerin, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun altında yatan hastalık süreçlerini daha iyi anlayabilen çok yönlü bir yaklaşımın parçası olması muhtemeldir (Şekil 1.15) (Khandhadia ve Lotery 2010).



Şekil 1.15. Retinada meydana gelen oksidatif süreçler (Khandhadia ve Lotery 2010).

ROS normal olarak normal hücrel metabolik aktivitenin bir sonucu olarak retina ve RPE'de üretilir. Buna ek olarak, gelen ışığın kendisi, dış segmentlerin RPE fagositozu olduğu gibi, güçlü bir oksidatif stres üreticidir. ROS ayrıca ışığın etkilerinden koriokapillarisde üretilir. ROS, retina hücrel hasarına doğrudan veya dolaylı olarak, özellikle yüksek düzeylerde retinal hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ

asitlerinin peroksidasyonu ile sonuçlanabilir. Bu lipid peroksidasyon ürünleri de toksiktir. Ayrıca, ROS, ilave hücrel hasara neden olabilen kompleman kaskadını aktive ederek, iltihaplanma artışına yatkınlık gösterebilir. Normal olarak, ROS'un ters etkileri, antioksidan enzimler de dahil olmak üzere, retinadaki antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulur (ör. SOD, katalaz, hem oksijenaz, karotenoidler, melanin ve hormon melatonin gibi). ROS'un antioksidan sistem tarafından temizlenmediği herhangi bir hücrel hasar, retina tarafından onarılır. Artan yaş, retinadaki oksidatif hasar potansiyelini artırabilir, bu da antioksidan enzim seviyelerinde bir azalma, retina'nın onarım kapasitesinde bir azalma ve RPE ve fotoreseptör hücrelerde lipofuskin adı verilen zehirli bir flüoresan maddesinin artmasına neden olabilir. Makula özellikle, makula merkezli gelen artan ışık seviyesi ve bunun sonucu olarak yüksek düzeyde metabolik aktivite nedeniyle oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır. Oksidatif stresi artırabilecek ve yaşa bağı makula dejenerasyonu ile ilişkili diğer faktörler arasında sigara, güneş ışığına maruz kalma, drusen oluşumu, sistemik antioksidan düzeyleri ve genetik varyasyonlar sayılabilir. Oksidatif hasar riski, oral antioksidan takviyesiyle ve sigara ve aşırı güneş ışığı gibi risk faktörlerine maruziyetin azaltılmasıyla terapötik olarak azaltılabilir. Gelecekteki tedavi seçenekleri genetik manipülasyon ve farmakolojik modifikasyon içermektedir (Jager ve ark., 2008).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan başlıca cihazlar ve sarf malzeme ilgili tablolarda listelenmiştir (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
UV-Vis spektrumları (Shimadzo UV-Vis 1800 spektrofotometre)	SOD aktivite tayini çalışmalarında
Voltammetrik ölçümler (Iviumstat electrochemical interface analizörü)	Elektrokimyasal çalışmalarda, Voltammetrik ölçümlerde
Güvenlik Kabini (Laminar Flow, Nüve Mn 090)	Hücre kültürü çalışmalarında steril ortamın sağlanması
İnkübatör (CO ₂ inkübatörü (%5 CO ₂ , % 95 nem ve 37°C), Sanyo, Mco 19aic)	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu
Etüv (Nüve Ec 160)	Gereken tüm malzemelerin istenen sıcaklığa getirilmesi
Floresan invert mikroskop (Axio Vert.A1 mikroskop (ZEISS))	Hücrelerin kontrolü
Plak okuyucu (BioTek ELX 800)	96 kuyulu plakların absorbanslarının okunması, MTT sonuçlarının değerlendirilmesi
EVE Otomatik hücre sayacı (NanoEnTek)	Hücre sayımı
Santrifüj (Nüve NF800R)	Çöktürmenin gerekli olduğu tüm denemelerde
PowerPac™ Basic güç kaynağı (BIO-RAD)	Cihazları elektrik kesintisine karşı koruma
Pipet pompası (Brand Accu-jet® pro)	Çözelti hazırlanması
Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml Gilson)	Çözeltilerin hazırlanması
Hassas Terazi (AND HR-250AZ marka (0,0001 g'a duyarlı))	Çözeltilerin hazırlanması için gerekli tartımın alınması
Vorteks (Heidolph)	Çözeltilerin homojen karışımlarının hazırlanması
Manyetik karıştırıcı (Wise Shake Feedback SHO)	Çözünme işlemi hızlandırmak
Buzdolabı (±4°C Arçelik)	Kimyasalların ve örneklerin saklanması
Derin Dondurucu (-20°C Arçelik)	Hücrelerin kısa süre saklanması
Derin Dondurucu (-86°C ESCO)	Hücrelerin uzun süre saklanması

Çizelge 2.2. Kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Pinosembrin (Sigma-Aldrich)	Hücrelerde etkisi araştırılan molekül
Pinostrobin (Sigma-Aldrich)	Hücrelerde etkisi araştırılan molekül
SOD Assay Kit (Sigma-Aldrich)	Moleküllerin SOD aktivitelerin tayini için kullanılan kit
Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)	Hücrelerinin dondurma ortamının hazırlanması, çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılması
Fosfat Tampon çözelti (Gibco)	Elektrokimyasal çalışmalarda destek elektrolit olarak kullanılması
ARPE-19 (ATCC Manassas VA)	Tüm denemelerde kullanılan Retina Pigment Epitel (ARPE-19) hücre serisi
Tripsin (Merck)	Pasaj ve ekimlerde hücrelerinin kaldırılması
Dulbecco Modified Eagle Medium/Ham's F12 (DMEM-F12 Biowest)	ARPE-19 hücrelerinin büyüme ortamı
Penisilin/Streptomisin (Gibco)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom S0113)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
L-Glutamin (HyClone)	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
Etanol (Delta)	Yıkama işlemlerinde
Hidrojen Peroksit (Sigma-Aldrich)	Hücrelerde toksisite oluşturmak
Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT)(Sigma-Aldrich)	Hücre canlılığı aktivitesini değerlendirmek
Tripan Mavisi (%0,5) (Biological Industries)	Hücre sayımında, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi

2.2. Metot

2.2.1. SOD aktivite

WST1 SOD test kiti Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd.'den satın alındı ve -80 ° C'de dondurucuda saklandı. Çözeltiler, herhangi bir kimyasalın bozulmasını önlemek için alüminyum folyo kullanılarak ışıktan korunmuştur.

Bir WST1 test kiti;

- WST1 çözeltisi (5 ml)
- Enzim çözeltisi (100 ml)
- Tampon çözeltisi (100 ml) (fosfat tamponu pH = 7.4)
- Seyreltme tamponu (50 ml) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH = 7.4) içerir.

Çalışma çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlandı;

WST1 çalışma çözeltileri günlük olarak hazırlandı. 1 ml WST1 çözeltisi, 19 ml tampon çözeltisi ile seyreltildi.

Enzim çalışma solüsyonu: Enzim çözeltisi 5 saniye santrifüj edildi ve pipetle karıştırıldı ve daha sonra 15 ml enzim çözeltisi 2.5 ml seyreltme tamponu ile seyreltildi. Enzim çalışma solüsyonu günlük olarak hazırlandı ve etkinliği her günün sonunda ölçüldü.

Test edilecek olan moleküllerin çözeltileri, dimetil sülfoksit içerisinde konsantrasyonda hazırlandı (4×10^{-4} M). DMSO çözücü olarak kullanılır, çünkü 30 μM 'ye kadar olan konsantrasyonlarda O_2^- üretimini etkilemez.

Hazırlanan çözeltiler daha sonra mikropipetler kullanılarak aşağıdaki Çizelge 2.3'te tarif edildiği gibi değişen miktarlarda 1 cm'lik yol uzunluktaki kuartz küvetlerine eklenmiştir.

Çizelge 2.3. SOD aktivite testi prosedürü.

	Numune	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Molekül çözeltisi	80 μl	-	80 μl	-
Saf su	-	80 μl	-	80 μl
WST1 çalışma çözeltisi	800 μl	800 μl	800 μl	800 μl
Enzim çalışma çözeltisi	80 μl	80 μl	-	-
Seyrelme tamponu	-	-	80 μl	80 μl
Toplam hacim (ml)	960 μl	960 μl	960 μl	960 μl

Test edilen bir kompleksin her bir konsantrasyonu için, dört absorbans (numune, blank 1, blank 2, blank 3) okuması toplandı.

- Numune: WST1 çalışma solüsyonu, enzim çalışma solüsyonu ile karıştırıldı ve ardından molekül çözeltisi ilave edildi. Kompleks, O_2^- yi süpürmek için WST1 ile yarışıyor. Bir Shimadzo UV-Vis 1800 spektrofotometresinde 440 nm'de absorpsiyon değişiklikleri kaydedildi.

- Blank 1: WST1 çalışma solüsyonu enzim çalışma solüsyonu ile karıştırılır, ardından saf su eklenir. O_2^- , enzim sistemi tarafından sürekli olarak üretilir ve metal kompleksi yokluğunda sarı WST1 formazan oluşturmak için WST1 ile reaksiyona girer.
- Blank 2: WST çalışma solüsyonu, seyreltme tamponu ile karıştırıldıktan sonra molekül solüsyon ilave edilir. Hiçbir enzim çözeltisi eklenmediğinden O_2^- üretilmez. O_2^- yokluğunda 440 nm'de absorbans değişikliğini görmek için blank 2 ölçümler yapılır.
- Blank 3: WST çalışma solüsyonu seyreltme tamponu ile karıştırılır, ardından saf su eklenir. Hiçbir enzim çözeltisi eklenmediğinden O_2^- üretilmez. O_2^- veya bir molekülün yokluğunda 440 nm'de absorbans değişikliğini görmek için blank 3 ölçümler yapılır.

Farklı konsantrasyonlarda test edilen her kompleks için zamana karşı 440 nm'de bir absorbans değerleri grafiği elde edilmiştir. Zamana karşı bir absorbans değeri, Bulgular kısmında verilmiştir.

SOD mimic içermeyen boş 1 okuma için, absorbans değişim hızı dakikada 0.055'tir ve herhangi bir kompleks eklenmeden O_2^- oluşma oranını yansıtır. Blank 1 daha sonra bir molekül varlığında WST1'in% inhibisyonunu hesaplamak için kullanıldı. WST'nin inhibisyonu %100 olduğunda, o zaman absorbans değişim oranı 0'a eşittir ve %0 inhibisyon olduğunda, absorbans değişim oranı blank 1'in eğimine eşittir.

Her konsantrasyon için% inhibisyon daha sonra aşağıda gösterildiği gibi hesaplanır.

$$\text{SOD aktivite (inhibisyon \%)} = \frac{[(S1-S3) - (SS-S2)]}{(S1-S3)} \times 100$$

S1 = blank 1'in eğimi, S2 = blank 2'nin eğimi, S3 = blank 3 eğimi ve SS = numunenin eğimi (Riley ve ark., 1991).

2.2.2. Hücre kültürü uygulamaları

Hücre kültürü çalışmaları denemelerde kullanılmak üzere Retina Pigment Epitel (ARPE-19) hücrelerinin çoğaltılmasını, pasajlanmasını, dondurulmasını, çözülmesini ve sayılarak istenen flask ya da plaklara ekilmesini kapsamaktadır.

2.2.2.1. Retina Pigment Epitel (ARPE-19) hücre serisi

Kaynağı: ARPE-19, bir motorlu taşıt kazasında kafa travmasından ölen 19 yaşındaki bir erkeğin normal gözlerinden 1986'da Amy Aotaki-Keen tarafından türetilen kendiliğinden ortaya çıkan retina pigment epitel (RPE) hücre serisidir. ATTC firmasından satın alınmıştır.

Özellikleri: Hücre hattı, 1:1 oranında Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagles ortamı ve Ham's F12 ortamı içinde %20 cenin sıgır serumu, 56 mM son konsantrasyon sodyum bikarbonat ve 2 mM L-glutamin içeren HEPES tamponuyla ve %10 CO₂'de 37 °C'de inkübe edilmiştir (Anonymous, 2018b).

2.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması (Subculturing)

- İlk kez çözülen hücreler 25 cm² flasklara 5 mL büyüme ortamı içerisinde ekildi.
- Hücreler %80-90 doygunluğa (confluent) ulaştıktan sonra 75 cm² flasklara 15 mL büyüme ortamı içerisinde pasajlandı ve denemeler için bu flasklarda çoğaltıldı.
- Tüm deneyler 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirildi. Hücrelerin büyüme ortamı üç dört günde bir yeni büyüme ortamı ile değiştirildi.
- Hücreler doygunluğa ulaştıklarında 1:4 ya da 1:5 oranında seyreltilerek pasajlandı.

2.2.2.3. Hücrelerin toplanması

- Flaskın içerisindeki büyüme ortamı atıldı.
- Flask steril PBS ile yıkandı.
- Flasklara; 25 cm² flask için 1-2 mL, 75 cm² flask için 3-5 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
- Flask inkübatörde 4-5 dakika bekletildi.
- Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 mL'lik tüplere toplandı.
- Tüplere 5'er mL büyüme ortamı ilave edildi. Pellet istenen miktarda, önceden 37°C'ye getirilmiş büyüme ortamı içerisinde süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu sayılabilir, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlandı
- Dondurulacak hücre süspansiyonuna 1:1 oranında soğuk %80 FBS ve %20 DMSO ilave edildi.
- Bu şekilde tüpteki son konsantrasyonlar: %40 FBS, %10 DMSO ve %50 büyüme ortamı olmaktadır.
- Elde edilen süspansiyon cryo tüplere paylaştırılarak -20°C'ye kaldırıldı.

➤ -20°C’de bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C’ye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırılır.

2.2.2.4. Hücrelerin çözülmesi

- Sıvı nitrojende bekletilen hücreler gerekli olduğunda çözülerek kullanıldı.
- Sıvı nitrojen ya da -80 °C’den alınan cryo tüpler hızla 37 °C’de çözüldü.
- 4 °C'nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik etki gösterdiğinden dolayı 37 °C’de hücreleri çözdürürken hızlı bir şekilde çalışıldı.
- Tüp içerisindeki süspansiyon 15 mL’lik tüplere aktarıldı ve üzerine 10mL önceden 37 °C’ye getirilmiş büyüme ortamı ilave edildi.
- Tüp 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Pelet 6 mL büyüme ortamında süspansiyon edildi ve 2 adet 25 cm² flaska paylaştırıldı.
- Flaskalar, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.5. Hücrelerin sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flaskalara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (Mosmann, 1983). Canlı hücreler mitokondri organelinde enerji üretimi yapabildiklerinden dolayı hücre membranından giren boya maddesini aktif taşımayla hücre dışına çıkartarak, renksiz görülür ve ölü hücreler mitokondri organelinde metabolik enerji ihtiyacını yerine getirememekte hücre membranından geçen boya maddesini absorblar, hücre dışına çıkartamaz aktif taşıma için enerji ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından mavi renkte görülür. ARPE-19 hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası ilave edilerek iyice karışması sağlandı.

➤ ARPE-19 hücre serisinde hücre canlılığı tespit edildi. Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10µl örnek alındı, distile su ile temizlenen Neubauer hemositometresinin lamındaki sayım odacığına konuldu.

- Işık mikroskopunda 20X oküler kullanılarak dört karede hücre sayımı gerçekleştirildi.

➤ Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi.

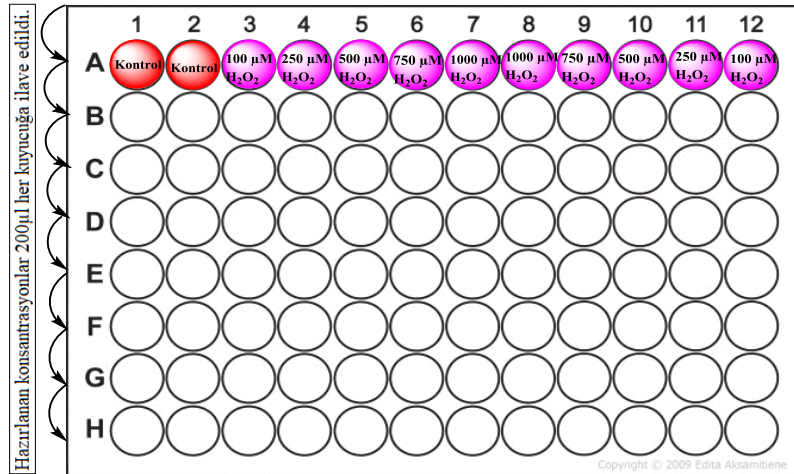
$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{Ortalama sayım değeri} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

- Formülünden bir hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki hücre sayısı belirlendi.
- Hücre süspansiyonu seyreltilerek istenen konsantrasyonda hücre süspansiyonu elde edilerek ekim yapıldı (Özkaya, 2009).

2.2.2.6. Hücre hatlarında H₂O₂ ile hasar modelinin oluşturulması

ARPE-19 hücre serisi üzerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) oksidatif stres kaynağı olarak uygulandı. ARPE-19 hücre ekimi 96'lık plaklara her kuyucuğa yaklaşık 10.000/100µl gelecek şekilde hücre ekimi yapıldı. ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu.

Çalışmada hücreler seri dilüsyonlar halinde hazırlanan (100-1000µM) H₂O₂ çözeltileri seriler halinde gruplara bölünen hücre serisine ilave edildi. 103µl %30'luk H₂O₂ üzerine tamamlanan 10µl DMEM/F12 eklenerek 10⁻¹M H₂O₂ çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok çözeltilerden seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda 100, 250, 500, 750 ve 1000µM H₂O₂ çözeltileri ile 20 saat inkübasyona bırakılan ARPE-19 hücrelerinde canlılık (sitotoksikite durumu) belirlemek üzere hazır hale getirilmiştir (Şekil 2.1) (Dinç ve ark., 2017) .



Şekil 2.1. ARPE-19 hücre hattı üzerinde H₂O₂ uygulaması.

2.2.2.7. Pinosembrin ve pinostrobin stok çözeltilerinin hazırlanması

Pinosembrin ve pinostrobin çalışmalarımızda ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan hücre hasarına karşı etkisi araştırılan maddelerdir. Pinosembrin ve pinostrobin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır.

Pinosembrin 2,56 mg tartılmış ve 0.5 ml DMSO da çözülmüştür. Oluşturulan 2x10⁻² M'lık çözelti DMEM/F12 ile seyreltilerek (100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ve 1x10⁻⁶ µM) farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

Pinostrobin 2,70 mg tartılarak ve 0.5ml DMSO da çözülmüştür. Oluşturulan 2x10⁻² M'lık çözelti DMEM/F12 ile seyreltilerek (100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ve 1x10⁻⁶ µM) farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

2.2.2.8. H₂O₂ ile Pinosembrin ve pinostrobin stok çözeltilerinin hazırlanması

Pinosembrin 2,56 mg tartılmış ve 0,5 ml DMSO da çözülmüştür. Oluşturulan 2x10⁻² M'lık çözelti 500 µM H₂O₂ ile seyreltilerek (100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ve 1x10⁻⁶ µM) farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

Pinostrobin 2,70 mg tartılarak ve 0,5 ml DMSO da çözülmüştür. Oluşturulan 2,70 mg çözelti 500 µM H₂O₂ ile seyreltilerek (100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ve 1x10⁻⁶ µM) farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

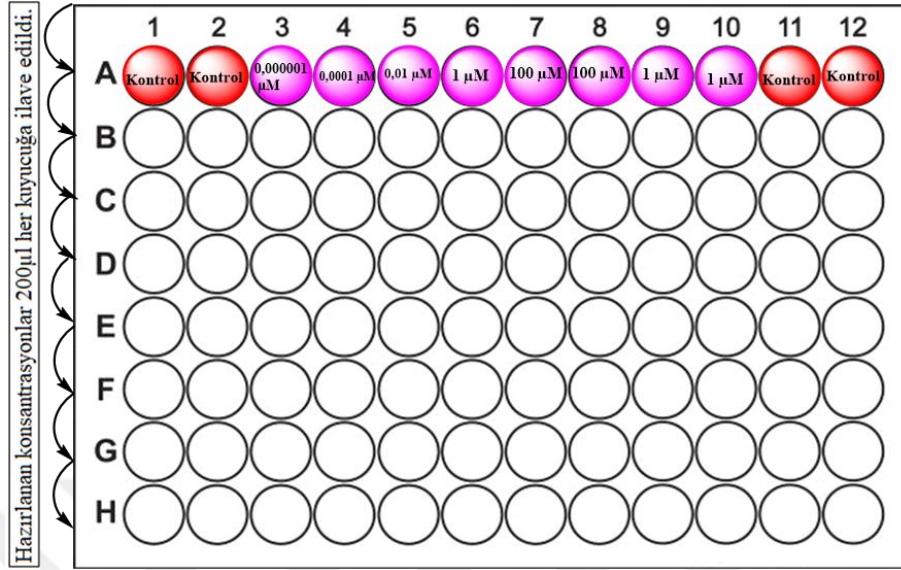
2.2.2.9. ARPE-19 hücrelerinde pinosembrin ve pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücre ekimi 96'lık plaklara uygun hücre serisi oluşturuldu ilk uygulamada besiyerleri değişimi yapılarak %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C' de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Oluşturulan ARPE-19 hücre serisi plaklarındaki besiyeri aspire edilerek yerine 100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ ve 1x10⁻⁶ µM konsantrasyonlardaki pinosembrin 100 µl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı (Şekil 2.2). İnkübasyon sürelerinin ardından 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, sarı tetrazol (MTT) analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

Oluşturulan ARPE-19 hücre serisi plaklarındaki besiyeri aspire edilerek yerine 100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ ve 1x10⁻⁶ µM konsantrasyonlardaki pinostrobin 100 µl ilave edilerek 20

saat süre ile inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sürelerinin ardından MTT analiz yöntemi ile hücre canlılığı değerlendirildi.

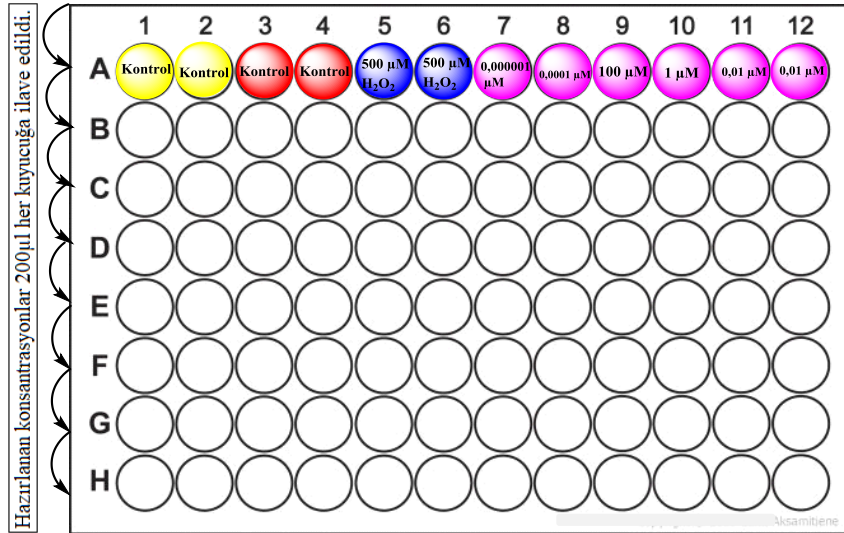


Şekil 2.2. ARPE-19 hücre serisine pinosembrin ve pinostrobin uygulanması

2.2.2.10. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrin ve pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

Pinosembrin önce uygulamasının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu. Ardından hücre kontrol, medyum kontrol ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan pinosembrin (100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM) 100 μl uygulanarak, hücreler 4 saat süre inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan pinosembrin (100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM) farklı konsantrasyonlarda 100 μl 16 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

Pinostrobin önce uygulamasının etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda hücreler konuldu. Ardından hücre kontrol, medyum kontrol ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan pinostrobin (100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM) 100 μl uygulanarak, hücreler 4 saat süre inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan pinostrobin (100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM) farklı konsantrasyonlarda 100 μl 16 saat süre ile inkübasyon yapıldı (Şekil 2.3). Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.



Şekil 2.3. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrin ve pinostrobin uygulaması

2.2.2.11. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrin ve pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

Oluşturulan ARPE-19 hücre serisinde plağındaki besiyeri aspire edilerek yerine 100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM konsantrasyonlardaki H_2O_2 pinosembrin çözeltisinden 100 μl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

Oluşturulan ARPE-19 hücre serisi plağındaki besiyeri aspire edilerek yerine 100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM konsantrasyonlardaki H_2O_2 pinostrobin çözeltisinden 100 μl ilave edilerek 20 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

2.2.2.12. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrin ve pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

H_2O_2 önce uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 500 μl 'lık H_2O_2 çözeltisinden 100 μl uygulanarak 4 saat süre inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H_2O_2 ile hazırlanan pinosembrinden, 100, 1, 1×10^{-2} , 1×10^{-4} ve 1×10^{-6} μM konsantrasyonlarda 100 μl 16 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre viabilitesi değerlendirildi.

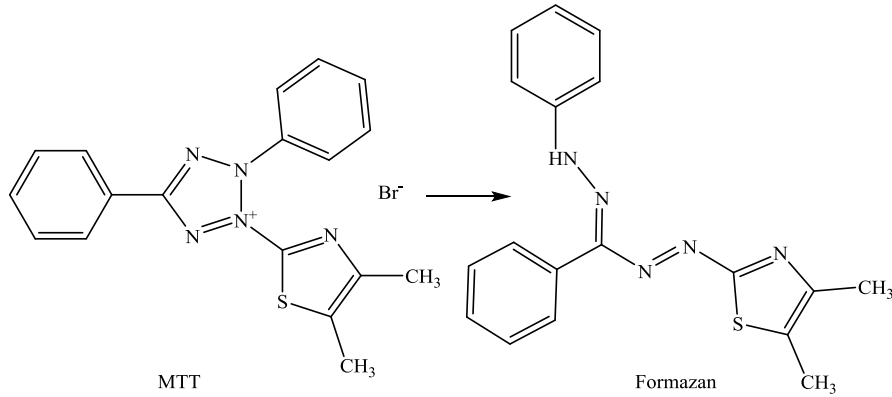
H_2O_2 önce uygulaması için 96'lık plaklara ARPE-19 hücrelerinin uygun hücre serisi oluşturuldu. 500 μl 'lık H_2O_2 çözeltisinden 100 μl uygulanarak 4 saat süre

inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatlik inkübasyon sonunda ortamdaki çözelti aspire edilerek yerine H₂O₂ ile hazırlanan pinostrobinden 100, 1, 1x10⁻², 1x10⁻⁴ ve 1x10⁻⁶ µM konsantrasyonlarda 100µl 16 saat süre ile inkübasyon yapıldı. Daha sonra MTT solüsyonu hazırlanarak hücre canlılığı değerlendirildi.

2.2.2.13. Metiltiazol difenil tetrazolyum canlılık testi

Farklı konsantrasyonlardaki pinosembrin ve pinostrobinin farklı uygulamalardaki ARPE-19 hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada, ARPE-19 üzerindeki hücre canlılığı etkisini değerlendirmek için kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır ve hayatta kalan hücrelerin yüzdesini belirlenebilmek için kullanılır. MTT testi, MTT'nin sarı tuzunu suda çözünmeyen mor formazan kristaline dönüştürmek için mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesini saptanmaktadır (Şekil 2.4). DMSO içinde çözülür ve üretilen renk ELISA okuyucusu kullanılarak belirtilen dalga boyunda ölçülür (Soltan-Dallal ve ark., 2017).

Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır (Dinç ve ark., 2017; Huang ve ark., 2010).



Şekil 2.4. MTT'in formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu.

MTT analizi yöntemi 96'lık plak kuyucuklarında bulunan 100µl medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 25µl ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 4 saat bekletildi. Dört saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100µl ilave edildi ve 20 dk. daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre ile 570 nm

absorbans değerinde ölçümler kaydedildi. 100 µl pinosembrin ve pinostrobinin içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri %100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından canlılık değeri hesaplanır.

$$\text{Yüzde Canlılık} = [\text{Örnek ABS ortalama} / \text{Kontrol ABS ortalama}] \times 100$$

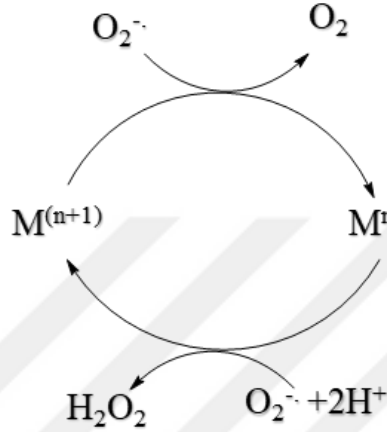
İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Hücre canlılığının gruplar arasındaki farklılığının incelenmesinde One-Way Anova (tek yönlü varyans analizi) yöntemi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD, Tamhane T2 ve Dunnett testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistik parametreleri Mean±SD ile ifade edildi. Verilerin değerlendirmesinde IBM SPSS versiyon 22 (IBM SPSS for Windows version 22, IBM Corporation, Armonk, New York, United States) paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Moleküllerin süperoksit dismutaz aktiviteleri

SOD enzimleri ve mimik kompleksleri, okside ve indirgenmiş formlar arasındaki molekül döngülerinin olduğu bir ping-pong mekanizmasında $O_2^{\cdot-}$ ve hidrojen peroksidin değişimini katalize eder (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Süperoksitin değişmesi

Pinosembrin ve pinostrobin, WST1 analizi kullanılarak SOD aktivitesinin direkt analizine tabi tutuldu. Her iki molekülde benzer molekül yapısına sahip olmasından dolayı, hesaplamalarda benzer SOD aktivitesine sahip olduğu görüldü (Şekil 3.2-4)

$$y=0.0009x+0.1612 \text{ (blank 1)}$$

$$y=8 \times 10^{-7}x+0.1029 \text{ (blank 2)}$$

$$y=1 \times 10^{-5}x+0.1233 \text{ (blank 3)}$$

$$y=0.00005x+0.1312 \text{ (Pinosembrin)}$$

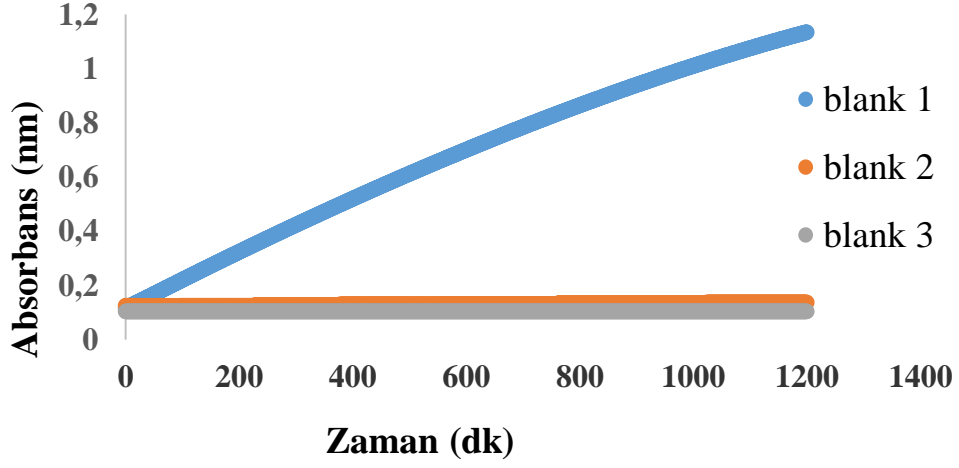
$$y=0.0005x+0.1341 \text{ (Pinostrobin)}$$

Pinosembrin ve pinostrobin 4×10^{-4} M konsantrasyon için % inhibisyon aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

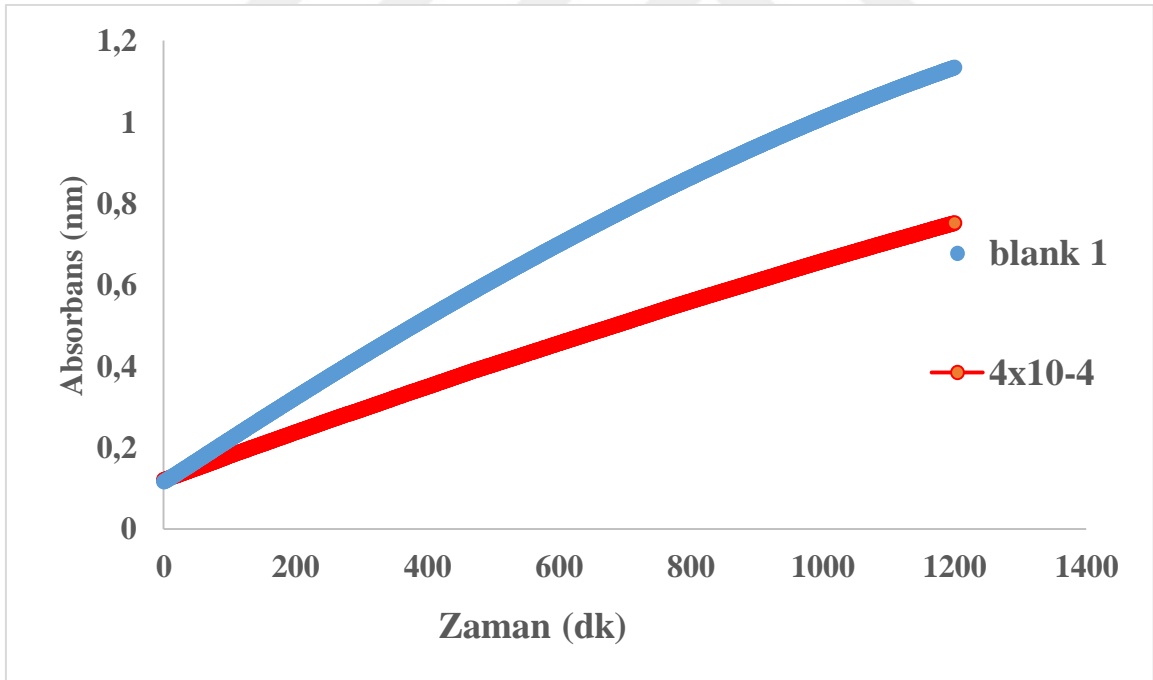
$$\text{SOD aktivite (inhibisyon \%)} = \{[(S1-S3) - (SS-S2)] / (S1-S3)\} \times 100$$

S1 = blank 1'in eğimi, S2 = blank 2'nin eğimi, S3 = blank3 eğimi ve SS = numunenin eğimi

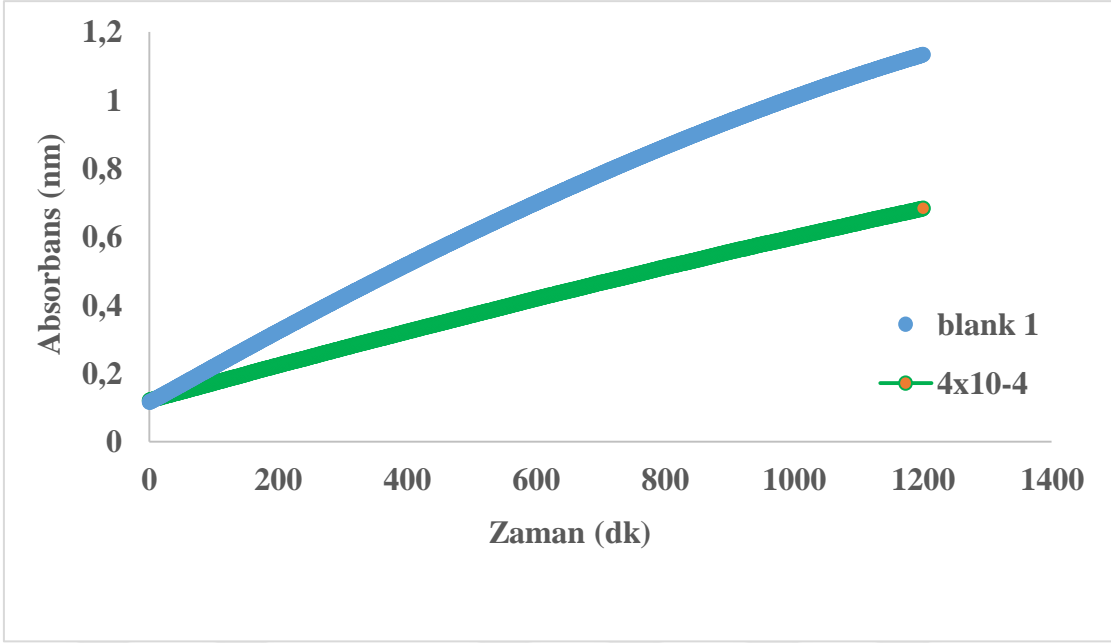
Pinosembrin ve pinostrobin 4×10^{-4} M konsantrasyon için SOD aktivite % inhibisyon olarak 45.49 bulundu.



Şekil 3.2. Blank 1, blank 2 ve blank 3'ün 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği



Şekil 3.3. Pinosembrinin ve blank 1'in 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği



Şekil 3.4. Pinostrobinin ve blank 1'in 440 nm'de zamana karşı absorbans grafiği

3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları

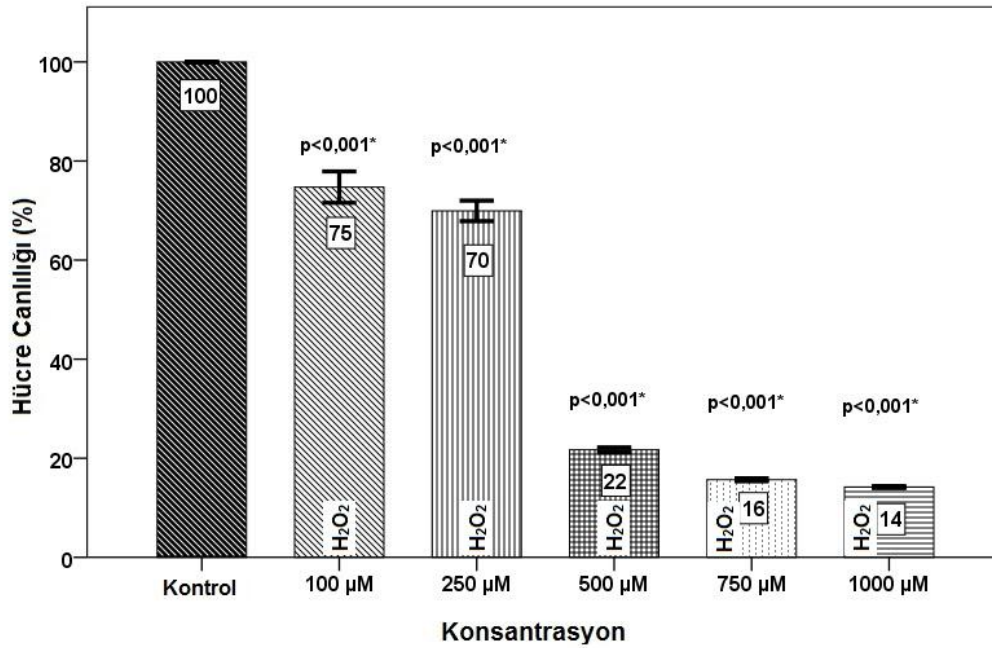
3.2.1. Hücre hatlarında H₂O₂ ile hasar modelinin oluşturulması

Hidrojen peroksit ARPE-19 hücresinde konsantrasyona bağlı (100-1000 μ M) olarak hücre ölümünü artırdı (Şekil 3.5). Hücre canlılığını %70-80 arasında azaltan konsantrasyonun 500 μ M H₂O₂ olduğu bulundu ve bundan sonraki deneylerde 500 μ M konsantrasyon hücre hasarı oluşturmak için kullanıldı (p<0.001) (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. H₂O₂ ile oluşturulan hasar modelinde istatistiksel sonuçlar

Konsantrasyon	Mean \pm SD	F	p
Kontrol	100,00 \pm 0,00		
100 μ M	74,73 \pm 7,09 ^a		
250 μ M	69,93 \pm 4,63 ^a		
500 μ M	21,69 \pm 1,11 ^a	552,052	0,001*
750 μ M	15,65 \pm 0,69 ^a		
1000 μ M	14,19 \pm 0,45 ^a		

One-Way Anova; Post-hoc: Dunnett test; α :0,05;* farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^akontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı, F:Anova testi teorik değeri, p:olasılık değeri.



Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde hidrojen peroksitin hücre canlılığı üzerine etkisi

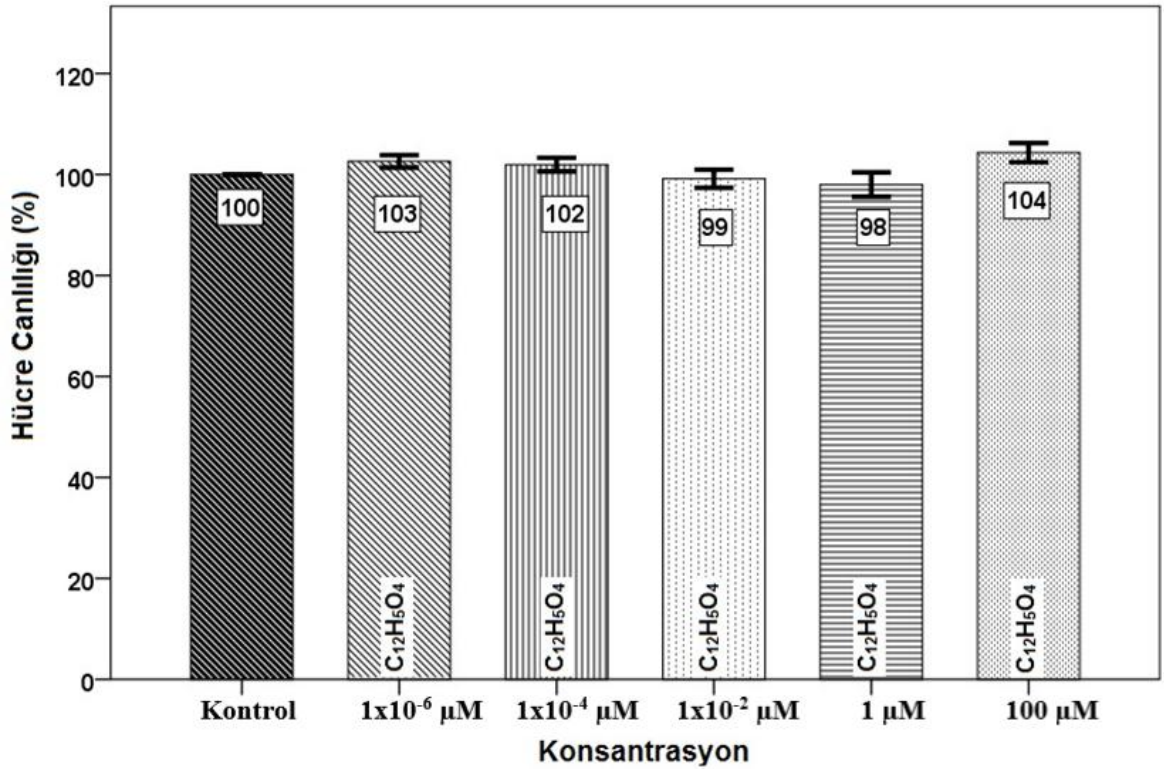
3.2.2. ARPE-19 hücrelerinde pinosembrinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde pinosembrinin tek başına etkisi incelendiğinde, hücre canlılığı üzerine herhangi bir etki görülmedi (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.6).

Çizelge 3.2. Pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00	2,090	0,102
0,000001 µM	102,59±2,74		
0,0001 µM	101,95±3,02		
0,01 µM	99,14±4,02		
1 µM	97,98±5,42		
100 µM	104,31±4,24		

One-Way Anova; Post-hoc: Dunnett test; α :0,05



Şekil 3.6. ARPE-19 hücrelerinde pinosembrinin hücre canlılığına etkisi

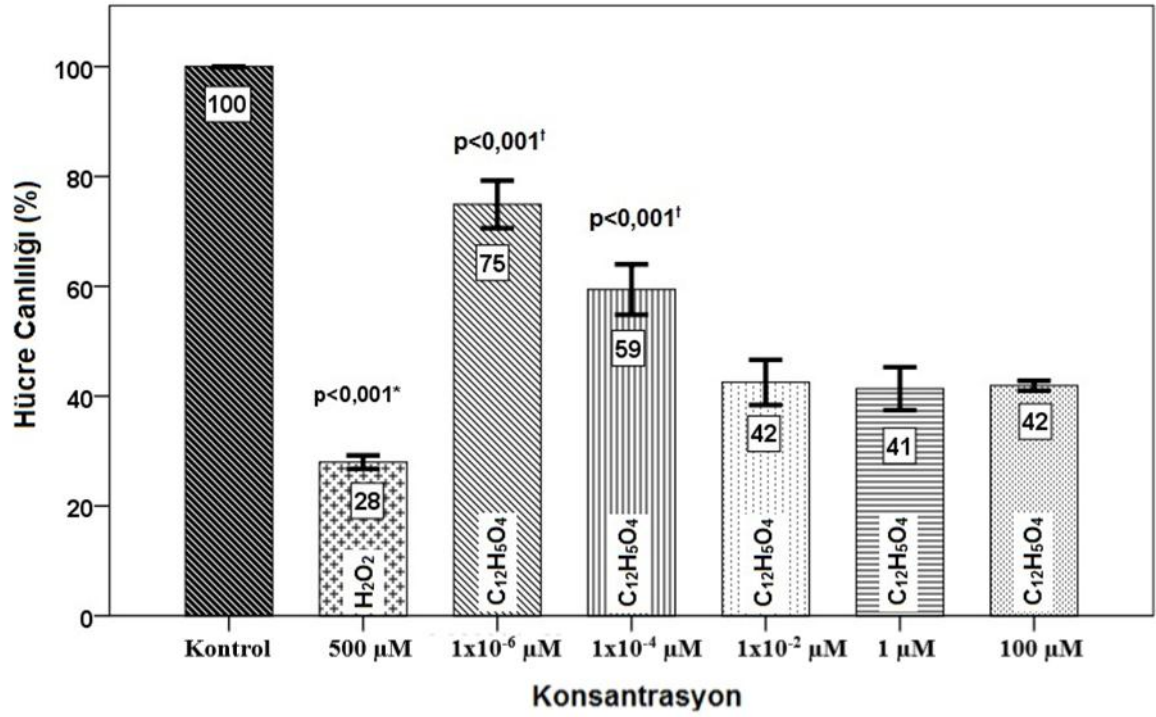
3.2.3. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde, düşük konsantrasyonlarda pinosembrinin H_2O_2 'den önce uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p<0.001$) (Çizelge 3.3, Şekil 3.7).

Çizelge 3.3. Oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 μM H_2O_2	27,97±2,71 ^a		
0,000001 μM	74,91±9,68 ^b		
0,0001 μM	59,39±10,26 ^b	57,828	0,001*
0,01 μM	42,50±9,19		
1 μM	41,35±8,75		
100 μM	41,89±2,03		
Total	55,43±24,20		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test; Dunnett test; $\alpha:0,05$; * farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^akontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^b H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.7. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi pinosembrinin hücre canlılığına etkisi

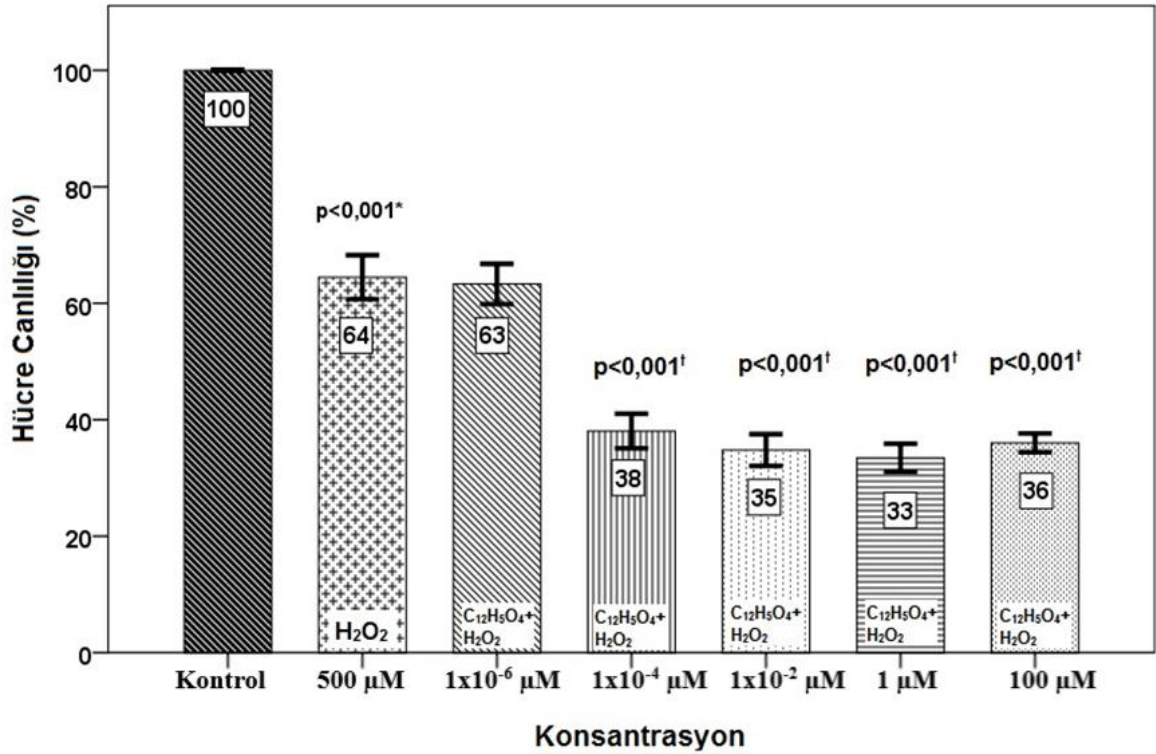
3.2.4. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde, yüksek konsantrasyon pinosembrinin H_2O_2 ile birlikte uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini istatistiksel anlamlı olarak arttırdı ($p < 0.001$) (Çizelge 3.4, Şekil 3.8).

Çizelge 3.4. Oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 μM H_2O_2	64,48±8,47 ^a		
0,000001 μM	63,32±7,74		
0,0001 μM	38,06±6,65 ^b	8,959	$P < 0,001^*$
0,01 μM	34,80±6,08 ^b		
1 μM	33,46±5,43 ^b		
100 μM	36,03±3,59 ^b		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test; Dunnett test; $\alpha: 0,05$; * farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^a kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^b H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.8. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinosembrinin hücre canlılığına etkisi

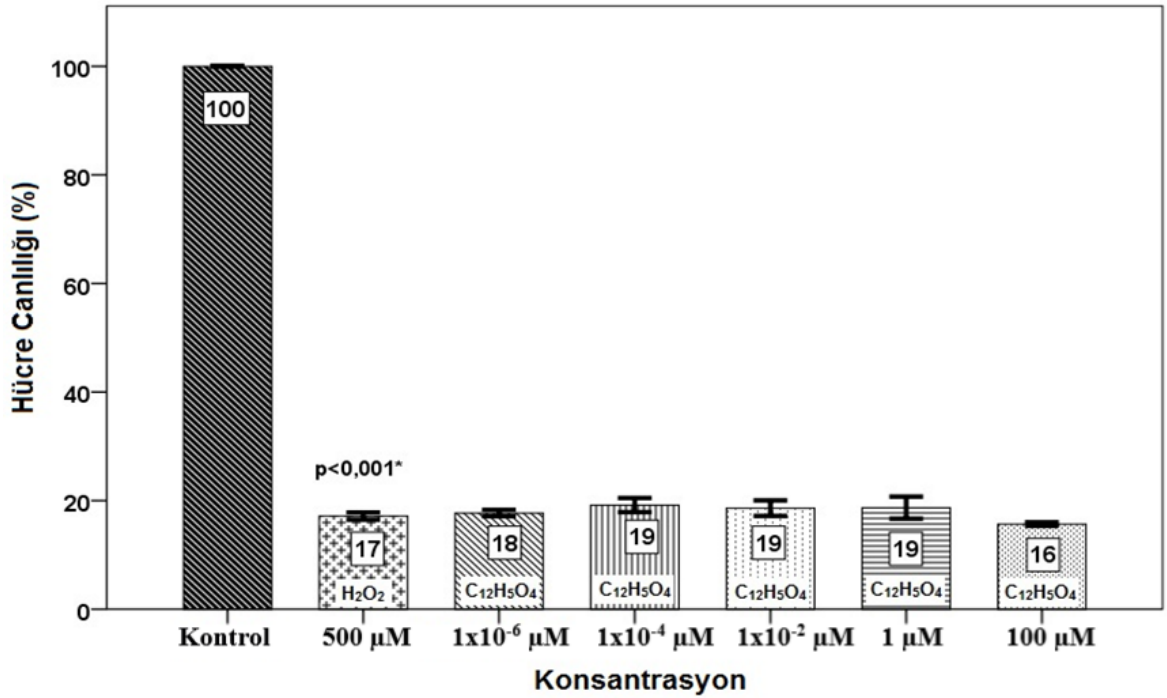
3.2.5. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde pinosembrinin H₂O₂'den sonra uygulanması, H₂O₂'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini değiştirmediğini gözlemledik (Çizelge 3.5, şekil 3.9).

Çizelge 3.5. Oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 µM H ₂ O ₂	17,15±1,51 ^a		
0,000001 µM	17,71±1,33		
0,0001 µM	19,18±2,91	771,270	p<0,001*
0,01 µM	18,61±3,17		
1 µM	18,70±4,55		
100 µM	15,69±0,76		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test;Dunnett test; α :0,05;* farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^akontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı;^b H₂O₂ grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



şekil 3.9. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu sonrası pinosembrinin hücre canlılığına etkisi

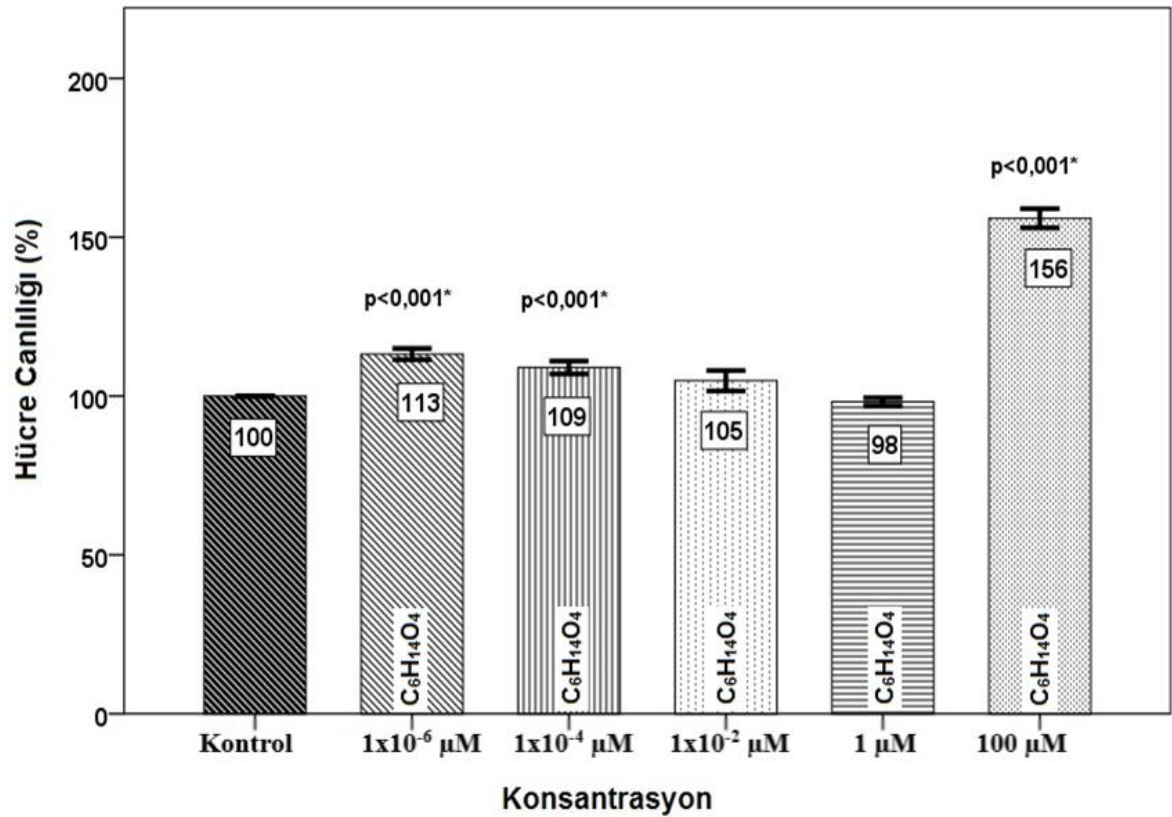
3.2.6. ARPE-19 hücrelerinde pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde pinostrobinin tek başına uygulaması incelendiğinde düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını kontrol grubuna göre arttırdığını saptadık (Çizelge 3.6, Şekil 3.10).

Çizelge 3.6. Pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
0,000001 µM	113,19±3,99 ^a		
0,0001 µM	109,00±4,53 ^a		
0,001 µM	104,81±7,17	98,650	0,001*
1 µM	98,21±2,74		
100 µM	155,94±6,74 ^a		

One-Way Anova; Post-hoc: Dunnett test; α :0,05;* farklılık istatistiksel olarak anlamlı;
^akontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.10. ARPE-19 hücrelerinde pinostrobinin hücre canlılığına etkisi

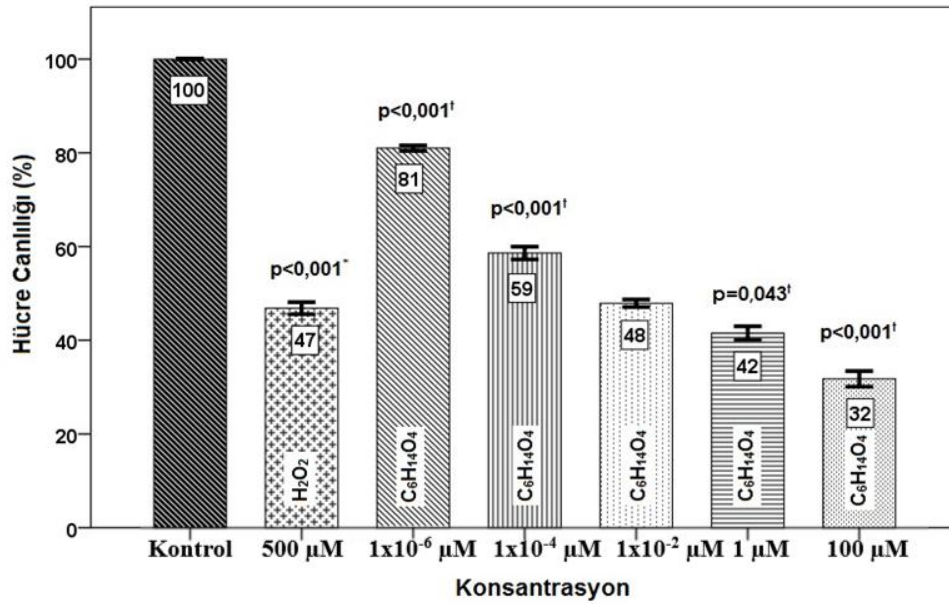
3.2.7. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşum öncesi pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde düşük konsantrasyon pinostrobinin H_2O_2 'den önce uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini istatistiksel anlamlı olarak azalttı. Yüksek konsantrasyon pinosembrin H_2O_2 ile birlikte uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini istatistiksel anlamlı olarak arttırdı ($p < 0.001$) (Çizelge 3.7, Şekil 3.11).

Çizelge 3.7. Oksidatif hasar oluşum öncesi pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 μM H_2O_2	46,84±2,88 ^a		
0,000001 μM	81,00±1,31 ^b		
0,0001 μM	58,61±3,05 ^b	431,806	$p < 0,001^*$
0,01 μM	47,89±1,82		
1 μM	41,54±3,25 ^b		
100 μM	31,77±3,71 ^b		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test; Dunnett test; $\alpha: 0,05$; * farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^a kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^b H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.11. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşum öncesi pinostrobinin hücre canlılığına etkisi

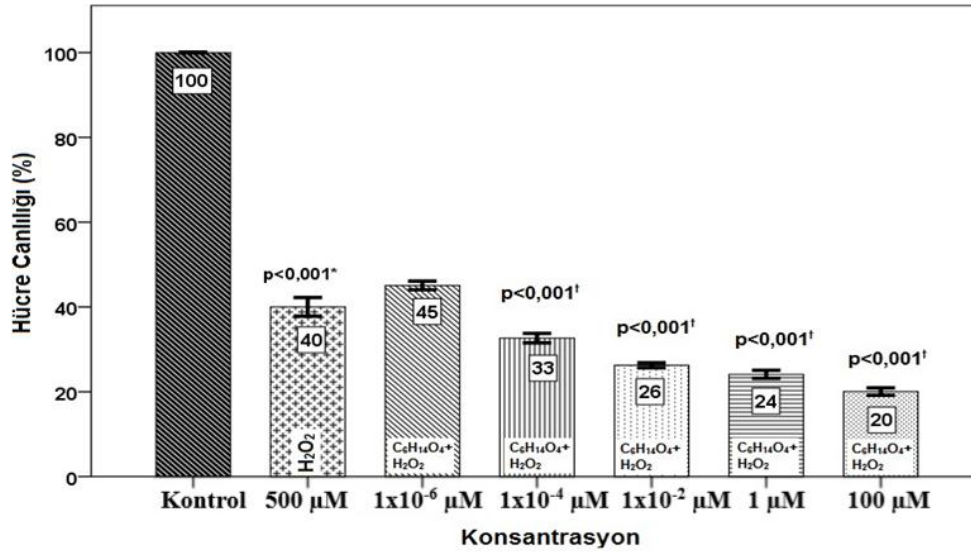
3.2.8. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde düşük konsantrasyonda pinostrobin H_2O_2 ile birlikte uygulanması hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak etkilemedi fakat yüksek konsantrasyonlarda pinostrobin H_2O_2 ile birlikte uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan etkisini istatistiksel anlamlı olarak arttırdı ($p<0.001$) (Çizelge 3.8, Şekil 3.12).

Çizelge 3.8. Oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 $\mu M H_2O_2^a$	40,02±4,94 ^a		
0,000001 μM	45,08±2,28		
0,0001 μM^b	32,64±2,51 ^b	568,289	0,001*
0,01 μM^b	26,2±1,34 ^b		
1 μM^b	24,10±2,15 ^b		
100 μM^b	20,05±1,95 ^b		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test; Dunnett test; $\alpha:0,05$; * farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^akontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^b H_2O_2 ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.12. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu ile birlikte pinostrobinin hücre canlılığına etkisi

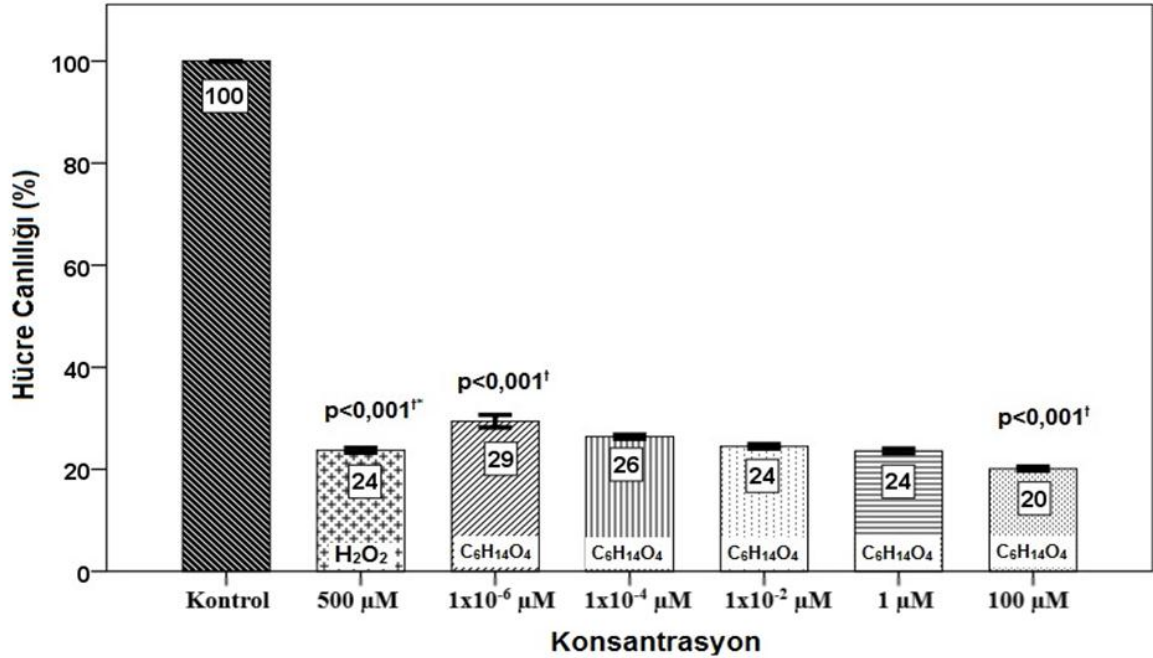
3.2.9. ARPE-19 hücrelerinde oksidatif hasar oluşumu sonrası pinostrobinin etkisinin değerlendirilmesi

ARPE-19 hücrelerinde pinostrobinin H_2O_2 'den sonra uygulanması, H_2O_2 'in hücre canlılığı üzerine olan istatistiksel anlamlı olarak azalttı ($p < 0.001$). (Çizelge 3.9, Şekil 3.13).

Çizelge 3.9. Oksidatif hasar oluşumu sonrası pinostrobinin hücre canlılığına etkisinin istatistiksel değeri

Konsantrasyon	Mean±SD	F	p
Kontrol	100,00±0,00		
500 μM H_2O_2	23,71±1,07 ^a		
0,000001 μM	29,43±2,76 ^b		
0,0001 μM	26,38±0,91	2261,728	0,001*
0,01 μM	24,48±0,99		
1 μM	23,58±1,07		
100 μM	20,12±0,91 ^b		

One-Way Anova; Post-hoc: Tukey hsd test; Dunnett test; $\alpha: 0,05$; * farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^a kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı; ^b H_2O_2 grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 3.13. ARPE-19 hücrelerinin oksidatif hasar oluşumu sonrası pinostrobinin hücre canlılığına etkisi

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda yaşlılık dönemlerinde meydana gelebilecek yaşa bağlı makula dejenerasyonunda antioksidan özellik gösteren pinosembrin ve pinostrobinin koruyucu ya da tedavi edici özelliğinin olup olmadığının, hücre kültürü ortamında araştırılmasını amaçladık. Çalışmamız pinosembrin ve pinostrobinin ARPE-19 hücrelerinde oksidatif stresin tetiklediği hasarın üzerine olan etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgularda; pinosembrin tek başına ARPE-19 hücresine uygulandığında, hücre canlılığında bir etki görülmedi. Fakat pinosembrin ARPE-19 hücresine, H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşturulmadan 4 saat önce uygulandı ve hücre canlılığını düşük konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde artırdı. Pinosembrin'in H₂O₂ ile birlikte uygulanması ise hücrede aynı etkiyi göstermedi ve hücre canlılığını daha da azaltarak hücrede oksidatif stres oluşturduğu düşünüldü. Diğer bir uygulama olan pinosembrinin H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşumu sonrasında hücreye uygulanmasının ise hücre canlılığına anlamlı etkisinin olmadığı ve H₂O₂ ile benzer etki gösterdiği görüldü. Pinosembrinin sadece önce uygulaması hücre canlılığını artırarak hücrede oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdi.

Neacsu ve ark., (2007), pinosembrin gibi flavonoidlerin, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve bu inhibisyonu molekülün A halkasındaki fenolik grup ve 4-keto grup üzerinden gerçekleştirdiği göstermişlerdir. Li-li ve ark. (2011), Pinosembrin'in, sıçanların beyininde oluşturulan oksidatif stres üzerindeki terapötik etkisini, malondialdehid (MDA) glutamat ve aspartat artışını azaltarak gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Chen ve ark., (2014), retinoblastoma hücrelerinde 20-100 µM Pinosembrin'in αvβ3 integrin/FAK/p38α aracılı antikanser etkileri olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda 1-100 µM Pinosembrin'in H₂O₂ birlikte hücre canlılığında azalmaya neden olması, Chen ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer bir sonucu göstermektedir.

Pinosembrinin, doğal bir ürün olması gelecekte terapötik potansiyeli yüksek ideal bir terapötik ajan haline gelebilir. Pinosembrinin bir farmasötik ajan olarak doğrudan tıbbi uygulama oluşturabileceğini ya da hastalıkların tedavisi için yeni maddelerin tasarımı, sentezi ve yarı-sentezi için kimyasal şablonlar olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir. Çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bir ilaç olarak pinosembrin inmedikal uygulamalarını daha fazla doğrulamak ve potansiyel rolü açık hale

getirmek için anti-inflamatuar ve antikanser etki mekanizmalarını tam olarak anlamak, spesifik hücre içi etki alanı belirlemek için ek çalışmalar gereklidir.

Pinostrobin, antioksidatif, antiinflamatuar, antimikrobiyal, antivirüs, Alzheimer önleyici ve antikanser özelliklerini içeren çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir (Patel ve ark., 2016). Bununla birlikte, pinostrobinin yüksek konsantrasyonda büyümeyi inhibe etme, hücre döngüsünü durdurma ve birçok kanser ve lösemide apoptozu indüklemeye üzerinde önemli etkileri olduğu bulunmuştur (Sayre ve ark., 2013; Christov ve ark., 2006; Patel ve Bhutani, 2014; Patel ve Bhutani, 2016). Farmakolojik araştırmalar, intestinal düz kasın kendiliğinden kasılmalarının baskılanması, aromataz aktivitesinin inhibisyonu, östrojen kaynaklı hücrelerde antiproliferasyon, siklooksijenazların inhibisyonu ile antiinflamatuar etkiler ve fare beynindeki sinaptoneurozomların sodyum kanalı ile aktive edilmiş depolarizasyonunun zayıflaması dahil olmak üzere pinostrobinin çeşitli biyolojik aktivitelerini ortaya koymuştur. Ek olarak, pinostrobin *in vitro* güçlü antioksidan etkiye sahiptir (Xian, 2012). Bulgularımız pinostrobinin üç farklı uygulama olan tek başına, H₂O₂ ile oksidatif hasar oluşumu öncesi ve sonrasında hücre canlılığını artırarak hücrede oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermektedir. Pinostrobinin oksidatif hasar oluşumu öncesi ve sonrası yüksek konsantrasyondaki antiprolifretif etkisi ise kanserde tedavi amaçlı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Temel ve klinik çalışmalardan elde edilen verilerin artması, oksidatif hasarın, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun patogeneğinde kritik olarak rol oynadığını ve dolayısıyla, antioksidatif özelliklere sahip maddelerin yaşa bağlı makula dejenerasyonu için umut verici terapötik seçenekler olabileceğini göstermektedir (Sackett ve Schenning, 2002). Örneğin, AREDS yaptığı bir çalışmaya göre, antioksidanların uygulanabileceğini gösteren, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun ilerlemesi ve β -karoten, C vitamini, E vitamini, çinko ve bakır gibi farmakolojik dozlarda birkaç antioksidan maddenin etkilerini değerlendirdiğinde; 5 yıl içinde ileri yaşa bağlı makula dejenerasyonunun progresyonunda %25 risk azalması ve orta görme kaybında ise %19 risk azalması ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (Wong ve ark., 2010). Biz bu çalışmada, flavonoid bileşik olan pinosembrin ve pinostrobinin ARPE-19 hücreleri için H₂O₂'nin neden olduğu oksidatif hasar ile bu hücrelerde hayatta kalma oranını önemli ölçüde artırdığını gösterdik.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımız sonucunda çalışmada kullanılan pinosembrin ve pinostrobinin oksidatif stres kaynaklı hücre hasarında koruyucu veya tedavi edici etkileri görülmektedir. Ayrıca pinosembrin ve pinostrobinin yüksek konsantrasyonda uygulanması antiproliferatif etki gösterdiğinden dolayı, gelecekte kanser çalışmalarında terapötik ajan olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızdan elde edilebilecek çıkarımlar;

➤ Pinosembrin ve pinostrobinin düşük konsantrasyonda etki göstermesi tedavide kullanılması durumunda daha az yan etki oluşturmasına ve güvenle tedavide kullanılmasına imkân sağlayabilir.

➤ Pinosembrin ve pinostrobin, doğal ürünler olması nedeniyle gelecekte terapötik potansiyeli ile ideal bir terapötik ajan haline gelebilir.

➤ Pinosembrin ve pinostrobin bir farmasötik ajan olarak doğrudan tıbbi uygulama oluşturabileceği gibi hastalıkların tedavisi için yeni maddelerin tasarımı, sentezi ve yarı-sentezi için kimyasal şablonların geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabilir.

➤ Pinosembrin ve pinostrobinin çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde bir ilaç olarak inmedikal uygulamalarını daha fazla geliştirmek adına anti-inflamatuar, antikanser ve apoptotik etki mekanizmalarını tam olarak aydınlatılabilmek için deney hayvanları ve insan çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Abdulla, M. A., Sukari, M. A., Abdul, A. B., Taha, M. M. E., Lee, K. H. 2011. The Methanolic Extract of *Boesenbergia Rotunda* (L.) Mansf. and Its Major Compound Pinostrobin Induces Anti-Ulcerogenic Property *In Vivo*: Possible Involvement of Indirect Antioxidant Action. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2) : 963-970.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. 2001. A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C And E, Beta Carotene, and Zinc For Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. *Archives of Ophthalmology*, 119 (10) : 1417.
- Albert, D. M., Jakobiec, F. A. (Eds.). 2000. *Principles and Practice of Ophthalmology* (Vol. 1). WB Saunders Company.
- Al-Zamil, W. M., Yassin, S. A. 2017. Recent Developments in Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Clinical Interventions in Aging*, 12 : 1313.
- Anonymous, 2018a. National Institutes of Health. Phase II Study of Pinocembrin Injection
- Anonymous, 2018b. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products>
- to Treat I Ischemic Stroke, 2014.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., Marcucci, M. C. 2000. Propolis: Recent Advances In Chemistry and Plant Origin. *Apidologie*, 31 (1) : 3-15.
- Barrientos, L., Herrera, C. L., Montenegro, G., Ortega, X., Veloz, J., Alvear, M., Salazar, L. A. 2013. Chemical and Botanical Characterization of Chilean Propolis and Biological Activity on Cariogenic Bacteria *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (2), 577-585.
- Başmak, H. 2005. Gözün Anatomisi ve Fizyolojisi. Esen Ofset Matbaacılık
- Bengisu, Ü. 1989. Göz Hastalıkları. 4. Baskı. Ankara. Palme Yayıncılık.
- Berrow, E., Bartlett Eperjesi, H., Eperjesi, F., M Gibson, J. 2011. Risk Factors For Age-Related Macular Disease. *European Ophthalmic Review*, 5 (2) : 143-153.
- Berry, C., Hamilton, C. A., Brosnan, M. J., Magill, F. G., Berg, G. A., McMurray, J. J., Dominiczak, A. F. 2000. Investigation into The Sources of Superoxide in Human Blood Vessels: Angiotensin II Increases Superoxide Production in Human Internal Mammary Arteries. *Circulation*, 101 (18) : 2206-2212.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., Krause, K. H. 2012. Reactive Oxygen Species: From Health To Disease. *Swiss Medical Weekly*, 142: 13659.

- Bron, A. J., Tripathi, R. C., Tripathi, B. J. 1997. Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. 8th.
- Bruban, J., Glotin, A. L., Dinet, V., Chalour, N., Sennlaub, F., Jonet, L., Mascarelli, F. 2009. Amyloid-B (1-42) Alters Structure and Function of Retinal Pigmented Epithelial Cells. *Aging Cell*, 8 (2) : 162-177.
- Cao 1, X. D., Ding 1, Z. S., Jiang, F. S., Ding, X. H., Chen, J. Z., Chen, S. H., Lv, G. Y. 2012. Antitumor Constituents From The Leaves of *Carya Cathayensis*. *Natural Product Research*, 26 (22) : 2089-2094.
- Castaldo, S., Capasso, F. 2002. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia*, 73, 1-6.
- Charoensin, S., Punvittayagul, C., Pompimon, W., Mevatee, U., Wongpoomchai, R. 2010. Toxicological and Clastogenic Evaluation of Pinocembrin and Pinostrobin Isolated From *Boesenbergia Pandurata* in Wistar Rats. *Thai Journal of Toxicology*, 25 (1) : 29-40.
- Chen, K. S., Shi, M. D., Chien, C. S., Shih, Y. W. 2014. Pinocembrin Suppresses TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis of Human Y-79 Retinoblastoma Cells Through Inactivating $\text{Av}\beta$ 3 Integrin/FAK/P38 α Signaling Pathway. *Cell & Bioscience*, 4 (1), 41.
- Chichagova, V., Hallam, D., Collin, J., Zerti, D., Dorgau, B., Felemban, M., Steel, D. H. 2018. Cellular Regeneration Strategies for Macular Degeneration: Past, Present and Future. *Eye*, 1.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M. 2006. Chemical Composition of Propolis From Canada, Its Antiradical Activity and Plant Origin. *Natural Product Research*, 20 (06), 531-536.
- Ciulla, T. A., Danis, R. P., Harris, A. 1998. Age-Related Macular Degeneration: A Review of Experimental Treatments. *Survey of Ophthalmology*, 43 (2) : 134-146.
- Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Salomon, R. G. 2002. Drusen Proteome Analysis: an Approach to The Etiology of Age-Related Macular Degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (23) : 14682-14687.
- Çömlekoğlu, D. U., Tigrel, G. 2015. Kuru Tip Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonunda İlerleme Engellenebilir mi? Yeni Tedavi Yöntemleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology Special Topics*, 8 (1) : 49-52.

- Daugusch, A., Moraes, C. S., Fort, P., & Park, Y. K. 2008. Brazilian Red Propolis— Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (4) : 435-441.
- De Leo, M. E., Borrello, S. I. L. V. I. A., Passantino, M., Palazzotti, B., Mordente, A. L. V. A. R. O., Daniele, A., Masullo, C. 1998. Oxidative Stress and Overexpression of Manganese Superoxide Dismutase in Patients with Alzheimer's Disease. *Neuroscience Letters*, 250 (3) : 173-176.
- Decanini, A., Nordgaard, C. L., Feng, X., Ferrington, D. A., Olsen, T. W. 2007. Changes in Select Redox Proteins of The Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *American Journal of Ophthalmology*, 143 (4) : 607-615.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F. 1999. Flavonoids: Old And New Aspects of A Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life Sciences*, 65 (4): 337-353.
- Diaz Napal, G. N., & Palacios, S. M. 2013) Phytotoxicity of Secondary Metabolites Isolated From *Flourensia Olepis* SF Blake. *Chemistry & Biodiversity*, 10 (7) : 1295-1304.
- Dinc, E., Ayaz, L., Kurt, A. H. 2017. Protective Effect of Combined Caffeic Acid Phenethyl Ester And Bevacizumab Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress In Human RPE Cells. *Current Eye Research*, 42 (12) : 1659-1666.
- Du, G., Lv, Y., Wu, S., Wang, K., Chang, Y., Yang, Z., Gao, M. 2013. *U.S. Patent No. 8,399,511*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Duker- Eshun, G., Jaroszewski, J. W., Asomaning, W. A., Oppong- Boachie, F., & Brøgger Christensen, S. 2004. Antiplasmodial Constituents of *Cajanus Cajan*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18 (2) : 128-130.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35 4, 495-516.
- Ergin, M. 2015. Toplam Antioksidan Kapasiteyi Ölçen Yöntemlerin Karşılaştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Eğitim vVe Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Uzmanlık Tezi. Ankara.
- Evan, G. I., Vousden, K. H. 2001. Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer. *Nature*, 411(6835) : 342.

- Fahey, J. W., Stephenson, K. K. 2002. Pinostrobin From Honey and Thai Ginger (*Boesenbergia Pandurata*): A Potent Flavonoid Inducer of Mammalian Phase 2 Chemoprotective and Antioxidant Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (25), 7472-7476.
- Finger, R. P., Kupitz, D. G., Holz, F. G., Balasubramaniam, B., Ramani, R. V., Lamoureux, E. L., Fenwick, E. 2011. The Impact of The Severity of Vision Loss on Vision-Related Quality of Life In India: An Evaluation of The IND-VFQ-33. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52 (9) : 6081-6088.
- Förstermann, U. (2010). Nitric Oxide and Oxidative Stress in Vascular Disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 459 (6) : 923-939.
- Frank, R. N., Amin, R. H., Puklin, J. E. 1999. Antioxidant Enzymes in the Macular Retinal Pigment Epithelium of Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *American journal of ophthalmology*, 127 (6) : 694-709.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide Dismutases. an Adaptation to a Paramagnetic Gas. *J Biol Chem*, 264 (14) : 7761-7764.
- Fulda, S. 2010. Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer. *International Journal Of Cell Biology*, 2010.
- Gao, M., Liu, R., Zhu, S. Y., Du, G. H. 2008. Acute Neurovascular Unit Protective Action of Pinocembrin Against Permanent Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10 (6) : 551-558.
- Gedikli, S. 2013. Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi Ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Erzurum. 97s
- Geibel, M. 1995.) Sensitivity of The Fungus *Cytospora Persoonii* to the Flavonoids of *Prunus Cerasus*. *Phytochemistry*, 38 (3) : 599-601.
- Goldstein, S., Czapski, G. 1991. Comparison Between Different Assays for Superoxide Dismutase-Like Activity. *Free Radical Research Communications*, 12 (1) : 5-10.
- Gómez-Betancur, I., Benjumea, D., Patiño, A., Jiménez, N., Osorio, E. 2014. Inhibition of the Toxic Effects of Bothrops Asper Venom by Pinostrobin, A Flavanone Isolated From *Renealmia Alpinia* (Rottb.) MAAS. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 (3) : 1609-1615.
- Gray, H. B., Valentine, J. S., Stiefel, E. I. 2007. Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity. University Science Books.

- Gutteridge, J. M. 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41 (12) : 1819-1828.
- Guzik, T. J., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M. 2014. Functional Implications of Reactive Oxygen Species (ROS) in Human Blood Vessels. *In Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1155s.
- Hall, N. F., Gale, C. R., Syddall, H., Martyn, C. N., Phillips, D. I. 2002. Relation Between Size at Birth and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43 (12) : 3641-3645.
- Harwood, R. H. 2001. Visual Problems and Falls. *Age And Ageing*, 30 (4) : 13-18.
- Heffner, J. E., Repine, J. E. 1989. Pulmonary Strategies of Antioxidant Defense 1. *Am. Rev. Respir. Dis*, 140 : 531-554.
- Hegazi, A. G., El Hady, F. K. A., Allah, F. A. A. 2000. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55 (1-2) : 70-75.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 13 (10): 572-584.
- Hua, X., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Zhang, L., Wang, W., Luo, M. 2011. Determination of Pinostrobin in Rat Plasma by LC–MS/MS: Application to Pharmacokinetics. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 56 (4) : 841-845.
- Huang, H. L., Hsing, H. W., Lai, T. C., Chen, Y. W., Lee, T. R., Chan, H. T., Lin, C. W. 2010. Trypsin-Induced Proteome Alteration During Cell Subculture In Mammalian Cells. *Journal of Biomedical Science*, 17 (1) : 36.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., Hu, F. L. 2014. Recent Advances in The Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19 (12) : 19610-19632.
- Izuta, H., Shimazawa, M., Tazawa, S., Araki, Y., Mishima, S., Hara, H. 2008. Protective Effects of Chinese Propolis and Its Component, Chrysin, Against Neuronal Cell Death Via Inhibition of Mitochondrial Apoptosis Pathway in SH-SY5Y Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19) : 8944-8953.
- Jager, R. D., Mieler, W. F., Miller, J. W. 2008. Age-Related Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358 (24) : 2606-2617.
- Janeiro, P., Brett, A. M. O. 2004. Catechin Electrochemical Oxidation Mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518 (1-2) : 109-115.

- Jarrett, S. G., Boulton, M. E. 2012. Consequences of Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (4) : 399-417.
- Jin, X., Liu, Q., Jia, L., Li, M., Wang, X. 2015. Pinocembrin Attenuates 6-OHDA-Induced Neuronal Cell Death Through Nrf2/ARE Pathway In SH-SY5Y Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35 (3) : 323-333.
- Kaneko, M., Hwang, E. I., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. 2003. Heterologous Production of Flavanones in *Escherichia Coli*: Potential for Combinatorial Biosynthesis of Flavonoids in Bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (8) : 456-461.
- Katerere, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., Waigh, R. D. 2012. Phytochemical and Antimicrobial Investigations of Stilbenoids and Flavonoids Isolated From Three Species of Combretaceae. *Fitoterapia*, 83 (5), 932-940.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., Jain, R. 2009. Antimalarials From Nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 (9), 3229-3256.
- Kennedy, C. J., Rakoczy, P. E., Constable, I. J. 1995. Lipofuscin of the Retinal Pigment Epithelium: A Review. *Eye*, 9 (6) : 763.
- Khandhadia, S., Lotery, A. 2010. Oxidation and Age-Related Macular Degeneration: Insights From Molecular Biology. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12.
- Kiat, T. S., Phippen, R., Yusof, R., Ibrahim, H., Khalid, N., Rahman, N. A. 2006. Inhibitory Activity of Cyclohexenyl Chalcone Derivatives and Flavonoids of Fingerroot, *Boesenbergia Rotunda* (L.), Towards Dengue-2 Virus NS3 Protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16 (12) : 3337-3340.
- Klein, R., Klein, B. E., Linton, K. L., DeMets, D. L. 1993. The Beaver Dam Eye Study: The Relation of Age-Related Maculopathy to Smoking. *American Journal of Epidemiology*, 137 (2) : 190-200.
- Kocatürk, P. A., Akbostanci, M. C., Tan, F., Kavas, G. Ö. 2000. Superoxide Dismutase Activity and Zinc and Copper Concentrations In Parkinson's Disease. *Pathophysiology*, 7 (1) : 63-67.
- Kong, Y., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Chang, F. R., Chen, Y. H., Liu, X. L., Schiebel, H. M. 2010. Cajanuslactone, A New Coumarin with Anti-Bacterial Activity From Pigeon Pea [*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *Food Chemistry*, 121 (4) : 1150-1155.
- Korenaga, T., Hayashi, K., Akaki, Y., Maenishi, R., Sakai, T. 2011. Highly Enantioselective and Efficient Synthesis of Flavanones Including Pinostrobin Through

- the Rhodium-Catalyzed Asymmetric 1, 4-Addition. *Organic Letters*, 13 (8) : 2022-2025.
- Köse M. Manganese Complexes as Catalase and Superoxide Dismutase Mimics; Structure and Reactivity Relationships. Doktora Tezi. Loughborough University, 2012
- Kuete, V., Nkuete, A. H., Mbaveng, A. T., Wiench, B., Wabo, H. K., Tane, P., Efferth, T. 2014. Cytotoxicity and Modes of Action of 4'-Hydroxy-2', 6' -Dimethoxychalcone and Other Flavonoids Toward Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Cancer Cell Lines. *Phytomedicine*, 21 (12) : 1651-1657.
- Kul'magambetova, E. A., Yamovoi, V. I., Kusainova, D. D., Pak, R. N., Kulyyasov, A. T., Turdybekov, K. M., Gatilov, Y. V. 2002. Synthesis and Structure of Pinostrobin Oxime and Its Biological Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 38 (6) : 527-531.
- Kumar, M. S., Nair, M., Hema, P. S., Mohan, J., Santhoshkumar, T. R. 2007. Pinocembrin Triggers Bax- Dependent Mitochondrial Apoptosis In Colon Cancer Cells. *Molecular Carcinogenesis: Published in Cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 46 (3) : 231-241.
- Kumar, S., Pandey, A. K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013 : 1-16
- Lan, X., Wang, W., Li, Q., Wang, J. 2016. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Molecular Neurobiology*, 53 (3) : 1794-1801.
- Le Bail, J. C., Aubourg, L., Habrioux, G. 2000. Effects of Pinostrobin on Estrogen Metabolism and Estrogen Receptor Transactivation. *Cancer Letters*, 156 (1) : 37-44.
- Lee, C., Lee, J. W., Jin, Q., Jang, D. S., Lee, S. J., Lee, D., Hwang, B. Y. 2013. Inhibitory Constituents of The Heartwood of Dalbergia Odorifera on Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (14) : 4263-4266.
- Li, L. I., Hai-Guang, Y. A. N. G., Tian-Yi, Y. U. A. N., Yan, Z. H. A. O., Guan-Hua, D. U. 2013. Rho Kinase Inhibition Activity of Pinocembrin In Rat Aortic Rings Contracted by Angiotensin II. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11 (3) : 258-263.
- Lim, C. F., Loidl, N. M., Kennedy, J. A., Topliss, D. J., Stockigt, J. R. 1995. Effect of Loop Diuretics and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs on Thyrotropin Release

- by Rat Anterior Pituitary Cells *In Vitro*. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 44 (8): 1008-1012.
- Liu, R., Gao, M., Yang, Z. H., Du, G. H. 2008. Pinocembrin Protects Rat Brain Against Oxidation and Apoptosis Induced by Ischemia–Reperfusion Both *In Vivo* and *In Vitro*. *Brain Research*, 1216 : 104-115.
- Liu, R., Li, J. Z., Song, J. K., Zhou, D., Huang, C., Bai, X. Y., Zhang, L. 2014. Pinocembrin Improves Cognition and Protects the Neurovascular Unit in Alzheimer Related Deficits. *Neurobiology of Aging*, 35 (6) : 1275-1285.
- Liu, R., Wu, C. X., Zhou, D., Yang, F., Tian, S., Zhang, L., Du, G. H. 2012. Pinocembrin Protects Against B-Amyloid-Induced Toxicity In Neurons Through Inhibiting Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-Independent Signaling Pathways and Regulating Mitochondrion-Mediated Apoptosis. *BMC Medicine*, 10 (1) : 105.
- Liu, Y. L., Ho, D. K., Cassady, J. M., Cook, V. M., Baird, W. M. 1992. Isolation of Potential Cancer Chemopreventive Agents From *Eriodictyon Californicum*. *Journal of Natural Products*, 55 (3) : 357-363.
- Long, L. H., Evans, P. J., Halliwell, B. 1999. Hydrogen Peroxide In Human Urine: Implications for Antioxidant Defense and Redox Regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262 (3) : 605-609.
- Ma, Y., Li, L., Kong, L., Zhu, Z., Zhang, W., Song, J., Du, G. 2018. Pinocembrin Protects Blood-Brain Barrier Function and Expands the Therapeutic Time Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment in a Rat Thromboembolic Stroke Model. *Biomed Research International*, 2018.
- Macular Photocoagulation Study Group. 1994. Laser Photocoagulation for Juxtafoveal Choroidal Neovascularization. Five-Year Results From Randomized Clinical Trials. *Arch Ophthalmol*, 112 : 500-509.
- Mashentseva, A. A., Seytembetov, T. S., Adekenov, S. M., Tuleuov, B. I., Loiko, O. P., Khalitova, A. I. 2011. Synthesis and Biological Activity of the Pinostrobin Oxime Complex Compounds with Some D-Metals. *Russian Journal of General Chemistry*, 81 (1), 96-101.
- Massaro, C. F., Katouli, M., Grkovic, T., Vu, H., Quinn, R. J., Heard, T. A., Brooks, P. 2014. Anti-Staphylococcal Activity of C-Methyl Flavanones From Propolis of Australian Stingless Bees (*Tetragonula Carbonaria*) and Fruit Resins of *Corymbia Torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*, 95 : 247-257.

- Matsuura, T., Takemoto, T., Nakashima, R. 1973. Photoinduced Reactions—LXXI: Photorearrangement of 3-Hydroxyflavones to 3-Aryl-3-Hydroxy-1, 2-Indandiones. *Tetrahedron*, 29 (21) : 3337-3340.
- Mazen S. 2016. İnsan Safen Veninde Hidrojen Peroksit ile Oluşturulan Oksidatif Stres ve Doksisiklinin Vasküler Yanıtlar Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- McConnell, V., Silvestri, G. 2005. Age-Related Macular Degeneration. *The Ulster Medical Journal*, 74 (2) :82.
- McCord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase an Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry*, 244 (22) : 6049-6055.
- Meng, F., Liu, R., Gao, M., Wang, Y., Yu, X., Xuan, Z., Du, G. 2011. Pinocembrin Attenuates Blood-Brain Barrier Injury Induced by Global Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats. *Brain Research*, 1391, 93-101.
- Metzner, J., Schneidewind, E. M., Friedrich, E. 1977. Effect of Propolis and Pinocembrin on Fungi. *Die Pharmazie*, 32 (11) : 730.
- Middleton, E. (1984). The Flavonoids. *Trends Pharmacol Sci*, 5 : 335-338.
- Mirzoeva, O. K., Calder, P. C. 1996. The Effect of Propolis and Its Components on Eicosanoid Production During the Inflammatory Response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55 (6) : 441-449.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2) : 55-63.
- Mukusheva, G. K., Lipeeva, A. V., Zhanymkhanova, P. Z., Shults, E. E., Gatilov, Y. V., Shakirov, M. M., Adekenov, S. M. 2015. The Flavanone Pinostrobin in the Synthesis of Coumarin-Chalcone Hybrids with a Triazole Linker. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 51 (2) : 146-152.
- Neacsu, M., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Pietarinen, S. P., Ahotupa, M. O., Holmbom, B. R., Willför, S. M. 2007. Antioxidant Flavonoids From Knotwood of Jack Pine and European Aspen. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 65 (1) : 1-6.
- Nicholson, R. A., David, L. S., Le Pan, R., Liu, X. M. 2010. Pinostrobin From *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Inhibits Sodium Channel-Activated Depolarization of Mouse Brain Synaptoneurosomes. *Fitoterapia*, 81 (7) : 826-829.

- Özkaya, A. B. 2009. HCT-116 Kolon Kanseri Hücre Hattında Yeşil Çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallocatekin-3 Gallat'ın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Panthong, A., Kanjanapothi, D., Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., Reutrakul, V. 1994. Antiinflammatory Activity of Flavonoids. *Phytomedicine*, 1 (2), 141-144.
- Patel, N. K., Bhutani, K. K. 2014. Pinostrobin and Cajanus Lactone Isolated From Cajanus Cajan (L.) Leaves Inhibits TNF-A And IL-1 β Production: *In Vitro* and *In Vivo* Experimentation. *Phytomedicine*, 21 (7) : 946-953.
- Patel, N. K., Bhutani, K. K. 2014. Pinostrobin and Cajanus Lactone Isolated From Cajanus Cajan (L.) Leaves Inhibits TNF-A and IL-1 β Production: *In Vitro* and *In Vivo* Experimentation. *Phytomedicine*, 21 (7) : 946-953.
- Patel, N. K., Jaiswal, G., Bhutani, K. K. 2016. A Review on Biological Sources, Chemistry and Pharmacological Activities of Pinostrobin. *Natural Product Research*, 30 (18) : 2017-2027.
- Peng, Z. F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N. K., Chia, T. F., Chia, L. S. 2003. Antioxidant Flavonoids From Leaves of Polygonum Hydropiper L. *Phytochemistry*, 62 (2): 219-228.
- Percival M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*.
- Peskin, A. V., Winterbourn, C. C. 2000. A Microtiter Plate Assay for Superoxide Dismutase Using a Water-Soluble Tetrazolium Salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, 293 (1-2) : 157-166.
- Pietta, P. G., Gardana, C., Pietta, A. M. 2002. Analytical Methods for Quality Control of Propolis. *Fitoterapia*, 73 : 7-20.
- Punvittayagul, C., Wongpoomchai, R., Taya, S., & Pompimon, W. (2011). Effect of Pinocembrin Isolated From Boesenbergia Pandurata on Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rat Liver. *Drug Metabolism Letters*, 5 (1) : 1-5.
- Rasul, A., Bao, R., Malhi, M., Zhao, B., Tsuji, I., Li, J., Li, X. (2013). Induction of Apoptosis by Costunolide in Bladder Cancer Cells is Mediated Through ROS Generation and Mitochondrial Dysfunction. *Molecules*, 18 (2) : 1418-1433.
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., Li, X. 2013. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *Biomed Research International*, 2013 :1-16

- Rasul, A., Yu, B., Zhong, L., Khan, M., Yang, H., Ma, T. 2012. Cytotoxic Effect of Evodiamine in SGC-7901 Human Gastric Adenocarcinoma Cells Via Simultaneous Induction of Apoptosis and Autophagy. *Oncology Reports*, 27 (5) : 1481-1487.
- Riley, D. P. 1999. Functional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents. *Chemical Reviews*, 99 (9) : 2573-2588.
- Riley, D. P., Rivers, W. J., Weiss, R. H. 1991. Stopped-Flow Kinetic Analysis for Monitoring Superoxide Decay in Aqueous Systems. *Analytical Biochemistry*, 196 (2) : 344-349.
- Ruddock, P. S., Charland, M., Ramirez, S., López, A., Towers, G. N., Arnason, J. T., Dillon, J. A. R. 2011. Antimicrobial Activity of Flavonoids From Piper Lanceaefolium and Other Colombian Medicinal Plants Against Antibiotic Susceptible and Resistant Strains of Neisseria Gonorrhoeae. *Sexually Transmitted Diseases*, 38 (2) : 82-88.
- Saarinen, N., Joshi, S. C., Ahotupa, M., Li, X., Ämmälä, J., Mäkelä, S., Santti, R. 2001. No Evidence for the *In Vivo* Activity of Aromatase-Inhibiting Flavonoids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78 (3) : 231-239.
- Sackett, C. S., Schenning, S. 2002. The Age-Related Eye Disease Study: The Results of tThe Clinical Trial. *Insight (American Society of Ophthalmic Registered Nurses)*, 27 (1) : 5-7.
- Sala, A., Recio, M. C., Schinella, G. R., Máñez, S., Giner, R. M., Cerdá-Nicolás, M., & Ríos, J. L. 2003. Assessment of The Anti-Inflammatory Activity and Free Radical Scavenger Activity of Tiliroside. *European Journal of Pharmacology*, 461 (1) : 53-61.
- Sang, H., Yuan, N., Yao, S., Li, F., Wang, J., Fang, Y., Qin, S. 2012. Inhibitory Effect of The Combination Therapy of Simvastatin and Pinocembrin on Atherosclerosis in Apoe-Deficient Mice. *Lipids in Health and Disease*, 11 (1) : 166.
- Sarks, J. P., Sarks, S. H., Killingsworth, M. C. 1988. Evolution of Geographic Atrophy of the Retinal Pigment Epithelium. *Eye*, 2 (5) : 552.
- Sayre, C. L., Alrushaid, S., Martinez, S. E., Anderson, H. D., Davies, N. M. 2015. Pre-Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characterization of Selected Chiral Flavonoids: Pinocembrin and Pinostrobin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18 (4) : 368-395.

- Sayre, C. L., Takemoto, J. K., Martinez, S. E., Davies, N. M. 2013. Chiral Analytical Method Development and Application to Pre-Clinical Pharmacokinetics Pinocembrin. *Biomedical Chromatography*, 27 (6) :681-684.
- Sayre, C. L., Zhang, Y., Martinez, S. E., Takemoto, J. K., Davies, N. M. 2013. Stereospecific Analytical Method Development and Preliminary *In Vivo* Pharmacokinetic Characterization of Pinostrobin in The Rat. *Biomedical Chromatography*, 27 (5) : 548-550.
- Shaw, P. X., Stiles, T., Douglas, C., Ho, D., Fan, W., Du, H., Xiao, X. 2016. Oxidative Stress, Innate Immunity, and Age-Related Macular Degeneration. *AIMS Molecular Science*, 3 (2) : 196.
- Shi, L. L., Chen, B. N., Gao, M., Zhang, H. A., Li, Y. J., Wang, L., Du, G. H. 2011. The Characteristics of Therapeutic Effect of Pinocembrin in Transient Global Brain Ischemia/Reperfusion Rats. *Life Sciences*, 88 (11-12), 521-528.
- Silici, S., Kutluca, S. 2005. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Propolis Collected by Three Different Races of Honeybees in The Same Region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (1) : 69-73.
- Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C. C., Klein, B. E., de Jong, P. T. 2001. Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration: Pooled Findings From Three Continents. *Ophthalmology*, 108 (4) : 697-704.
- Solmaz, A., Akyol, S. 2010. Retina Embriyogenezi-Fizyolojisi, Muiyane Yöntemleri, Retina Dejeneresanslar. 2. Baskı. O'dwyer P. Ankara. Günes Kitabevi.
- Soltan-Dallal, M. M., Validi, M., Douraghi, M., Fallah-Mehrabadi, J., Lormohammadi, L. 2017. Evaluation the Cytotoxic Effect of Cytotoxin-Producing *Klebsiella Oxytoca* Isolates on the Hep-2 Cell Line By MTT Assay. *Microbial Pathogenesis*, 113, 416-420.
- Soromou, L. W., Chu, X., Jiang, L., Wei, M., Huo, M., Chen, N., Deng, X. 2012. *In Vitro* and *In Vivo* Protection Provided by Pinocembrin Against Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. *International Immunopharmacology*, 14 (1), 66-74.
- Soromou, L. W., Zhang, Y., Cui, Y., Wei, M., Chen, N., Yang, X., Wang, D. 2013. Subinhibitory Concentrations of Pinocembrin Exert Anti- *S Taphylococcus Aureus* Activity By Reducing A- Toxin Expression. *Journal of Applied Microbiology*, 115 (1), 41-49.

- Stohs, S. J., Bagchi, D. 1995. Oxidative Mechanisms in The Toxicity of Metal Ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18 (2) : 321-336.
- Streilein, J. W., Ma, N., Wenkel, H., Ng, T. F., Zamiri, P. 2002. Immunobiology and Privilege of Neuronal Retina and Pigment Epithelium Transplants. *Vision Research*, 42 (4) : 487-495.
- Su, B. N., Park, E. J., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Fong, H. H., Kinghorn, A. D. 2003. Activity-Guided Isolation of The Chemical Constituents of *Muntingia calabura* Using A Quinone Reductase Induction Assay. *Phytochemistry*, 63 (3) : 335-341.
- Sunness, J. S. 1999. The Natural History of Geographic Atrophy, the Advanced Atrophic Form of Age-Related Macular Degeneration. *Mol Vis*, 5 (25) : 25.
- Thumann, G., Hoffmann, S., Hinton, D. R. 2006. Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium. *In Retina Fourth Edition*. 137-152.
- Toh, Y., Kuninaka, S., Mori, M., Oshiro, T., Ikeda, Y., Nakashima, H., Sugimachi, K. 2000. Reduced Expression of Manganese Superoxide Dismutase mRNA May Correlate With Invasiveness in Esophageal Carcinoma. *Oncology*, 59 (3) : 223-228.
- Touyz, R. M., Briones, A. M., Sedeek, M., Burger, D., & Montezano, A. C. 2011. NOX Isoforms and Reactive Oxygen Species in Vascular Health. *Molecular Interventions*, 11 (1) : 27.
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A. 1996. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (3) : 331-342.
- Van Lookeren Campagne, M., LeCouter, J., Yaspan, B. L., Ye, W. 2014. Mechanisms of Age- Related Macular Degeneration and Therapeutic Opportunities. *The Journal of Pathology*, 232 (2) : 151-164.
- Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Abraham, J. 2012. Years Lived with Disability (YLDs) for 1160 Sequelae of 289 Diseases and Injuries 1990–2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380 (9859) : 2163-2196.
- Wangkangwan, W., Boonkerd, S., Chavasiri, W., Sukapirom, K., Pattanapanyasat, K., Kongkathip, N., Yompakdee, C. 2009. Pinostrobin From *Boesenbergia pandurata* is an Inhibitor of Ca²⁺-Signal-Mediated Cell-Cycle Regulation in the Yeast

- Saccharomyces Cerevisiae. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73 (7) : 1679-1682.
- Weisshaar, B., Jenkins, G. I. 1998. Phenylpropanoid Biosynthesis and Its Regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 (3) : 251-257.
- Wong, W. T., Kam, W., Cunningham, D., Harrington, M., Hammel, K., Meyerle, C. B., Ferris, F. L. 2010. Treatment of Geographic Atrophy by the Topical Administration Of OT-551: Results of A Phase II Clinical Trial. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (12) : 6131-6139.
- Wu, C. X., Liu, R., Gao, M., Zhao, G., Wu, S., Wu, C. F., Du, G. H. 2013. Pinocembrin Protects Brain Against Ischemia/Reperfusion Injury by Attenuating Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis. *Neuroscience Letters*, 546 : 57-62.
- Wu, D., Nair, M. G., DeWitt, D. L. 2002. Novel Compounds From Piper Methysticum Forst (Kava Kava) Roots and Their Effect on Cyclooxygenase Enzyme. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4) : 701-705.
- Xian, Y. F., Ip, S. P., Lin, Z. X., Mao, Q. Q., Su, Z. R., Lai, X. P. 2012. Protective Effects of Pinostrobin on B-Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32 (8) : 1223-1230.
- Yan, Y., Kohli, A., Koffas, M. A. 2005. Biosynthesis of Natural Flavanones in Saccharomyces Cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9) : 5610-5613.
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F. 2001. Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids From Their Oxidation Potentials. *Analytical Sciences*, 17 (5) : 599-604.
- Yang, N., Qin, S., Wang, M., Chen, B., Yuan, N., Fang, Y., Wang, J. 2013. Pinocembrin, A Major Flavonoid in Propolis, Improves The Biological Functions of EPCS Derived From Rat Bone Marrow Through The PI3K-ENOS-NO Signaling Pathway. *Cytotechnology*, 65 (4) : 541-551.
- Yang, Z. H., Sun, X., Qi, Y., Mei, C., Sun, X. B., Du, G. H. 2012. Uptake Characteristics of Pinocembrin and its Effect on P-Glycoprotein at The Blood–Brain Barrier in *In Vitro* Cell Experiments. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14 (1) :14-21.
- Yang, Z., Liu, R., Li, X., Tian, S., Liu, Q., Du, G. 2009. Development and Validation of A High-Performance Liquid Chromatographic Method For Determination of

Pinocembrin in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (5) : 1277-1281

Yılmaz, N., Aktaş S. 2009. Göz Bölüm 24 Çeviri

Yuan, Y., Yang, Q. Y., Tong, Y. F., Chen, F., Qi, Y., Duan, Y. B., Wu, S. 2008. Synthesis and Enantiomeric Resolution of (±)-Pinocembrin. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10 (10) : 999-1002.

Yuzawa, M., Fujita, K., Tanaka, E., Wang, E. C. 2013. Assessing Quality of Life in the Treatment of Patients with Age-Related Macular Degeneration: Clinical Research Findings and Recommendations For Clinical Practice. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, 7 : 1325.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Derya KILIÇASLAN

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 31.01.1984 Adana

Medeni hali : Evli

Telefon : 0 (344) 300 22 82

e-posta :deryatrnc@ksu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	KSÜ/Fen Bilimleri/Biyomühendislik ve Bilimleri	2018
Yüksek lisans	KSÜ /Fen Bilimleri/Kimya	2011
Lisans	KSÜ/ Kimya Bölümü	2008
Lise	Adana Rotary Anadolu Lisesi	2002

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2011	KSÜ	Araştırma Görevlisi
2012-	KSÜ	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Projeler

- 1- Proje adı: Sefalosporin grubu (lorakarbef, sefprozil, sefaklor, sefaperazone, sefodizim, seftazidime ve sefataxim) antibiyotiklerin Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Fe(II), Fe(III), Pt(II), Pd(II) ve Ru(II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, elektroanalitik, kemilüminesans ve antibakteriyal özelliklerinin araştırılması

Proje No: 105T371

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşegül Gölcü

Araştırmacılar: Uzm. Mustafa Dolaz, Kim. Abdurrahman Ceren, Kim. Mustafa Güngör, **Kim. Derya Tarınc**, Kim. Burcu Doğan, Dr. R. Alan Wheatley, Prof. Dr. Sibel A. Ozkan

Destekleyen Kuruluş: **TÜBİTAK**, 2006.

- 2- Proje adı: Valasiklovir geçiş metal (Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Pd(II) ve Fe(III)) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi.

Proje No:2009/3-10

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşegül Gölcü

Araştırmacı: Kim. **Derya Tarınc**

Destekleyen Kuruluş: K.S.Ü. **BAP**, 2009.

- 3- Proje adı: Bazı Antibiyotik, Antieflamatuar ve Kas Gevşetici İlaç Etken Maddelerinin ve Cu, Zn, Fe ve Pt Metal Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Elektrokimyasal ve DNA'ya Bağlanabilme Özelliklerinin İncelenmesi.

Proje No:2009/4-12 M

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşegül Gölcü

Araştırmacılar: Prof. Dr. Mehmet Tümer, Yrd. Doç. Mustafa Dolaz, Kim. Mustafa Çeşme, Kim. Harun Muslu, **Kim. Derya Tarınc**

Destekleyen Kuruluş: K.S.Ü. **BAP**, 2009.

- 4- Proje adı: Bazı Antiviral ve Antibakteriyel İlaç Etken Maddelerinin Metal (Cu (II), Zn(II), Fe(III), Pt(II) ve Ru(III)) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

Proje No: 109T020

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşegül Gölcü

Araştırmacılar: Prof. Dr. Mehmet Tümer, Prof. Dr. M. Şengün Özsöz, Doç. Dr. Mustafa Dolaz, Yük. Kim. Mustafa Çeşme, **Kim. Derya Tarınc**

Destekleyen Kuruluş: **TÜBİTAK (COST)**, 2009.

- 5-Proje adı: Bazı Antineoplastik İlaç Etken Maddelerinin Zn(II), Pt(II) ve Pd(II) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu, Elektroanalitik Özelliklerinin ve DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

Proje No: 2012/3-22M

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Ayşegül Gölcü

Araştırmacılar: Yük. Kim. Mustafa Çeşme, **Yük. Kim. Derya Tarınc**, Duygu Polat

Destekleyen Kuruluş: K.S.Ü. **BAP**, 2012.

6-Proje adı: Retina Pigment Epitel Hücrelerinde (Arpe-19) Hidrojen Peroksit İle Oluşturulan Oksidatif Streste Pinosembrin ve Pinostrobin'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması

Proje No: 2017/2-50D

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Akif Hakan Kurt

Araştırmacılar: Derya Kılıçaslan, Adem Doğaner

Destekleyen Kuruluş: K.S.Ü. **BAP**, 2017.

7-Proje adı: Melatonin ve Metabolitlerinin Retinal Pigment Epiteli (ARPE-19) Üzerinde Hidrojen Peroksit Hasarına Karşı Etkisi

Proje No: 2017/7-170YLS

Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Akif Hakan Kurt

Araştırmacılar: Ebru Uras, Derya Kılıçaslan,

Destekleyen Kuruluş: K.S.Ü. **BAP**, 2017.

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Gölcü Aysegül, Muslu Harun, **Kılıçaslan Derya**, Çesme, Mustafa, Eren Özge, Atas Fatma, Demirtas Ibrahim (2016). The new generation drug candidate molecules: Spectral, electrochemical, DNA-binding and anticancer activity properties. Journal of Molecular Structure,1119, 96-109., Doi: 10.1016/j.molstruc.2016.03.078 (Yayın No: 2837539)

2. **Kılıçaslan Derya**, Gölcü Aysegül (2015). Electrochemical behavior of valacyclovir and its square wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and biological fluids. Russian Journal of Electrochemistry, 51(2), 149-158., Atif Sayısı: 1, Doi: 10.1134 1 S1023193515020135 (Yayın No: 2044597).

3. Muslu Harun, **Kılıçaslan Derya**, Mustafa Cesme, Gölcü Ayşegül, Özkan Sibel Ayşıl (2014). Metal Based Pharmacological Active Agents: Structural, Electrochemical, DNA Binding Studies and Antibacterial Properties. Current Drug Therapy (Yayın No: 2179156)

4. **Tarinc Derya**, Burcu Dogan-Topal, Gölcü Ayşegül, Özkan Sibel Aysıl (2014). Electrochemical investigation and determination of ceftazidime in pharmaceutical dosage forms and human urine. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(9), 899-908., Doi: 10.1134/S1061934814090056 (Yayın No: 1344530).
5. **Tarinc Derya**, Mustafa Çeşme, Muslu Harun, Gölcü Ayşegül, Tümer Mehmet, Özkan Sibel Aysıl (2013). Synthesis, Structural Characterization and Electrochemical Evaluation of Schiff Base Transition Metal Complexes with Ceftazidime. *Current Analytical Chemistry*, 9(2), 319-332., Atıf Sayısı: 1 (Yayın No: 1344521).
6. **Tarinc Derya**, Gölcü Ayşegül, Tümer Mehmet, Taner Karaoglu, Mehmet Ozsoz (2013). Electrochemical Investigation and DNA-Binding Studies of Valacyclovir-Copper(II) Complex. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 43(2), 140-148., Atıf Sayısı: 1, Doi: 10.1080/15533174.2012.680136 (Yayın No: 1344528).
7. **Tarinc Derya**, Gölcü Ayşegül (2013). A simple spectrophotometric procedure for determination of valaciclovir in dosage forms and biological fluids. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(1), 27-32., Atıf Sayısı: 2, Doi: 10.1134/S106193481301005X (Yayın No: 1344873).
8. Demirezen Nihat., **Tarinc Derya**, Polat Duygu, Cesme Mustafa, Golcu Ayşegül, Tümer Mehmet (2012). Synthesis of Trimethoprim Metal Complexes: Spectral, Electrochemical, Thermal, DNA-Binding and Surface Morphology Studies. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 94, 243-255, Atıf Sayısı: 14, Doi: 10.1016/j.saa.2012.03.055 (Yayın No: 1344869).
9. **Tarinc Derya**, Gölcü Ayşegül (2012). Development and validation of spectrophotometric methods for determination of some cephalosporin group antibiotic drugs. *Journal of Analytical Chemistry*, 67(2), 144-150., Atıf Sayısı: 3, Doi: 10.1134/S1061934812020128 (Yayın No: 1344872).
10. Cesme M., **Tarinc D.**, Golcu A. (2011). Spectrophotometric Determination of Metoprolol Tartrate in Pharmaceutical Dosage Forms on Complex Formation with Cu(II). *Pharmaceuticals*, 4(12), 964-975., Atıf Sayısı: 13, Doi: 10.3390/ph4070964 (Yayın No: 1344870).
11. **Tarinc Derya**, Topal Burcu Dogan, Dolaz Mustafa, Gölcü Ayşegül, Özkan Sibel Aysıl (2010). Synthesis, Characterization, Biological Activity and Voltammetric

Behavior and Determination of Cefaclor Metal Complexes. *Current Analytical Chemistry*, 6(4), 316-328., Atıf Sayısı: 10 (Yayın No: 1344529)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Tarinc Derya**, Gölcü Aysegül (2011). Development and Validation of Spectrophotometric Methods for Determination of Thiamphenicol in Capsule Forms. *KSU Mühendislik Dergisi* (Kontrol No: 1344876)

Uluslararası bildiriler

1. E. Uras, A. H. Kurt, **D. Kiliçaslan**, B. Alli, A. Doğaner. Effects of Melatonin and Metabolites On Hydrogen Peroxide Damage on Retinal Pigment Epithelium (Arpe-19) 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society in Malatya, 29 June-01 July 2018.
2. B. Alli, G. Ceyhan, **D. Kiliçaslan**, A. Doğaner, A.H. Kurt. Effects Of The Calcium Malic Acid Complex Against Hydrogen Peroxide-Induced Cellular On Retinal Pigment Epithelium. 3rd International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society in Malatya, 29 June-01 July 2018.
3. **D. Tarinc**, M. Cesme, A. Gölcü, Synthesis of Sulpiride Metal Complex; Spectral, Electrochemical and DNA-Binding Studies. Pittcon 2013, March 17 – 21, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA.
4. **D. Tarinc**, D. Polat, A. Gölcü. Electrospray Ionization Mass Spectrometric Study on the Coordination Behavior of Cefotaxime Sodium Towards Transition Metal Ions. April 29- May 3, 2012, Olomouc, Czech Republic.
5. **D. Tarınc**, A. Gölcü. Synthesis, Structural Characterization, In Vitro Cytotoxicity and Antiviral Activity and DNA-Binding Studies of Valacyclovir-Platinum(II) Complex. 9. International Electrochemistry Meeting in Turkey. September 25-29, 2011. İzmir.
6. **D. Tarınc**, A. Gölcü, Peter Zuman. Electrochemical Studies of Antibacterial Drug Enoxacin and DNA. 9. International Electrochemistry Meeting in Turkey. September 25-29, 2011. İzmir.
7. H. Muslu, **D. Tarınc**, A. Gölcü, M. Dolaz. Synthesis and Characterization of Some Drug-Metal Complexes, COST D39 Metallo-Drug Design and Action Workshop in Debrecen, Hungary, September 24-25, 2009.

8. H. Muslu, M. Çeşme, **D. Tarıncı**, M. Dolaz, A. Gölcü. Electroanalytic Investigations of some Transition Metal Complexes of Antiviral Drug Asiclovir, VIII. International Elektrochemistry Meeting, 8-11 October, 2009.
9. M. Çeşme, H. Muslu, **D. Tarıncı**, M. Dolaz, A. Gölcü. Electrochemical Investigations of Loracarbef-Cu(II) Complexes by Voltammetric Techniques, VIII. International Elektrochemistry Meeting, 8-11 October, 2009.
10. H. Muslu, M. Çeşme, **D. Tarıncı**, M. Dolaz, A. Gölcü. Electrochemical Investigations of Some Pefloxacin Transition Metal Complexes with Voltammetric Techniques, VIII. International Elektrochemistry Meeting, 8-11 October, 2009.
11. **D. Tarıncı**, M. Çeşme, H. Muslu, M. Dolaz, A. Gölcü. Electrochemical Investigations of Valaciclovir-Cu(II) Complex with Voltammetric Techniques, VIII. International Elektrochemistry Meeting, 8-11 October, 2009.

Ulusal bildiriler

- 1- D. Kılıçaslan, M. Altunbek, Ö. Eren, **A. Gölcü**, M. Culha. Sufficient and Effective of Metal Based Drug; Delivery to A549 Cells by Using The Oligonucleotide Conjugated. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 01-05 Eylül 2014, KSÜ, Kahramanmaraş.
- 2- D. Kılıçaslan, M. Altunbek, Ö. Eren, **A. Gölcü**, M. Culha. The Effect of DAC and Its Derivative on A549 Cell Viability. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 01-05 Eylül 2014, KSÜ, Kahramanmaraş.
- 3- N. Helvacı, **D. Kılıçaslan**, M. Cesme, A. Gölcü. Spectrophotometric Studies of Mitomycin C Bound to Fish Sperm DNA. III. Eser Analiz Çalıştayı 15-18 Mayıs 2014 GOP, Tokat.
- 4- D. Polat, **D. Kılıçaslan**, A. Gölcü. Antipsikotik Etkili Amisülpirid'in DNA ile Etkileşimi. III. Eser Analiz Çalıştayı 15-18 Mayıs 2014 GOP, Tokat.
- 5- Ö. Eren, **D. Kılıçaslan**, A. Gölcü. Dakarbazin'in DNA ile Etkileşiminin Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması. III. Eser Analiz Çalıştayı 15-18 Mayıs 2014 GOP, Tokat.
- 6- D. Polat, **D. Kılıçaslan**, A. Gölcü. Amisülpirid'in DNA ile Etkileşimi ve Bu Etkileşime Metal Etkisi. 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi. 21-22-23 Mart 2014, Antalya.

- 7- **D. Tarıncı**, A. Gölcü. Sefotaksim'in Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin DNA ile Etkileşimi ve DNA Bağlanma Sabitinin Hesaplanması, 26. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla, 2012.
- 8- **D. Tarıncı**, D. Polat, A. Gölcü, A.S. Özkan, Valasiklovir'in DNA ile Etkileşiminin Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması, Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Hatay, 3- 7 Eylül 2012.
- 9- **D. Tarıncı**, M. T. Karaoğlu, A. Gölcü. Antiviral İlaç Etken Maddesi Olan Valasiklovir'in Bazı Geçiş Metal Kompleksleri'nin Sentezi, Karakterizasyonu, Antiviral ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması III. Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Çanakkale 2011.
- 10- **D. Tarıncı**, M. T. Karaoğlu, A. Gölcü. M. Özsöz. Synthesis, Structural Characterization, in Vitro Cytotoxicity and Antiviral Activity and DNA-Binding Studies of Valacyclovir-Copper(II) Complex, III.Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Çanakkale 2011.
- 11- D. Polat, **D. Tarıncı**, M. Dolaz, A. Gölcü, M. Tümer. Enoksasin'in Bazı Geçiş Metal Kompleksleri'nin Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi, III.Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Çanakkale 2011.
- 12- D. Polat, **D. Tarıncı**, A. Gölcü, M. Özsöz. Voltammetry of the Antibacterial Drug Enoxacin and DNA, III.Ulusal Anorganik Kimya Kongresi, Çanakkale 2011.
- 13- **D. Tarıncı**, M. Dolaz, A. Gölcü, M. Tümer. Valasiklovir'in Cu(II) ve Ru(III) Geçiş Metal Kompleksleri'nin Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi. Erzurum, 25. Ulusal Kimya Kongresi. Temmuz 2011.
- 14- **D. Tarıncı**, N. Demirezen, H. Muslu, S. Uruş, A. Gölcü, M. Tümer. Bazı İlaç-Metal Komplekslerinin Kataliz Özelliklerinin İncelenmesi. Organometalik Kimya ve Kataliz Çalıştayı. Malatya, 16-17 Mayıs 2010.
- 15- N. Demirezen, **D. Tarıncı**, B. Koçak, H. Muslu, V. Avcıoğlu, S. Uruş, A. Gölcü, M. Tümer. Trimethoprim'in Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Kataliz Özelliklerinin İncelenmesi. Organometalik Kimya ve Kataliz Çalıştayı. Malatya, 16-17 Mayıs 2010.
- 16- **D. Tarıncı**, N. Demirezen, V. Avcıoğlu, H. Muslu, A. Gölcü. Valasiklovir'in Farmasötik Dozajlardan ve Biyolojik Sıvılardan Spektrofotometrik Miktar Tayinleri. 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi. Erzurum, 21-25 Haziran 2010.

- 17- A. Gölcü, **D. Tarınc**, M. Çeşme, M. Dolaz. Lorakarbef'in Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Antimikrobiyal Davranışlarının İncelenmesi. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.165.
- 18- A. Gölcü, M. Çeşme, **D. Tarınc**, M. Dolaz, S. A. Özkan, S. Serin. Seftazidim'in Cu(II) ve Co(II) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.166.
- 19- **D. Tarınc**, M. Çeşme, M. Dolaz, A. Gölcü, S. A. Özkan. Sefoperazon ve Sefotaksim'in Farmasötik Dozajlardan Spektrofotometrik Miktar Tayinleri. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.167.
- 20- **D. Tarınc**, B. Doğan, M. Çeşme, M. Dolaz, A. Gölcü, S.A. Özkan. Sefaklor-Cu(II) Kompleksinin Elektrokimyasal Davranışının Voltammetrik Teknikler ile İncelenmesi. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.168.
- 21- M. Çeşme, **D. Tarınc**, M. Dolaz, A. Gölcü, M. Tümer. Antibiyotik Esaslı Schiff Baz Ligandının (HL1) Co(II), Cu(II), Ni(II) Metal Kompleksleri ile Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.503.
- 22- M. Çeşme, **D. Tarınc**, M. Dolaz, A. Gölcü. 4-[(2-Hidroksi-5-t-Bütil) Fenilazo] Benzilfosfonik Asit'in Cu(II), Co(II) ve Zn(II) Metal Komplekslerinin Elektro Analitik Yönlerinin İncelenmesi. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.504.
- 23- M. Dolaz, **D. Tarınc**, M. Çeşme, A. Gölcü. Fosfonik Asit Grubu İçeren Bazı Azo Bileşiklerinin Cu(II), Co(II) ve Ni(II) Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.505.
- 24- **D. Tarınc**, M. Çeşme, M. Dolaz, A. Gölcü, M. Tümer. Seftazidim Esaslı Schiff Bazının Geçiş Metal Komplekslerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran, 2009. p.506.
- 25- M. Çeşme, **D. Tarınc**, M. Dolaz, A. Gölcü, Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerinden Sefaklor'un Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin Antimikrobiyal Davranışlarının Araştırılması, II. Anorganik Kimya Günleri, Elâzığ, 16-19 Mayıs, 2009.
- 26- **D. Tarınc**, M. Çeşme, M. Dolaz, A. Gölcü. 4-[(2-Hidroksi-5-Kloro) Fenilazo] Benzilfosfonik Asiti'in Cu(II), Co(II) Ve Ni(II) Komplekslerinin Sentezi,

- Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi, II. Anorganik Kimya Günleri, Elâzığ, 16-19 Mayıs, 2009.
- 27- M. Çeşme, D. **Tarınç**, M. Dolaz, A. Gölcü. 4-[(2-Hidroksi-5-*T*-Bütül) Fenilazo] Benzilfosfonik Asit İçeren Bazı Azo Bileşiklerinin Fe(III), Al(III) ve Cr(III) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Boyar Madde Özelliğinin İncelenmesi, II. Anorganik Kimya Günleri, Elazığ, 16-19 Mayıs, 2009.
- 28- M. Çeşme, D. **Tarınç**, M. Dolaz, A. Gölcü. Fosfonik Asit Grubu İçeren 4-[(2-Hidroksi-5-Kloro) Fenilazo] Benzilfosfonik Asit'in Fe(III), Al(III) ve Cr(III) Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Boyar Madde Özelliğinin İncelenmesi, II. Anorganik Kimya Günleri, Elazığ, 16-19 Mayıs, 2009.
- 29- H. Muslu, D. **Tarınç**, M. Çeşme, M. Dolaz, A. Gölcü, (6R,7R, Z)-7-(2-(2-Aminothiazol-4-Yl)-2-(2-Karboksiopropan-2-Oxiimino) Asetamido)-8-Okso-3-(Piridin-1-Metil)-5-Tio-1-Aza Bisiklo [4.2.0] Oct-2-En-2-Karboksilat (Seftazidim)'in Cu(II) Kompleksinin Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi, II. Anorganik Kimya Günleri, Elazığ, 16-19 Mayıs, 2009.
- 30- M. Çeşme, B. Kocak, D. **Tarınç**, M. Dolaz, A. Gölcü. Synthesis, Characterization and Analytical Investigation of 4-[(2-hydroxy-5-methoxy) phenylazo] benzylphosponic Acide and Its Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Fe(III), Al(III), Cr(III), Ag(I) Complexes, IV. National Analytical Chemistry Congress, s: 158, Elazığ, 25-27 June 2008.
- 31- D. **Tarınç**, A. Gölcü. Spectrophotometric Determination of Some Drugs Containig Cephalosporine Groups, IV. National Analytical Chemistry Congress, s: 159, Elazığ, 25-27 June 2008.
- 32- A. Gölcü, M. Dolaz, D. **Tarınç**, S. Serin. Sefâklor'un Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) ve Cd(II) ile Verdiği Komplekslerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi. XXII. Ulusal Kimya Kongresi 6-10 Ekim 2008. Magusa. K.K.T.C. p.21.
- 33- D. **Tarınç**, B. Koçak, A. Gölcü, M. Dolaz, N. Kavak, H. Demirelli Levofloksasin'in Tabletlerden Spektrofotometrik Miktar Tayini. XXII. Ulusal Kimya Kongresi 6-10 Ekim 2008. Magusa. K.K.T.C. p.132.
- 34- D. **Tarınç**, B. Koçak, M. Dolaz, A. Gölcü, M. Tümer. Lorakarbef'in *o*-vanilinle Oluşturduğu Schiff Bazının Sentezi, Karakterizasyonu ve Analitik Yönlerinin İncelenmesi. XXII. Ulusal Kimya Kongresi 6-10 Ekim 2008. Magusa. K.K.T.C. p.133.